



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MÁRCIA RAQUEL FÉLIX DA COSTA

**PARÂMETROS DE QUALIDADE E ESTUDO DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO PARA
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÁGUAS SANITÁRIAS**

JOÃO PESSOA

2019

MÁRCIA RAQUEL FÉLIX DA COSTA

**PARÂMETROS DE QUALIDADE E ESTUDO DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO PARA
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÁGUAS SANITÁRIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso que apresenta à
Coordenação do Curso de Engenharia Química do
Centro de Tecnologia da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Engenheiro Químico.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Santos Coelho

JOÃO PESSOA

2019

MÁRCIA RAQUEL FÉLIX DA COSTA

**PARÂMETROS DE QUALIDADE E ESTUDO DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO PARA
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÁGUAS SANITÁRIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Químico.

Data:

Resultado:

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Santos Coelho (DEQ/CT/UFPB)
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Sharline Florentino de Melo Santos (DEQ/CT/UFPB)
(Examinadora Interna)

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa (DEQ/CT/UFPB)
(Examinador Interno)

C837p Costa, Márcia Costa Félix da.

Parâmetros de qualidade e estudo do método de disco-difusão para determinação da atividade antimicrobiana de águas sanitárias/ Márcia Costa Félix da Costa. – João Pessoa, 2019.

55f. il.:

Orientadora: Profa. Dra. Ana Flávia Santos Coelho.

Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Química) Campus I - UFPB / Universidade Federal da Paraíba.

1. Hipoclorito de sódio
2. Controle de qualidade
3. Teor de cloro ativo.
4. Método disco-difusão
5. Microrganismos indicadores.

BS/CT/UFPB

CDU: 2.ed. 66.01:658.56 (043.2)

*Ao futuro, para que este seja o fim de um ciclo, para o início de
um novo, vitorioso e honrado.
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

Ao longo da minha vida, Deus sempre me presenteou com pessoas especiais e com propósitos definidos para comigo, a começar por Sr. Joaquim Jeronimo Leite (*in memoriam*), que me apoiou e acreditou que a filha de um agricultor conseguiria entrar em uma universidade pública e se formar, e eu sou exemplo disso. Hoje, em memória a ele, agradeço por todo apoio e incentivo. Confesso que foi um caminho árduo, mas finalmente consegui chegar ao final, e gostaria de expressar aqui por palavras, sentimentos de gratidão a todos aqueles que de alguma forma me acompanharam e contribuíram para que esta etapa da minha vida se tornasse uma realidade.

Gratidão a Deus, que sempre esteve ao meu lado, me concedendo força, ânimo e crença para eu não desistir e continuar lutando por este meu sonho e objetivo de vida.

Depois de Deus a minha família, por ser a maior razão de tudo. Quero agradecer a minha mãe, meu maior exemplo de mulher, por ser tão incrível e por me amar e me apoiar a todo tempo. As minhas irmãs Mônica e Maysa por todo carinho, força e apoio; Mônica em especial, por nunca ter deixado eu desistir e ser meu ombro amigo. A tia Lucenilda, que me deu suporte e acreditou em mim. A minha Vozinha, Maria Gomes, representação do mais puro e singelo amor! Obrigada pelas palavras sábias, sempre ditas em momentos oportunos. Sem esquecer do meu pai Zezito, homem honrado e de força, que deposita constantemente toda confiança em mim. Vocês foram fundamentais para que eu me tornasse quem sou hoje. Amo vocês!

Agradecer a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Santos Coelho por ter me acolhido e acreditado em mim. Ainda agradeço por todo conhecimento repassado, ajudas e experiências que me proporcionou. Obrigada prof. ^a!

A Ana Flávia Queiroz, que tive a oportunidade de conhecer apenas agora, mas que foi peça fundamental para a realização das minhas análises, assim também por toda sua disponibilidade, atenção e carinho comigo. Juntamente com ela, as minhas amigas Samara Araújo e Mirele Pereira, que se dispuseram a me auxiliar ao longo de todo este trabalho, por toda força, paciência e compreensão. Obrigada por tudo!

A Coordenação e ao Departamento do curso de Engenharia Química da UFPB pelo apoio e disponibilização de sua estrutura física e aos professores reconheço um esforço gigante com muita paciência e sabedoria. Foram eles que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais todos os dias.

A minha amiga Laênia Candido, que foi meu primeiro contato no curso de Engenharia Química e que esteve comigo durante toda essa jornada, aconselhando e ajudando a resolver muitos dos desafios que surgiam diariamente.

As neguinhas Daphne Irene, Álida Janine, Amanda Tavares, Cibelly Santos, Roseane Leite, Maeli Avelino, Ivanilda Ferreira e Stefany Paulino, obrigada por estarem comigo desde o começo de tudo, o companheirismo de vocês foi de grande valia. Assim como também a meus amigos Romonilson Mendes e Manuel Zacarias, por suas palavras de encorajamento e apoio.

Aos funcionários que compõem a Biblioteca Setorial do Centro de Tecnologia (Rosangela Gonçalves, Oneida Pontes, Sr. Nilson Forte e Germana Laura), na qual tive a oportunidade de trabalhar durante 2 anos. Vocês serão levados para sempre em meu coração.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia Industrial, eu agradeço pela ajuda e por fazer os meus dias de análises mais divertidos (Millena Tavares, Alisson Fabricio, João Marcos), meu muito obrigada. E não posso esquecer de todo amparo que a Universidade me deu através dos recursos disponíveis e de toda estrutura que facilita a grande harmonia entre todos os intervenientes, além de momentos ímpares que jamais sairão da minha memória.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa jornada, muito obrigada!

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los”.

“Uma jornada de mil milhas começa
com um pequeno passo.”
(Lao-tsé)

RESUMO

Utilizado para muitas finalidades, o hipoclorito de sódio é rotineiramente encontrado em todos os lares brasileiros sob a designação de água sanitária, a qual apresenta características que podem ser prejudiciais ao ser humano, tais como queimaduras na pele e nos olhos, principalmente em altas concentrações. Com isso, é essencial haver um arcabouço, que possa garantir a qualidade desses produtos através da avaliação de parâmetros relacionados à eficácia, à segurança da aplicação e à garantia da qualidade desse produto. Desta maneira, o presente trabalho tem como objetivo analisar a qualidade físico-química de dez marcas comerciais de água sanitária, bem como realizar um estudo do método de disco-difusão para determinar a atividade antimicrobiana das mesmas. Para determinação da qualidade físico-química foram realizadas as análises de pH e determinação do teor de cloro ativo. De modo geral, foi constatado que as marcas comerciais de água sanitária analisadas apresentaram valores de pH variando de 12,2 a 12,7 estando em conformidade com o definido pela legislação. Já em relação ao teor de cloro ativo, duas amostras apresentaram teor superior ao valor definido pela legislação, que é de 2,0% a 2,5% p/p, e uma amostra com teor abaixo do estabelecido. Foram feitas modificações na condução do método de disco-difusão que permitissem uma melhor determinação da atividade antimicrobiana da água sanitária. Isso porque os resultados mostraram que em nove marcas ocorreu apenas redução da população microbiana próximo ao disco, quando o esperado seria a formação de um halo de inibição.

Palavras-chave: Hipoclorito de sódio. Controle de qualidade. Teor de cloro ativo. Método de disco-difusão. Microrganismos indicadores.

ABSTRACT

The sodium hypochlorite is used for many purposes and routinely found in all Brazilian homes about the designation of bleach, with characteristics that may be harmful for humans, such as skin and eye burns, especially in high concentrations. Therefore, it is essential to have a legislation that can guarantee the quality of these products through the evaluating variables related to the effectiveness, safety of application and quality assurance of these product. Thus, the present work aims to analyze the physico-chemical quality of ten commercial bleach brands, as well as to study the disc diffusion method to determine their antimicrobial activity. For determination the physico-chemical quality were realized pH analyze and determination of active chlorine content. In general, it was found that the bleach brands presented pH values ranging from 12.2 to 12.7, in accordance with the defined by the legislation. In relation of the active chlorine content, two samples presented values higher those defined by legislation, which is 2.0% to 2.5% w / w, and one sample with a value below the established. Changes were made in the conduction of the disk diffusion method that allows a better determination of the antimicrobial activity of bleach. This is because the results shown in nine marks occurred only reduction of the microbial population next of the disc, when the expected would be formation of an inhibition halo.

Keywords: Sodium hypochlorite. Quality control. Active chlorine content. Disk diffusion method. Indicator microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variação anual do PIB para a indústria de higiene, limpeza e saneantes do ano de 2014 até 2018.....	20
Figura 2 - Valores em R\$ que o setor de Água Sanitária e Alvejantes alcançou do ano de 2014 até 2018.....	21
Figura 3- Amostra de água sanitária, em triplicata, com água destilada	29
Figura 4 - Amostra de água sanitária com iodeto de potássio e ácido acético	29
Figura 5- Pausa da titulação.....	30
Figura 6 - Fim da titulação com mudança da coloração amarelo para incolor.....	30
Figura 7 – Determinação do pH em amostra de água sanitária	32
Figura 8 - Ilustração do movimento horizontal e vertical para fazer as estrias na placa, com auxílio do <i>swab</i>	34
Figura 9- Realização de estrias na placa de Petri descartável com auxílio do <i>Swab</i>	34
Figura 10 - Aplicação do disco de papel	35
Figura 11 - Medição do halo na posição horizontal e vertical respectivamente, com auxílio de um paquímetro	36
Figura 12 – Halos de inibição referentes a 12 horas de incubação com <i>Escherichia coli</i> para: (a) amostra D e (b) amostra J	42
Figura 13 – Halos de redução referentes a 24 horas de incubação para a amostra J com <i>Escherichia coli</i>	43
Figura 14 - Resultados das placas inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> e mantidas por 24 horas em temperatura ambiente para: (a) amostra A, (b) amostra D e (c) amostra I	45
Figura 15 – Comparação das placas incubadas a 35°C e em temperatura ambiente com <i>Staphylococcus aureus</i> para: (a) amostra A, (b) amostra D e (c) amostra I.....	45
Figura 16 – Teste de Controle Positivo e Negativo para <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figura 17 - Teste de Controle Positivo e Negativo para <i>Escherichia coli</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do teor de cloro ativo em águas sanitárias comercializadas na cidade de João Pessoa/PB	38
Tabela 2 - Resultados médios de pH de águas sanitárias comercializadas regularmente na Cidade de João Pessoa/PB.....	40
Tabela 3 - Média da triplicata dos halos de redução das amostras de água sanitária inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIPLA	Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza e Saneantes de Uso Doméstico e de Uso Profissional
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCC	American Type Culture Collection
CEN	Comitê Europeu de Normalização
DL	Lethal Dose
DO	Densidade Ótica
DOU	Diário Oficial da União
DU	Diluição de Uso
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HClO	Ácido hipocloroso
HF	Ácido Fluorídrico
HNO ₃	Ácido Nítrico
INCQS	Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
p/p	Peso por Peso
PIB	Produto Interno Bruto
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
UFC	Unidade Formadora De Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	SANEANTES	17
3.1.1	Definição	17
3.1.2	Classificação	17
3.1.3	Cenário Econômico para a Indústria de Saneante	19
3.2	ÁGUA SANITÁRIA.....	22
3.2.1	Requisitos para o registro da água sanitária	22
3.2.2	Hipoclorito de sódio	23
3.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	24
3.3.1	Métodos para Determinação da Atividade Antimicrobiana	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	28
4.2	DETERMINAÇÃO DO CLORO ATIVO	28
4.2.1	Cálculo.....	31
4.3	DETERMINAÇÃO DO pH	31
4.4	ESTUDO DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	32
4.4.1	Cultura microbiana e preparo do inóculo	32
4.4.2	Preparo do meio de cultura	33
4.4.3	Inoculação da Placa	33
4.4.4	Aplicação dos discos por difusão	35

4.4.5 Incubação das Placas e medida dos halos	35
4.4.6 Teste de Controle Positivo e Negativo	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 ANÁLISE DO TEOR DE HIPOCLORITO DE SÓDIO	38
5.2 DETERMINAÇÃO DO pH	39
5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	41
5.3.1 Teste de Controle Positivo e Negativo	47
6 CONCLUSÃO	49
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	50
REFRÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Os saneantes estão presentes em todos os lares brasileiros, sendo destinados a aplicação em objetos, tecidos, ambientes e pisos, com o objetivo de limpeza, desinfecção, desodorização e sanitização, além de desinfecção de água para consumo humano, hortifrutícola e piscinas.

No mercado, existem diferentes tipos de produtos saneantes como desinfetantes detergentes e sabões, disponíveis em diferentes marcas.

A água sanitária é um saneante de consumo amplo e diverso por ser um produto encontrado com facilidade, apresentar baixo custo e de grande aceitação no mercado brasileiro, utilizado para garantir a desinfecção da água, ambientes e dos alimentos. No entanto, segundo Souza (2017), a água sanitária possui alta instabilidade relacionada a fatores como, temperatura, luminosidade e carga microbiana elevada, além de não matar esporos bacterianos, bacilo da tuberculose ou vírus não lipídicos em tempo aceitável.

Normas de controle são aplicadas ao processo de fabricação da água sanitária que, para ser comercializada, deve possuir o registro da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. O produto deve atender a Resolução - RDC nº110/2016, como solução aquosa a base de hipoclorito de sódio ou cálcio com teor de cloro ativo presente entre 2% a 2,5% p/p e o prazo máximo de seis meses de validade, uma vez que, em quantidade inferior que a estabelecida pela legislação, a ação deste produto não é eficiente (BRASIL, 2016). Por outro lado, em quantidades acima do permitido, significa maior concentração de cloro, que pode ser liberado em forma de gás, podendo ser absorvido pelo corpo humano através da respiração (INMETRO, 2013).

A água sanitária se caracteriza como produto alcalino, tendo potencial hidrogeniônico com valor máximo de 13,5, com a função de estabilizar o cloro ativo do produto e assim prolongar a sua validade, mas valores de pH acima do permitido pela legislação podem causar queimaduras na pele e nos olhos (BRASIL, 2016).

A ANVISA é o órgão responsável pela fiscalização, regulamentação e emissão do registro de comercialização de produtos de saneantes, e faz avaliações periódicas para verificar se as empresas produtoras estão obedecendo às regras de fabricação e o controle de qualidade dos produtos que são colocados a serviço das pessoas. Visto que há possibilidade de adulteração do produto comercial, falsificação, erros na formulação e mesmo a perda de cloro ativo dos produtos devido ao armazenamento inadequado e exposição prolongada nas prateleiras, propõe-se neste trabalho, a análise de parâmetros de qualidade físico química e o estudo do método de disco-difusão para determinação da atividade antimicrobiana de marcas comerciais de água

sanitária contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Escherichia coli* ATCC 10536.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade de diferentes marcas comerciais de água sanitária através dos parâmetros potencial hidrogeniônico (pH), teor de cloro ativo e atividade antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar quantitativamente o teor de hipoclorito de sódio por meio do método volumétrico e determinar o potencial hidrogeniônico (pH) nas marcas selecionadas;
- Comparar os resultados obtidos do teor de cloro ativo e pH com os valores estabelecidos pela legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2019);
- Estudar o método de disco-difusão para determinação da atividade antimicrobiana das marcas selecionadas contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Escherichia coli* ATCC 10536.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 SANEANTES

3.1.1 Definição

Segundo a Resolução RDC nº 184/2001, da ANVISA, saneantes domissanitários e afins são substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos e/ou públicos. São utilizados em lugares de uso comum e no tratamento de água, compreendendo: detergentes e seus congêneres; alvejantes; desinfetantes; desodorizantes; esterilizantes; algicidas para piscinas; fungicidas para piscinas; desinfetante de água para consumo humano; água sanitária; produtos biológicos; inseticidas; raticidas; jardinagem amadora; repelentes (BRASIL, 2001).

Para a fabricação destes produtos existe uma série de normas legais e técnicas para obter a autorização do Ministério da Saúde e licenciamento pelo órgão sanitário das Unidades Federativas, onde está localizada a indústria e o produto será comercializado. As indústrias também estão sujeitas à verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF e C), por meio de inspeções por autoridades sanitárias (BRASIL, 2001).

A Resolução RDC nº 59/2010 da ANVISA dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências, objetivando padronizar, estabelecer definições e características gerais dos saneantes, assim como apresentar os requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos, embalagem e rotulagem (BRASIL, 2010).

3.1.2 Classificação

A Resolução RDC nº 59/2010, da ANVISA estabelece os procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários levando-se em conta a avaliação e o gerenciamento de risco, considerando parâmetros como a toxicidade e a finalidade de uso do produto, a ocorrência de problemas anteriores, entre outros (BRASIL, 2010).

Quanto ao risco, através do artigo 5º da referida Resolução, os produtos saneantes são classificados como de Risco 1 e de Risco 2, para efeito de notificação e registro, respectivamente.

Os produtos saneantes são classificados como de Risco 1, de acordo com BRASIL (2010), quando:

- Apresentem DL50 oral para ratos superior a 2000mg/kg de peso corpóreo para produtos líquidos e superior a 500mg/kg de peso corpóreo para produtos sólidos;
- O valor de pH na forma pura, à temperatura de 25°C, seja maior que 2 ou menor que 11,5.
- Não apresentem características de corrosividade, atividade antimicrobiana, ação desinfestante e não sejam à base de microrganismos viáveis; e
- Não contenham em sua formulação um dos seguintes ácidos inorgânicos:
 - ✓ Fluorídrico (HF);
 - ✓ Nítrico (HNO₃);
 - ✓ Sulfúrico (H₂SO₄); ou
 - ✓ Seus sais que os liberem nas condições de uso do produto.

Exemplos de produtos saneantes Risco 1 são os saponáceos, alvejantes e amaciantes de roupas, polidores, detergentes, ceras para pisos, sabões, neutralizadores de odor, dentre outros.

Deve constar obrigatoriamente no rótulo que são “produtos notificados na ANVISA/MS” e o número do processo de notificação.

Os produtos saneantes são classificados como de Risco 2, de acordo com BRASIL (2010), quando:

- Apresentem DL50 oral para ratos superior a 2000mg/kg de peso corpóreo para produtos líquidos e superior a 500mg/kg de peso corpóreo para produtos sólidos;
- O valor de pH na forma pura, à temperatura de 25° C, seja igual ou menor que 2 ou igual ou maior que 11,5;
- Apresentem características de corrosividade, atividade antimicrobiana, ação desinfestante ou sejam à base de microrganismos viáveis; ou
- Contenham em sua formulação um dos seguintes ácidos inorgânicos:
 - ✓ Fluorídrico (HF);
 - ✓ Nítrico (HNO₃);
 - ✓ Sulfúrico (H₂SO₄); ou
 - ✓ Seus sais que os liberem nas condições de uso do produto.

Exemplos de produtos saneantes de Risco 2 são aqueles que garantem ação antimicrobiana, como água sanitária, desinfetantes, esterilizantes, fungicidas, assim como produtos desinfestante (para controle de pragas). Nesta lista ainda constam produtos fortemente ácidos ou alcalinos, como os desincrustantes.

Os produtos com ação antimicrobiana para indústria alimentícia e afins abrangem aqueles para uso em objetos, equipamentos e superfícies inanimadas e ambientes onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, utilizados em cozinhas, indústrias alimentícias, laticínios, frigoríficos, restaurantes e demais locais produtores ou manipuladores de alimentos. Estes são classificados em sanitizantes e desinfetantes (BRASIL, 2007). E devem constar em seus rótulos os números de registro com a sigla da autoridade competente e, somente

poderão ser comercializados, após a concessão do registro publicado no Diário Oficial da União (DOU).

Quanto à finalidade, os produtos saneantes são classificados, em:

- Limpeza em geral e afins;
- Desinfecção, esterilização, sanitização, desodorização, além de desinfecção de água para consumo humano, hortifrutículas e piscinas;
- Desinfestação;
- Tira manchas.

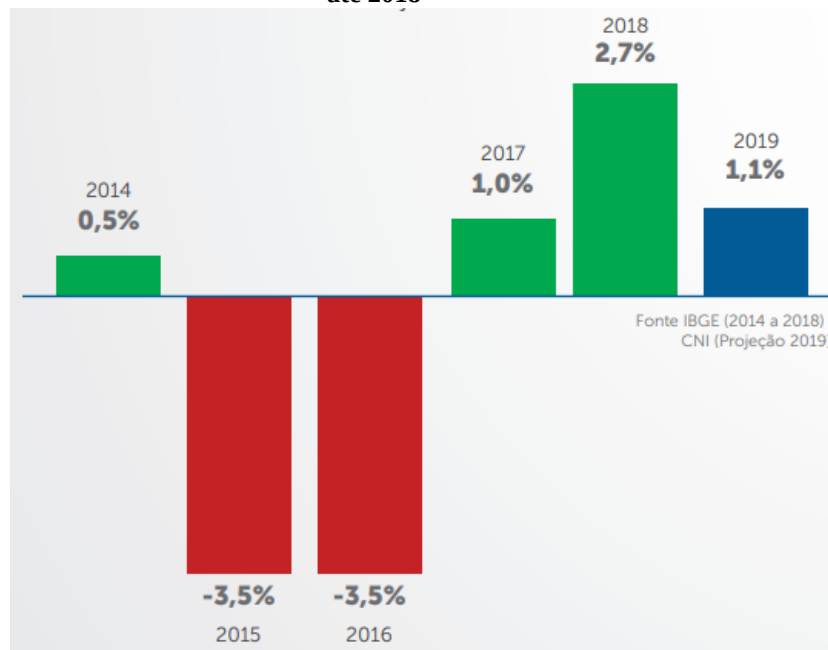
Já a classificação quanto à venda e emprego, em:

- Produtos de venda livre;
- Produtos de uso profissional ou de venda restrita a empresa especializada.

3.1.3 Cenário Econômico para a Indústria de Saneante

A indústria de higiene, limpeza e saneantes tem grande importância na economia do País. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza e Saneantes de Uso Doméstico e de Uso Profissional (ABIPLA), o setor nacional faturou, no ano de 2018, cerca de R\$ 21 bilhões, o que corresponde a 2,7% do Produto Interno Bruto (PIB) e está apresentado na Figura 1.

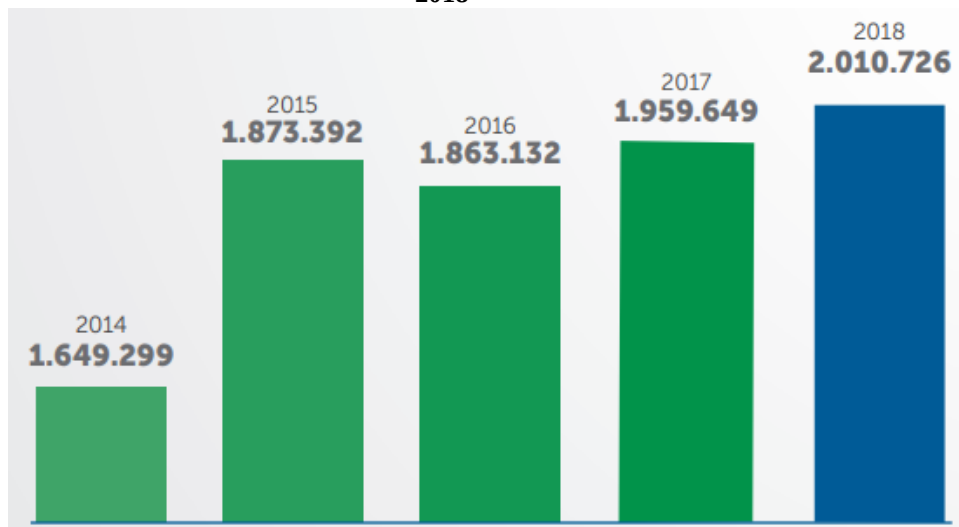
Figura 1 - Variação anual do PIB para a indústria de higiene, limpeza e saneantes do ano de 2014 até 2018



Fonte: IBGE (2014 a 2018) / CNI (Projeção 2019) (apud ABIPLA, 2019)

Considerando o cenário mundial, de acordo ABIPLA (2019), o Brasil é o quarto maior mercado de produtos de limpeza, segundo levantamentos realizados por institutos de pesquisa (Euromonitor, Kantar e Nielsen) em parceria com a ABIPLA. Isso demonstra que este setor é de extrema importância para a economia brasileira e, principalmente, para a vida das pessoas. O setor de Água Sanitária e Alvejantes, por exemplo, vem crescendo ano pós ano, e em 2018, gerou R\$ 2.010.729 para a economia, o que corresponde a um aumento 2,6% com relação a 2017, como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Valores em R\$ que o setor de Água Sanitária e Alvejantes alcançou do ano de 2014 até 2018



Fonte: Dados Nielsen (apud ABIPLA, 2019).

No Brasil, o setor de Produtos de Limpeza e Polimento, juntamente com desinfestantes domissanitários, alcança 100% dos municípios e gera em torno de 25 mil empregos diretos (ABIPLA, 2019). Todavia, apesar de todos esses dados positivos, as vendas no varejo a preços correntes em 2018 ficaram no mesmo patamar de 2017, segundo os dados da Euromonitor Internacional (ABIPLA, 2019). Isso ocorreu devido as “incertezas” econômicas e políticas que caracterizaram o ano de 2018, além de eventos pontuais como a greve dos caminhoneiros que paralisaram o Brasil por duas semanas, ocasionando prejuízos na perspectiva otimista do ano seguinte.

Os setores que mantiveram vendas positivas em 2018, segundo dados da Nielsen reportados por ABIPLA (2019), foram: água sanitária (2,60%), sabão em pó (0,23%), amaciantes (2,74%) e esponjas (14,10%). As demais categorias pesquisadas ficaram com vendas menores que o ano anterior, são elas: detergente para lavar louça, sabão em barra, desinfetantes, limpadores para banheiros, multiusos e inseticidas.

Além disso, atualmente o objetivo de todas as empresas é a busca constante por aumento na participação de mercado. Porém, para que seja possível a obtenção de vantagem competitiva frente ao mercado, de acordo com a ABIPLA (2019), a empresa deve sanar deficiências internas que a impedem de oferecer serviços com padrões desejados pelo mercado, embalagens mais sustentáveis (redução e/ou reciclagem de plástico pós-consumo), *e-commerce*, bem como buscar a minimização dos custos e desperdícios. Somado a isso, o quesito sustentabilidade, trazendo compactação e concentração de produtos, novas tecnologias com melhores aditivos

que gastem menos água e diminuam as embalagens, reduzindo a emissão de CO₂ durante o transporte, o que garanta benefícios para o meio-ambiente e para o consumidor.

3.2 ÁGUA SANITÁRIA

A água sanitária está muito presente no nosso cotidiano, seja em residências ou empresas, por sua praticidade, baixo preço, facilidade de uso e principalmente seu poder bactericida, sendo destinada sua aplicação na limpeza de banheiros, pias e utensílios da cozinha, na desinfecção de frutas, hortaliças e legumes. É uma solução aquosa a base do hipoclorito de sódio ou cálcio (PORTAL TRATAMENTO DE..., 2017). e sua principal característica é ser, apesar da diluição, um poderoso bactericida (devido à presença do cloro), com intervalo de teor de cloro ativo entre 2,0 a 2,5% p/p (peso por peso) para fins de registro. Em quantidade inferior a estabelecida pela legislação a ação da água sanitária não é eficiente.

De acordo com Brasil (2016), a água sanitária pode conter apenas os seguintes componentes complementares:

- a) Hidróxido de sódio ou de cálcio;
- b) Cloreto de sódio ou de cálcio; e
- c) Carbonato de sódio ou de cálcio.

É proibido a adição de corantes, fragrâncias, sequestrantes, tensoativos ou quaisquer outras substâncias. A água sanitária deve possuir coloração levemente amarelada, sendo consideravelmente fotossensível, devido a sua capacidade de se decompor sob a ação da luz, por isso a necessidade de uma embalagem opaca. É corrosiva a metais e seu contato com ácidos libera gases tóxicos (FOGAÇA, 2015). Também pode ser definida como composto químico destinado à limpeza, branqueamento e desinfecção em geral de superfícies e tecidos, eliminando germes e bactérias, evitando o aparecimento de doenças causadas pela falta de limpeza nos ambientes, como casas e hospitais, e cujo princípio ativo é o hipoclorito de sódio (SOUZA, 2017).

3.2.1 Requisitos para o registro da água sanitária

De acordo com a Resolução - RDC nº110/2016, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, os requisitos mínimos para o registro da água sanitária são:

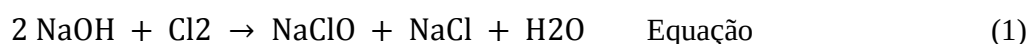
- O teor mínimo de cloro ativo deve ser de 2,0% p/p e máximo de 2,5% p/p durante o prazo de validade do produto;
- No caso de indicação do produto para desinfecção de hortifrútícolas e de água para consumo humano, deve ser comprovada eficácia frente aos microrganismos *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli* no tempo de contato e diluição propostos em rótulo;
- Os produtos com pH medido na forma pura, superior a 11,5 (onze vírgula cinco), e com indicação de prazo de validade de até 6 (seis) meses, são dispensados de apresentação de ensaio de estabilidade e o pH máximo do produto puro deve ser de 13,5 (treze vírgula cinco);
- Se a diluição de uso indicada em rótulo, para desinfecção de ambientes, superfícies e objetos inanimados for superior a 0,3% (zero vírgula três por cento) p/p (peso por peso) e por um tempo de contato de, no mínimo, 10 (dez) minutos, a realização dos ensaios de eficácia frente aos microrganismos *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* é opcional;
- Proibida a adição de corantes, fragrâncias, sequestrantes, tensoativos ou quaisquer outras substâncias. (BRASIL, 2016).

3.2.2 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio, principal e mais importante componente da água sanitária, é definido como uma solução aquosa, alcalina, de coloração amarela, límpida e de odor característico. Possui propriedade germicida, o que permite sua utilização em processos de desinfecção, esterilização e desodorização de águas, branqueamento de celulose, limpeza de roupas, lavagem de frutas e legumes (ABICLOR, 2019).

É um composto químico bastante instável, dependendo de alguns fatores como, por exemplo, temperatura, concentração inicial, exposição à luz, etc. Estes que podem contribuir para sua decomposição, tendo como consequência a diminuição do teor de cloro ativo, ou hipoclorito (SOUZA, 2017). Este composto é um sal inorgânico de fórmula NaClO , de massa molar 74,44 g/mol, densidade 1,07 - 1,14 g/cm³ (produto líquido), ponto de fusão 18°C e ponto de ebulição 101°C. Tem como aparência um sólido branco e é totalmente miscível em água (MANUAL, 2017).

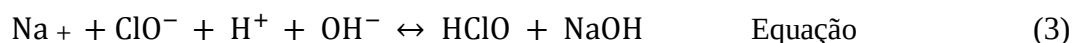
O hipoclorito de sódio é obtido através do borbulhamento do gás cloro em solução concentrada de hidróxido de sódio, conforme a Equação 1 (SILVA, 2011).



O hipoclorito de sódio, como todos os hipocloritos, segundo Resende (2009), é um sal derivado do ácido hipocloroso (HClO), que em água dissocia-se em íons Na^+ e ClO^- , no mesmo tempo que uma porção substancial hidroliza-se em ácido hipocloroso, conforme Equação 2. Esse ácido tem alto poder oxidante, assim como o ânion hipoclorito, e é o responsável pelo efeito alvejante.



Ou



A carga negativa do ânion hipoclorito (ClO^-) impede que ele se difunda através da parede celular dos microrganismos, o que faz do ânion um desinfetante fraco. Porém, o ácido hipocloroso também presente em equilíbrio com o ânion hipoclorito, devido à carga neutra e ao pequeno tamanho, difunde-se facilmente pela parede celular (RESENDE, 2009).

O hipoclorito de sódio quando reage com os microrganismos, ele tem a capacidade de atacar às proteínas das células causando a agregação, levando a morte a célula do microrganismo, ou ele pode fazer com que a membrana das células do microrganismo sofra rupturas (TEIXEIRA, 2011).

A ação bactericida ocorre devido ao hipoclorito de sódio, pois quando se utiliza água sanitária em um meio ela tem a capacidade de eliminar com enorme eficiência os microrganismos presente (ANHEMBI, 2014).

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As bactérias estão presentes nos mais variados ambientes, incluindo o ar, a água e alimentos. Muitas dessas bactérias relativamente não são virulentas, mas outras são capazes de causar diversas doenças. A contaminação por microrganismos patogênicos pode estar relacionada com o contato com superfícies inanimadas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Os microrganismos patogênicos podem ser bactérias, vírus, protozoários e helmintos, e sua transmissão pode acontecer de diferentes formas (GONÇALVES, 2003).

As bactérias do grupo *Escherichia coli* são bastonetes gram-negativos, divididas em patógenas e saprófitas, sendo estas últimas inofensivas e não causadoras de doenças. As principais doenças causadas por estas cepas são as relacionadas a infecções do trato urinário e rins nos animais, e diarreias agudas nos seres humanos de países em desenvolvimento (GONÇALVES, 2003).

O *Staphylococcus aureus* é um dos mais frequentes patógenos de origem alimentar encontrado em plantas de processamento de alimentos, podendo aderir-se na superfície de equipamentos e formar biofilme (PASTORIZA et al., 2002). Se enquadra no grupo de bactérias, cocos gram-positivo, que faz parte da microbiota humana, contudo podem provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como

pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras (SANTOS, 2007).

Na prevenção de contaminações com esses microrganismos, são utilizados procedimento de higienização, compostos por uma etapa de limpeza e outra de desinfecção, em que a primeira se refere a remoção de sujidades, e a segunda a ação direta contra os microrganismos. Na desinfecção, por meio de controle químico, podem ser utilizados produtos saneantes. Estes podem ser halogênios e derivados, em que o cloro está inserido.

Segundo Rego e Faro (1999) e Germano e Germano (2003) (apud MENEGARO, 2016), a ação sanitizante do cloro se dá com a destruição da cápsula bacteriana de proteção e oxidação do protoplasma celular, além da formação de cloraminas tóxicas que alteram a permeabilidade celular e impedem a regeneração enzimática.

Conforme Both (2009), o cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, tem sido o composto químico mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica da água, ambientes, utensílios e dos alimentos, tendo em vista seu baixo custo e sua maior facilidade de acesso. No entanto, a experiência com resistência a antibióticos e biocidas indica que não há agente químico antimicrobiano que não possa, eventualmente, selecionar ou induzir resistência nos microrganismos. Especificamente frente ao hipoclorito, existem evidências de que vários microrganismos apresentam diferentes graus de resistência a esse antimicrobiano, tendo em vista que não elimina esporos bacterianos, bacilo da tuberculose ou vírus não-lipídicos em tempo aceitável.

Contudo, é válido salientar que a avaliação da eficácia dos sanitizantes, em geral, não é algo simples, pois pode ser afetada por vários fatores, tais como a concentração de microrganismos, tipo de microbiota, tempo de contato na superfície e a concentração dos resíduos presentes (BOTH, 2009).

3.3.1 Métodos para Determinação da Atividade Antimicrobiana

Para a comprovação da eficácia dos saneantes, as RDCs nº 14/2007 e 35/2010 preconizam que os produtos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana somente serão registrados e autorizados para uso mediante a comprovação de sua eficácia aos fins propostos (PINHEIRO, 2012). O que é verificado por meio de análises do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ministério da Saúde, ou em laboratórios oficiais credenciados especificamente para este fim, obedecidos os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ou métodos adotados pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN). Para determinação da atividade antimicrobiana da água sanitária o método mais utilizado é o método adotado pelo CEN.

O Método da Diluição de Uso (DU) baseia-se na utilização de cilindros de aço inox impregnados com microrganismos de referência. Esses cilindros são expostos ao desinfetante a ser testado, de acordo com a diluição e o tempo de contato recomendados pelo próprio fabricante, respeitada a legislação vigente e a classificação do produto. Posteriormente, os cilindros são transferidos para meios de cultura para verificação de possíveis microrganismos sobreviventes. Após a incubação, é avaliado o crescimento microbiano nas subculturas através da turvação desses meios. Para ser aprovado, o produto deve eliminar os microrganismos em 59 dos 60 cilindros utilizados em cada teste (TOMASINO, 2007; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009 apud PINHEIRO, 2012).

O método adotado pelo CEN para a avaliação da atividade antimicrobiana de saneantes, é dividido em duas fases. A fase 1 (teste em suspensão) utilizada principalmente pelas próprias indústrias produtoras para ajuste da concentração do princípio ativo e maior conhecimento da eficácia e características do produto. Já a fase 2, é composta por duas etapas. Na etapa 1 simula a matéria orgânica encontrada nas superfícies do ambiente, com o objetivo de se aproximar da realidade do processo de desinfecção. A etapa 2 é um teste em superfície, com a utilização dos discos de aço inox, com o objetivo de avaliar o comportamento e eficácia do produto em uma superfície semelhante àquela onde poderá ser utilizado. Segundo a norma do CEN, para uma análise oficial de avaliação da atividade antimicrobiana são necessárias apenas a fase 2, etapa 1 e 2 (EUROPEAN STANDARD 14885, 2006 apud PINHEIRO, 2012).

No mundo globalizado de hoje, com a circulação de produtos cada vez mais frequente entre os diferentes países e o lançamento de novos com alta tecnologia, a dinâmica da avaliação da eficácia desses produtos deve ser sempre aprimorada. O que após a publicação da RDC nº 14/2007 pela Anvisa, é permitida a utilização de novas metodologias para a avaliação da

atividade antimicrobiana de produtos desinfetantes (PINHEIRO, 2012). Dessa forma, outro método com essa finalidade é o método disco-difusão, ou ainda, método *in vitro* que avalia a capacidade de um dado microrganismo multiplicar-se na presença de um antimicrobiano, aplicado no interior de um cilindro ou disco sobre uma camada de ágar, ou de um orifício padronizado no ágar em uma placa de Petri. O antimicrobiano se difunde no ágar e o microrganismo cresce a partir do ponto de aplicação, formando um halo de inibição ao seu redor. Esse halo é determinado em milímetros, com o auxílio de um paquímetro (ESMERINO et al., 2005). A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos (OSTROSKY et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Industrial, do Departamento de Engenharia Química/Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba/UFPB.

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 10 marcas (1 embalagem/marca) de água sanitária comercializadas na cidade de João Pessoa/PB, levando em consideração as líderes de mercado e outras de menor participação, fabricadas por empresas menores. Cada marca coletada foi analisada, em triplicata, a fim de determinar o teor de cloro ativo, o pH e a atividade antimicrobiana.

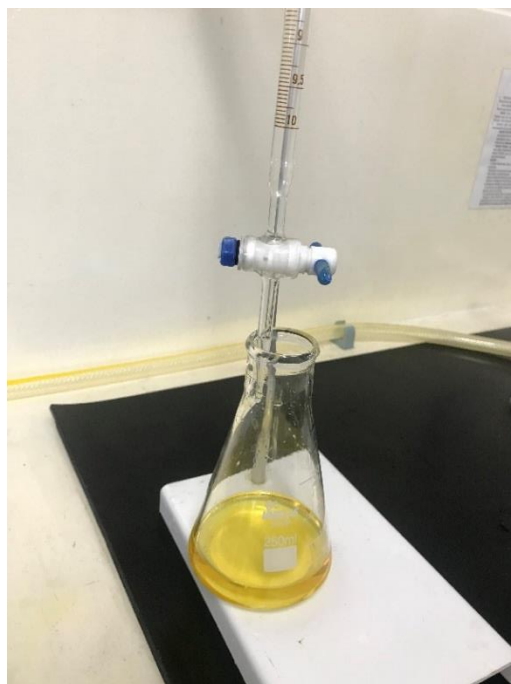
4.2 DETERMINAÇÃO DO CLORO ATIVO

Para a realização das análises de determinação do teor de cloro ativo foi utilizado o método proposto pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) na Norma Brasileira de Referência (NBR) nº 9425/2005, “Hipoclorito de Sódio: determinação de cloro ativo por método Volumétrico”, segundo os critérios descrito por Caboclo (UNIPAR, 2013 adaptado).

- Na execução da metodologia, tanto para validação quanto para a quantificação do teor de hipoclorito nas amostras coletadas, foram usados os seguintes reagentes e soluções: iodeto de potássio - KI, para análise (PA), procedência Merck, solução a 10% m/v;
- Ácido acético concentrado, PA, procedência Dinâmica;
- Tiosulfato de sódio - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solução 0,1 N, PA, padronizado, procedência Dinâmica;
- Iodato de Potássio - KIO_3 , 10 % PA, procedência Dinâmica e;
- Amido solúvel, procedência Dinâmica, solução 0,5% m/v.
- Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

Foram utilizadas as seguintes vidrarias: pipetas volumétricas de 5 e 10 mL, erlenmeyers de 250 mL, bureta graduada de 25 mL, balão volumétrico de 100 mL e proveta graduada de 100 mL.

Figura 5- Pausa da titulação



Fonte: A Autora.

Após a obtenção desta coloração, foi adicionado ao conteúdo do erlemmeyer, 5 gotas do indicador amido 0,5 %, uma vez que o amido não pode ser adicionado no início da titulação, pois o iodo tem elevada concentração, o que faria o amido se decompor irreversivelmente. Dessa forma, deu-se então continuidade à titulação com tiosulfato de sódio até o ponto final da titulação, indicada pela mudança da coloração amarelo para incolor.

Figura 6 - Fim da titulação com mudança da coloração amarelo para incolor



Fonte: A Autora.

O volume gasto de tiosulfato, em mL (V_G), foi registrado para posterior aplicação do cálculo que expressa o teor de hipoclorito na amostra, já que a fórmula utilizada faz as conversões de unidades e compensa a diluição.

4.2.1 Cálculo

O teor de cloro ativo das amostras de água sanitária foi calculado de acordo com a NBR 9425 – ABNT - Determinação de Cloro Ativo por método volumétrico – 2005 (Adaptado), utilizando a Equação 4.

$$\text{NaClO (\%)} = \frac{V_G \times N_R \times 3,722}{M_A} \times \frac{100}{10} \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

V_G = volume gasto de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a 0,1N, em mL

N_R = normalidade real do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1N

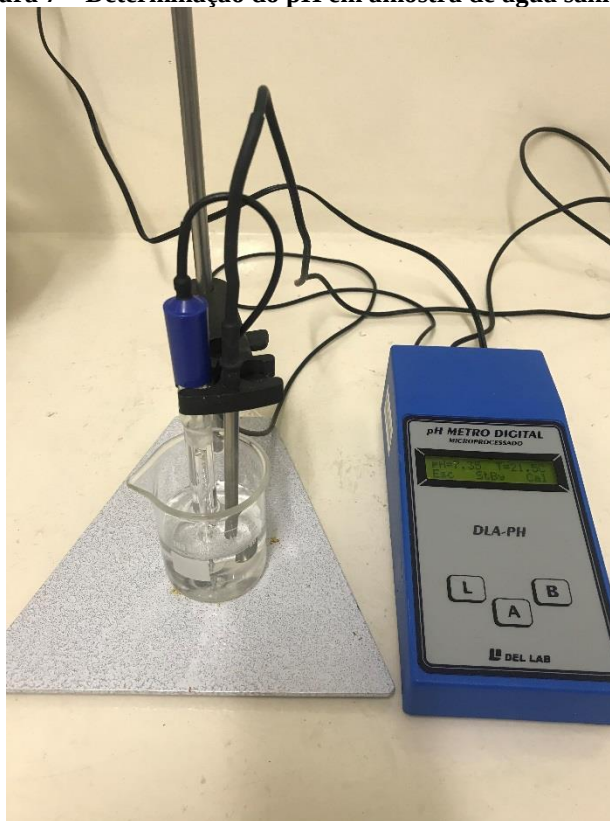
M_A = massa da amostra, em g.

4.3 DETERMINAÇÃO DO pH

O procedimento para a determinação do pH das amostras foi realizado com um pHmetro da marca Del Lab, modelo DLA-PH (Figura 7). Inicialmente, o equipamento foi calibrado com as soluções tampões pH 4,00 e pH 7,00, seguindo as orientações do manual do fabricante.

O eletrodo do pHmetro foi imerso na amostra, contida em um béquer, em uma quantidade suficiente para cobri-lo e anotada a leitura do valor visualizada no leitor do equipamento. A leitura foi feita em triplicata e para cada nova leitura, o eletrodo era lavado com água destilada e seco com papel absorvente apropriado.

Figura 7 – Determinação do pH em amostra de água sanitária



Fonte: A Autora.

4.4 ESTUDO DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foi realizado o estudo do método de disco-difusão para determinar a atividade antimicrobiana das amostras de água sanitária coletadas de acordo com a metodologia Kirby-Bauer (apud CEFAR, 2019) adaptada. Esse método, além de ser prático, idealizado para bactérias de crescimento rápido é também qualitativo, permitindo somente uma ideia de presença e ausência de substâncias com atividade microbiana (CABRAL, 2008).

4.4.1 Cultura microbiana e preparo do inóculo

Para os testes foram utilizadas cepas de microrganismos de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Escherichia coli* ATCC 10536.

As cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Nutriente com o objetivo de se obter colônias isoladas. Em seguida, para cada microrganismo, foram selecionadas três colônias isoladas. A superfície de cada uma dessas colônias foi tocada com uma alça de níquel-

cromo, previamente flambada, e os microrganismos transferidos para um tubo contendo 4 mL de água peptonada 0,1%. Foi preparado um tubo para cada microrganismo estudado.

O tubo foi pré-incubado a 35 °C, temperatura ótima de crescimento para as cepas utilizadas, até o tempo necessário para alcançar uma turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), ou seja, até ter atingido a concentração desejada. A solução padrão foi usada para padronizar a densidade do inoculo para o teste.

Para o preparo de 10 mL da solução padrão de McFarland 0,5 utilizou-se uma solução 1% (volume/volume) de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e uma solução de 1% (peso/volume) de cloreto de bário (BaCl_2). Posteriormente, foi misturado 0,05 mL da solução de cloreto de bário com 9,95 mL da solução de ácido sulfúrico e feita a homogeneização constante para manter a suspensão (SILVA *et al.*, 2010).

A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro da marca Bel Photonics (modelo SP1102) para determinar a absorbância, com comprimento de onda de 625 nm. A confirmação da solução padrão e da concentração do inóculo alcançou D.O. (Densidade ótica) de 0,08 resultando numa suspensão de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

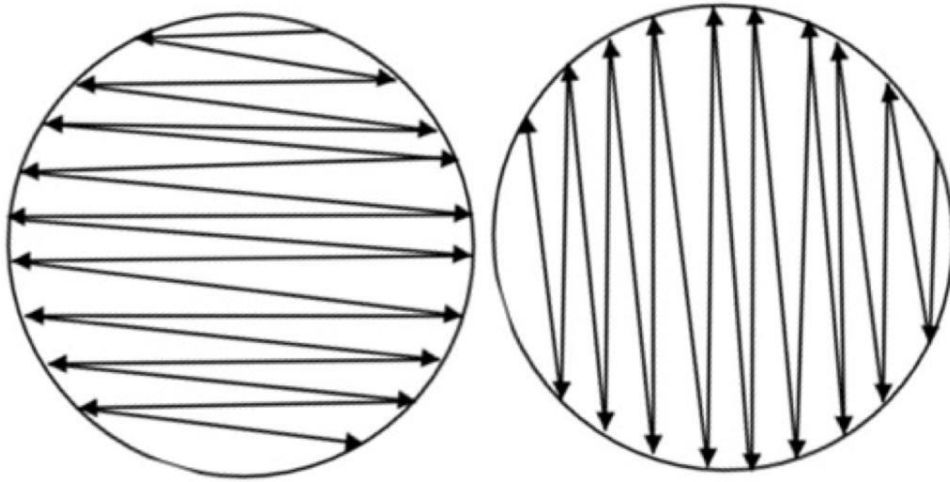
4.4.2 Preparo do meio de cultura

Foi utilizado o Ágar Nutriente preparado conforme as instruções do fabricante. Após a esterilização em autoclave à 121 °C por 15 minutos, o meio foi resfriado em temperatura ambiente e distribuído em placas de Petri descartáveis, sob a chama do bico de Bunsen, com aproximadamente 20 mL de ágar por placa.

4.4.3 Inoculação da Placa

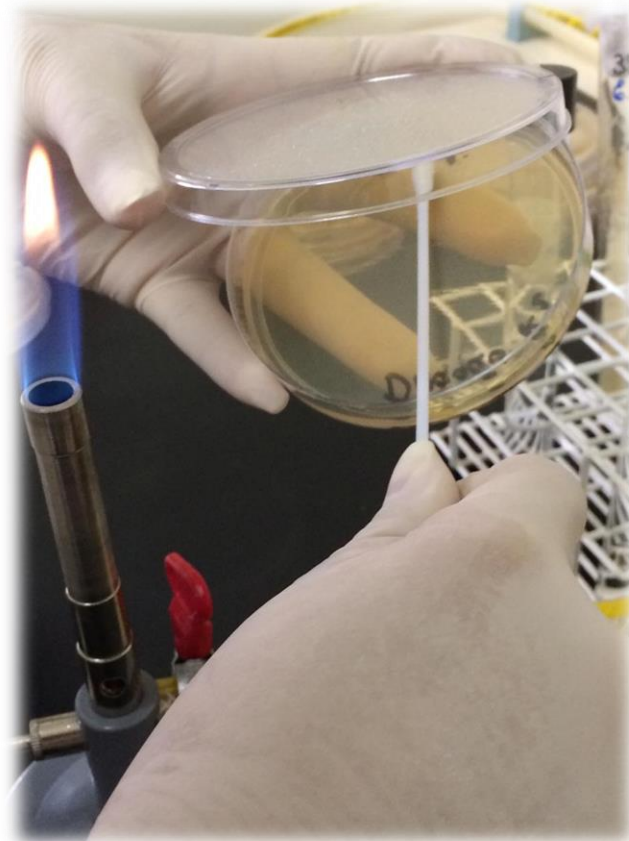
Com auxílio de um *swab* estéril, emergido na suspensão bacteriana, retirado o excesso de inoculo por meio da compressão do *swab* nas paredes do tubo, foi feito estrias uniformemente e grudadas nos sentidos horizontal e vertical, como pode ser observado nas Figura 8 e 9, nas placas contendo Ágar Nutriente.

Figura 8 - Ilustração do movimento horizontal e vertical para fazer as estrias na placa, com auxílio do swab



Fonte: A Autora.

Figura 9- Realização de estrias na placa de Petri descartável com auxílio do Swab

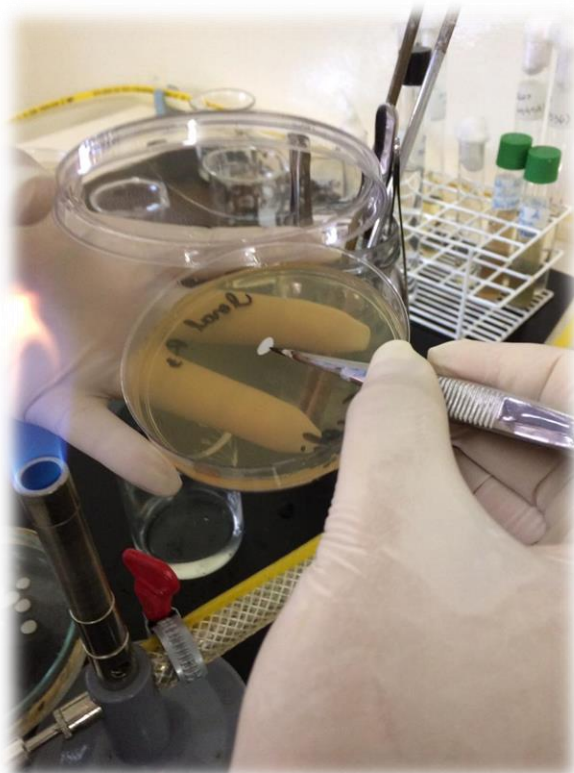


Fonte: A Autora.

4.4.4 Aplicação dos discos por difusão

Após a inoculação do microrganismo, com auxílio de uma pinça flambada, foi inserido um disco de papel esterilizado, impregnado com a amostra de água sanitária estudada. O disco foi depositado no centro da placa de Petri conforme a Figura 10.

Figura 10 - Aplicação do disco de papel



Fonte: A Autora.

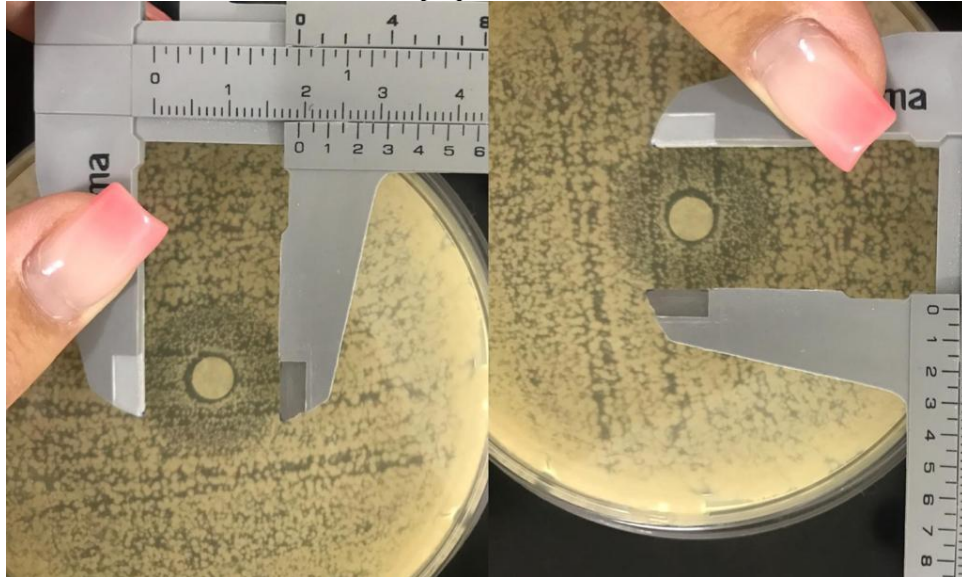
Os testes foram feitos com as amostras na forma concentrada e, apresentando inibição, foi feito o teste com a diluição recomendada para desinfecção de frutas e hortaliças. É importante ressaltar que nas instruções de uso, contidas nos rótulos de cada amostra, para desinfecção de frutas e hortaliças, de modo diluído, variavam de acordo com cada fabricante.

4.4.5 Incubação das Placas e medida dos halos

Após 30 minutos sob a bancada em temperatura ambiente, as placas de Petri foram incubadas na condição ótima de tempo e temperatura (35 °C/24 horas) para as cepas estudadas.

Para leitura do teste foi observada a ausência ou a presença da formação de um halo de inibição, após incubação, através da medida do halo de inibição, obtida com auxílio de um paquímetro, conforme a Figura 11.

Figura 11 - Medição do halo na posição horizontal e vertical respectivamente, com auxílio de um paquímetro



Fonte: A autora.

Os cálculos foram obtidos por meio da Equação 5.

$$\frac{(L1-l1)+(L2-l2)}{2} \quad \text{Equação} \quad (5)$$

Em que:

L1 e L2 correspondem ao diâmetro na horizontal e vertical sob o halo formado em volta do disco;

l1 e l2 são os diâmetros horizontal e vertical do disco, com valor fixo de 5,5 mm.

4.4.6 Teste de Controle Positivo e Negativo

Para realização do Teste de Controle Negativo e Positivo, seguiu os passos 4.4.1 até o 4.4.3 deste trabalho, diferenciando apenas o 4.4.4, na qual para o teste do controle negativo foi realizado com disco de papel umedecido em água destilada e esterilizada, de acordo com a NCCLS (2000).

O Controle Positivo foi preparado com disco contendo antibiótico, respeitando a sensibilidade da cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Escherichia coli* ATCC 10536.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO TEOR DE HIPOCLORITO DE SÓDIO

Os resultados do teor de hipoclorito de sódio em cada amostra são mostrados na Tabela 1.

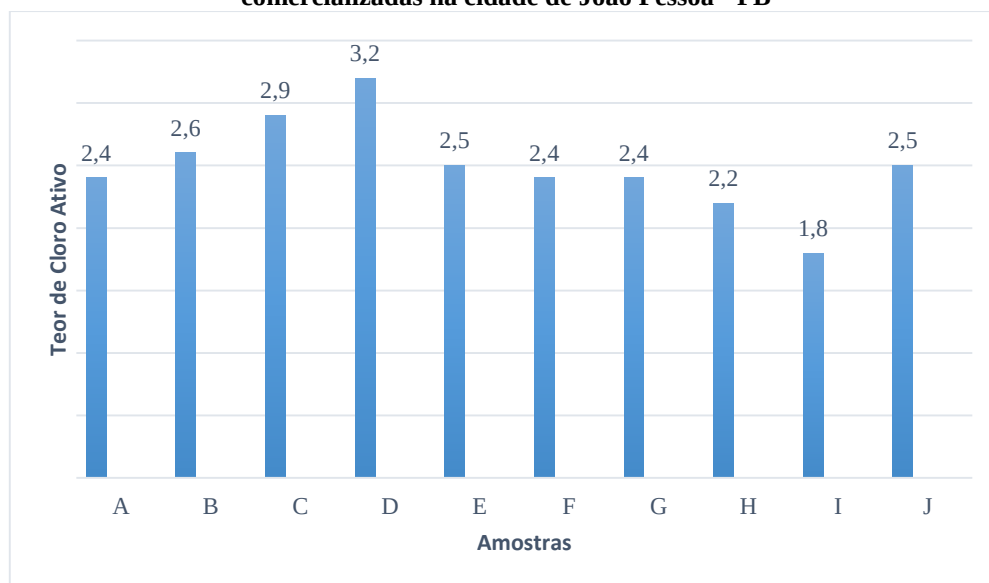
Tabela 1 - Resultados do teor de cloro ativo em águas sanitárias comercializadas na cidade de João Pessoa/PB

Amostra	Valores médios do teor de hipoclorito de sódio (% p/p)	Desvio padrão
A	2,4	0,071
B	2,6	0,018
C	2,9	0,184
D	3,2	0,105
E	2,5	0,085
F	2,4	0,115
G	2,4	0,085
H	2,2	0,158
I	1,8	0,070
J	2,5	0,047
ANVISA	2,0 – 2,5	-

Fonte: A autora.

Para melhor verificação dos dados obtidos, dispôs-se os dados em gráfico, conforme gráfico 1.

Gráfico 1 - Resultados do teor de cloro ativo presente nas amostras de água sanitária comercializadas na cidade de João Pessoa - PB



Fonte: A autora.

A Tabela 1 mostra a média da triplicata dos resultados para o valor do teor de cloro ativo das amostras analisadas, melhor visualizado no Gráfico 1. Os resultados são variáveis, sendo que o menor teor de cloro ativo foi obtido para a amostra I, com 1,8% e o maior teor de cloro ativo foi obtido para a marca D, com 3,2%.

Das 10 amostras analisadas, apenas seis (60%) marcas comerciais apresentaram teor de cloro ativo de acordo com os limites estabelecidos pela legislação da ANVISA (faixa de 2,0 a 2,5% p/p para o teor de cloro ativo). Outras quatro (40%) amostras não estavam em conformidade, visto que as marcas, C, D e E apresentam teor de cloro ativo superior ao definido pela legislação, assim como a marca I, com valor inferior ao recomendado. Esta não conformidade poderá trazer prejuízo ao consumidor que utilizar o produto, já que o mesmo não irá cumprir sua função desinfetante de maneira satisfatória (BRASIL, 2016).

É válido salientar que a água sanitária tem efeito desinfetante devido a presença do cloro ativo em sua formulação. Conforme Both (2009), o cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, é o composto químico responsável por garantir a qualidade microbiológica, que é exatamente o efeito que interessa ao usuário.

5.2 DETERMINAÇÃO DO pH

Os resultados obtidos nos ensaios para a leitura do parâmetro pH para as dez marcas de águas sanitárias podem ser conferidos na Tabela 2.

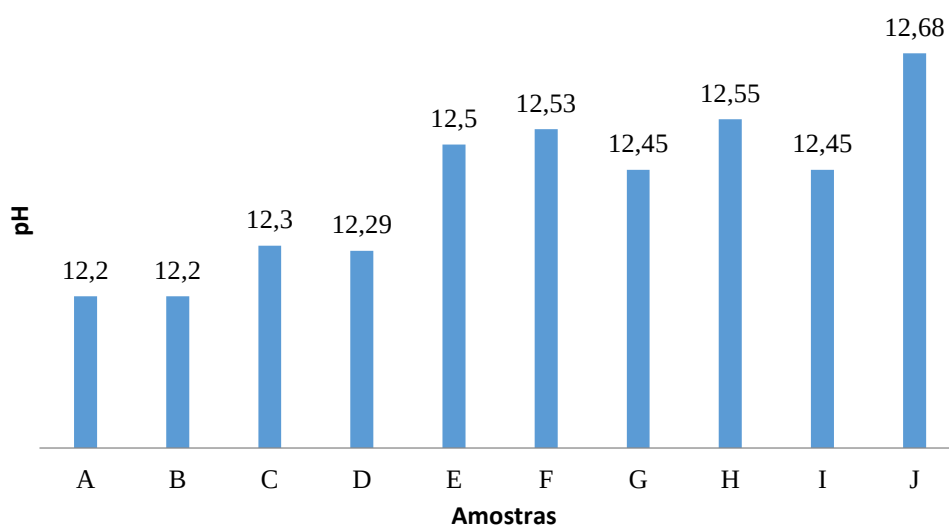
Tabela 2 - Resultados médios de pH de águas sanitárias comercializadas regularmente na Cidade de João Pessoa/PB

Amostra	Valores médios de pH	Desvio Padrão
A	12,20	2,175E-15
B	12,20	2,175E-15
C	12,30	2,175E-15
D	12,29	0,0115
E	12,50	0,0152
F	12,53	0,0057
G	12,45	0,0115
H	12,55	0,01
I	12,45	0,0152
J	12,68	0,0173
ANVISA	11,5 - 13,5	-

Fonte: A autora.

A Tabela 2 mostra as médias do potencial hidrogeniônico para as amostras de água sanitária comercializadas regularmente na Cidade de João Pessoa - PB. Com intuito de melhor visualizar esses valores, de modo mais claro e organizado, foi construído um gráfico para ilustrar o valor médio de pH de cada amostra.

Gráfico 2 - Valores médios de pH para cada amostra de Águas Sanitárias comercializadas regularmente na Cidade de João Pessoa/PB



Fonte: A autora.

Por meio da Tabela 2 e do Gráfico 2, observa-se que os resultados de pH das amostras analisadas estão em Conformidade os parâmetros da RDC nº110/2016, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que estabelece que as águas sanitárias comercializadas no território nacional, em sua forma pura, devem possuir um pH mínimo de 11,5 e máximo de 13,5. Ainda se nota uma diferença muito pequena entre os resultados encontrados, sendo que a marca J possui o maior valor de pH com 12,68 e as marcas A e B os menores valores, com 12,20 (BRASIL, 2016).

A avaliação do pH das soluções é tão importante quanto a determinação do cloro ativo, tendo em vista que a solução de hipoclorito de sódio deve oferecer um pH alcalino para uma maior estabilidade e perda mais lenta do cloro. Silva Júnior (2009 apud Silva, 2011) afirma que as soluções de hipoclorito de sódio apresentam pH alcalino devido à natureza do hipoclorito de sódio e a adição de alcalinizantes no processo de industrialização, com o intuito de prolongar o tempo de validade, uma vez que à medida que acontece redução do pH da solução, transcorre um aumento na instabilidade da mesma, ocasionando a sua decomposição e, consequentemente, uma aceleração na perda de cloro, diminuindo com isso, a vida útil do produto.

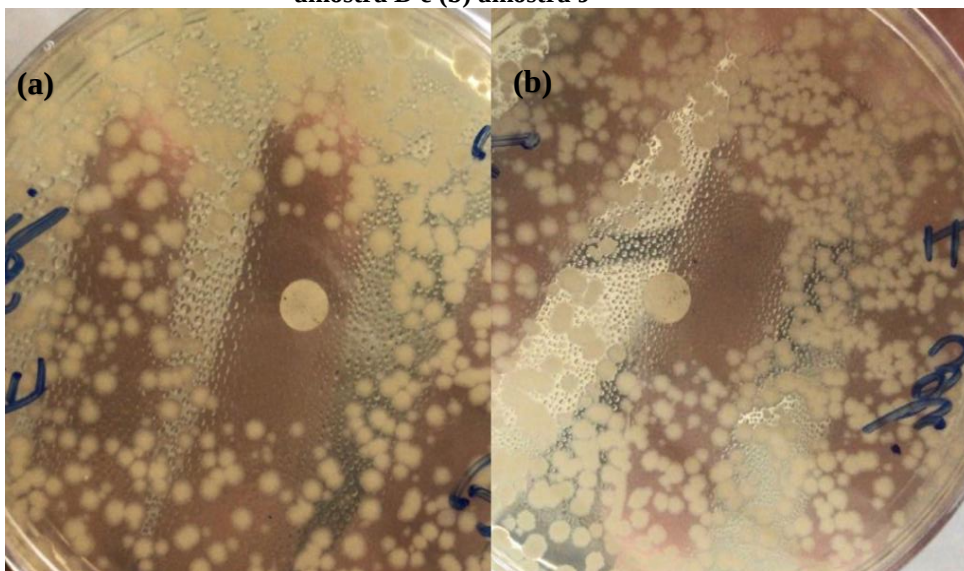
5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O meio de cultura, recomendado para análise da atividade antimicrobiana é o Ágar Mueller Hinton não suplementado, devido a fonte de proteínas e carboidratos nele presente, contudo para as análises desse trabalho, foi usado o Ágar Nutriente que em sua composição envolve a presença de extrato de carne e peptona sendo fonte de nitrogênio, vitaminas, minerais e aminoácidos, o extrato de levedura rico em vitamina B e essencial para o crescimento bacteriano, cloreto de sódio para manter o balanço osmótico e o Ágar bacteriológico como agente solidificante. Este meio vem sendo utilizado no Laboratório de Microbiologia Industrial para esse mesmo procedimento, mostrando resultados satisfatórios.

A segunda adaptação a metodologia foi correspondente a incubação das placas na qual sugere que sejam incubadas invertidas quando são realizados testes com bactérias, contudo, nas primeiras amostras analisadas, havia um deslocamento do disco de papel, para a extremidade da placa e muitas vezes o disco caía sobre a tampa. A característica viscosa e lubrificante do próprio hipoclorito de sódio ocasionou tal fato, com isso, as placas passaram a ser incubadas com a tampa para cima. Com essa modificação, o processo de incubação exigiu mais cuidado para que não ocorresse a formação de condensado sob a tampa da placa e ocasionasse erros na leitura dos resultados.

A leitura dos resultados foi feita nas primeiras 12 horas de incubação e ao término com 24 horas, sendo possível observar que na maioria das amostras entre 12 e 15 horas de incubação, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, o halo de inibição já havia sido formado, como mostra a Figura 12, porém o crescimento bacteriano ainda era reduzido.

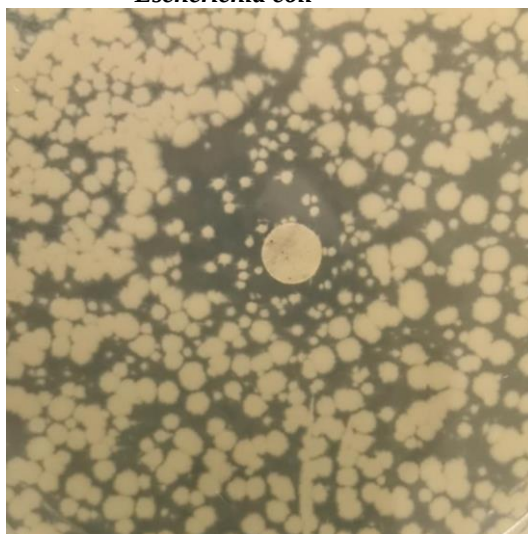
Figura 12 – Halos de inibição referentes a 12 horas de incubação com *Escherichia coli* para: (a) amostra D e (b) amostra J



Fonte: A autora

Após 24 horas de incubação, como recomendado na metodologia e que assegura o crescimento bacteriano, o halo de inibição que fora formado até às 12 horas de incubação não se manteve, havendo o aparecimento reduzido de colônias de bactérias sobre inibição anteriormente observada, o que foi denominado de halo de redução e pode ser observado na Figura 13. Este foi medido com o auxílio de um paquímetro e o valor considerado foi a média dos halos em triplicata, como pode ser observado na Tabela 3.

Figura 13 – Halos de redução referentes a 24 horas de incubação para a amostra J com *Escherichia coli*



Fonte: A autora

Tabela 3 - Média da triplicata dos halos de redução das amostras de água sanitária inoculadas com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Amostra	Médias halos de redução (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536
A	21,7	12,2
B	15,7	17,5
C	20,5	20,2
D	19,7	27,2
E	13,0	19,0
F	0	19,2
G	16,2	19,7
H	26,7	17,7
I	0	0
J	19,0	21,2

Fonte: A autora

A Tabela 3, mostra que a amostra H apresentou um halo de 26,7 mm, correspondente ao maior valor para *Staphylococcus aureus* e a amostra D, com halo de 27,2 mm para *Escherichia coli*. Para a amostra I não houve redução para nenhuma das bactérias testadas, assim também a amostra F apresentou redução apenas para uma das bactérias analisadas, a *Escherichia coli* com 19,2 mm de halo.

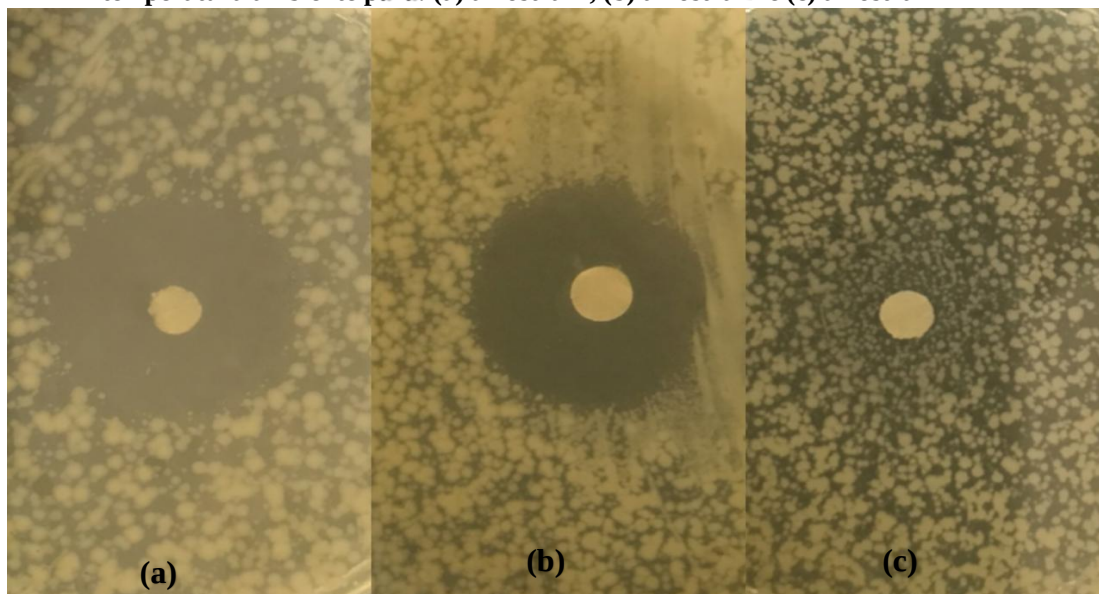
O fato da amostra I não ter apresentado redução frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* está diretamente ligado ao teor de cloro ativo nela presente, uma vez que é este parâmetro o responsável pela ação bactericida (Both, 2009).

O hipoclorito de sódio, sob forma de água sanitária, apesar de ter ampla utilização e baixo custo, apresenta a desvantagem de ser muito instável, aspecto considerado crítico para assegurar a eficácia na desinfecção (BORIN, 2007). Foi possível perceber que, as marcas que possuíam teor de cloro acima de 2,0% apresentaram controle sobre os microrganismos testados. Porém, foi possível verificar também que, quanto mais tempo a placa permanecia incubada a 35°C, o saneante em estudo parecia perder seu poder desinfetante. Supõe-se que tal fato ocorreu porque o cloro ativo é volátil e acaba perdendo seu efeito bactericida, uma vez que a temperatura exerce influência marcante na velocidade das reações químicas, nas atividades metabólicas dos organismos e na solubilidade da substância (SOUZA, 2017). As células que não foram inativadas até aproximadamente as 12 horas de incubação, cresceram, resultando apenas em uma redução da população microbiana próximo ao disco.

A fim de se confirmar a influência a temperatura/tempo, foram escolhidas três amostras, duas com resultados significativos de redução para *Staphylococcus aureus* (amostras A e D) e uma que não promoveu redução para nenhuma das bactérias testadas (amostra I), quando incubadas a 35°C. Estas foram inoculadas com cepas de *Staphylococcus aureus* e mantidas por 24 horas em temperatura ambiente.

O resultado, pode ser observado na Figura 14, com a formação do halo de inibição nas amostras A e D, respectivamente, já a amostra I manteve-se sem formação de halo inibição, mais houve uma pequena redução próxima ao disco. Observa-se também que a temperatura por não ser a ideal para o crescimento da bactéria inoculada, acarretou em um baixo crescimento microbiano para as amostras A, D e I.

Figura 14 - Resultados das placas inoculadas com *Staphylococcus aureus* e mantidas por 24 horas em temperatura ambiente para: (a) amostra A, (b) amostra D e (c) amostra I



Fonte: A autora

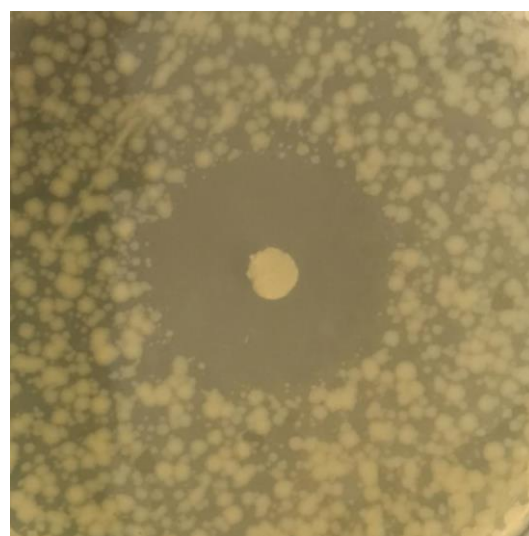
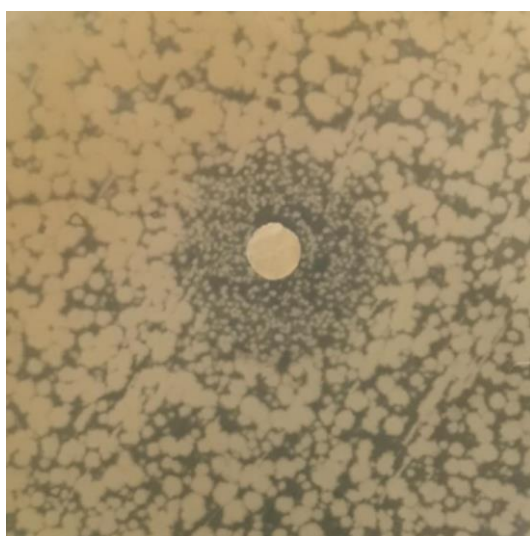
A Figura 15, mostra a comparação da mesma amostra, sob as mesmas condições de concentração microbiana, contudo as placas da esquerda foram submetidas a incubação a 35°C e as da direita deixadas em temperatura ambiente (+/- 28°C), ambas com 24 horas.

Figura 15 – Comparação das placas incubadas a 35°C e em temperatura ambiente com *Staphylococcus aureus* para: (a) amostra A, (b) amostra D e (c) amostra I

(a)

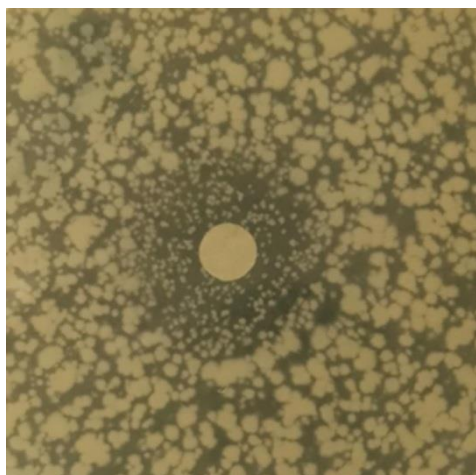
Incubada a 35°C

Mantida em temperatura ambiente

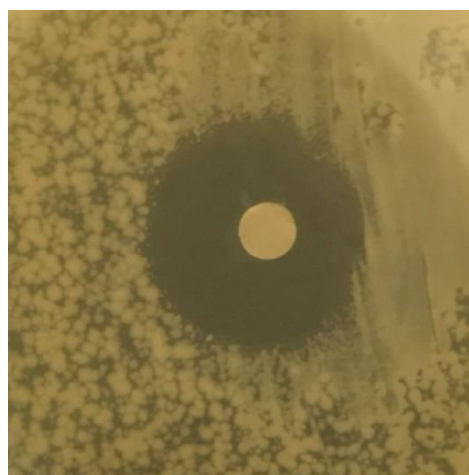


(b)

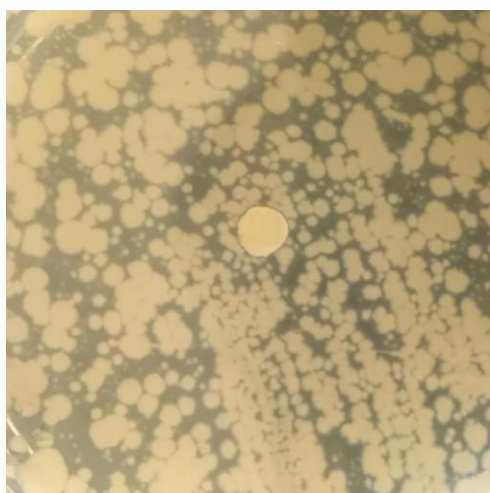
Incubada a 35°C



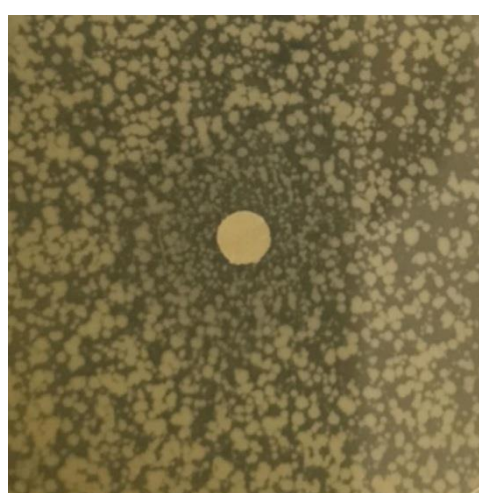
Mantida em temperatura ambiente

**(c)**

Incubada a 35°C



Mantida em temperatura ambiente



Fonte: A autora.

Diante disso, as amostras inoculadas com *S. aureus*, incubadas a 35°C, e que mostraram halo de inibição com 12 horas na estufa, são as mesmas que apresentam halos de inibição significativos quando inoculadas e mantidas por 24 horas sob temperatura ambiente. Resultado satisfatório, já que no cotidiano este produto é manuseado em temperatura ambiente.

Os resultados de ação antimicrobiana para a água sanitária, reportados pelo Programa de Análises de Produtos, da Diretoria de Avaliação da Conformidade do INMETRO (2013), pela técnica de suspensão referenciada pela normativa EN 1040/2006 do Comitê Europeu de Normalização (CEN), mostraram uma diminuição da carga microbiana. Os resultados encontrados, estão de acordo com normativa, na qual preconiza uma redução de 5 (cinco) logs na população microbiana para produtos classificados como saneantes. Mesmo utilizando uma

metodologia diferente da executada neste trabalho, que foi o método por disco difusão, os resultados alcançados também mostraram uma redução na carga microbiana. O que para essa pesquisa não foi quantificado, mas pode ser visivelmente notada.

O trabalho de Esperandio (2011), que seguiu o método semelhante ao executado neste trabalho, mostrou resultados diferentes dos encontrados neste, isso com relação ao surgimento de halo de inibição para cinco das seis amostras analisadas. Contudo, esta diferença pode ser explicada devido a temperatura de incubação ser inferior a 35°C, ou ainda, a não identificação e quantificação da concentração do microrganismo usado, tendo em vista que este foi isolado do chão do laboratório que sediou a análise.

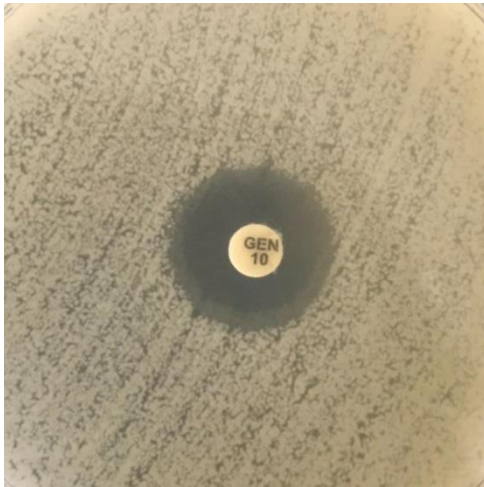
A carga microbiana inoculada é um fator considerável, tendo em vista que a metodologia recomenda $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, uma quantidade elevada para testar a atividade antimicrobiana de um produto com ação desinfetante. Pinto et. al. (2003 apud SIRONI, 2009) explicam que cargas microbianas elevadas podem também comprometer a atividade do produto. Assim também, Tortora et al. (2000) relatam que a taxa de morte bacteriana está na dependência da carga populacional, das características microbianas e no tempo de exposição. Dessa maneira, esse fato pode estar relacionado a carga microbiana elevada para que a água sanitária tenha efeito total bactericida sobre toda essa população.

5.3.1 Teste de Controle Positivo e Negativo

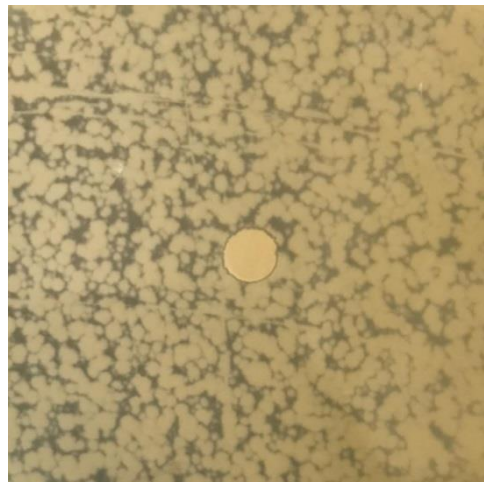
Após o período de incubação da placa-teste constatou-se a formação de halo de inibição para *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 ao controle positivo, usado o antibiótico Gentamicina 10 µg, um amplo espectro da classe dos aminoglicosídeos com baixa taxa de resistência patogênica (VIRTO, 2003). Para o controle negativo foi utilizado disco de papel umedecidos com água destilada esterilizada, não havendo formação de nenhum halo, como já esperado, e pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 – Teste de Controle Positivo e Negativo para *Staphylococcus aureus*

Teste positivo



Teste negativo

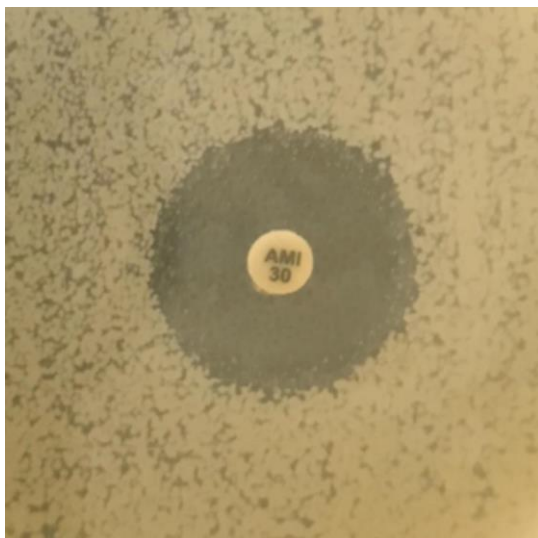


Fonte: A autora.

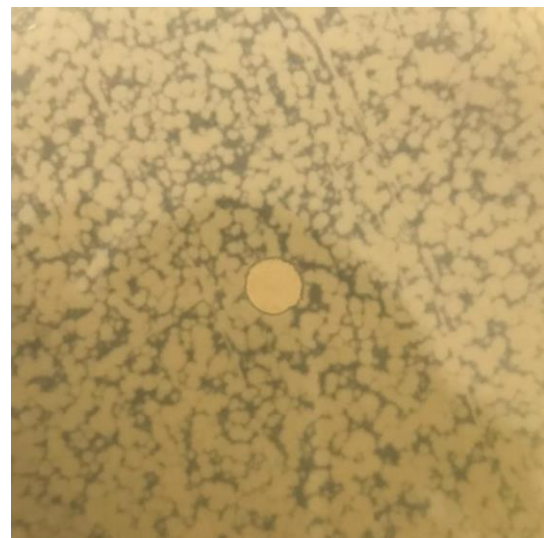
Para o Teste do controle Positivo para *Escherichia coli* ATCC 10536, foi usado o disco com antibiótico Amicacina 30 µg, também da classe dos aminoglicosídeos, possui maior atuação sobre bactérias gram-negativas (CALIL, 2012) e como esperado, foi formado o halo de inibição. Para o Controle negativo, foi utilizado disco de papel umedecidos com água destilada esterilizada e não houve formação de halo, e pode ser observado na Figura 18.

Figura 16 - Teste de Controle Positivo e Negativo para *Escherichia coli*

Teste positivo



Teste negativo



Fonte: A autora.

6 CONCLUSÃO

Conforme resultados obtidos, as dez amostras de água sanitária, regularmente comercializadas nos supermercados de João Pessoa – PB, apresentaram o pH em conformidade com a legislação, que estipula valores de 11,5 a 13,5 para amostra concentrada. Com relação ao teor cloro ativo, três amostras apresentaram valores superiores 2,5 % p/p e uma amostra abaixo do recomendado pela legislação vigente, 2,0 % p/p. As demais amostras estavam em conformidade, apresentando valores entre 2,0 e 2,5 % p/p.

Na determinação da atividade antimicrobiana, pela técnica disco-difusão, com temperatura de incubação a 35°C, nenhuma marca obteve halo de inibição, mas 90% das amostras mostraram ser efetivas na redução da carga microbiana para *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Escherichia coli* ATCC 10536, quando testadas concentradas e 10% das amostras não mostrou eficácia, mesmo concentrada, para nenhum dos dois microrganismos testados, uma vez que apresentou teor de cloro ativo abaixo do padronizado pela legislação. As adaptações feitas na metodologia, principalmente em relação à incubação na temperatura ambiente, possibilitaram verificar que é possível a inibição microbiana.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, visando a utilização da técnica disco difusão para determinação da atividade antimicrobiana da água sanitária, pode se apontar:

- Utilizar o método de disco-difusão aplicando os ajustes realizados neste trabalho. Não incubar a placa invertida, em se tratando de testes com bactérias. Utilizar temperatura de incubação inferior a 35°C durante tempo de incubação de 24 horas. Como sugestão pode ser utilizada a temperatura ambiente, já que a água sanitária também é utilizada nesta temperatura;
- Testar a atividade antimicrobiana da água sanitária contra outras bactérias frequentemente encontradas em ambientes, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp e *Enterobacter* sp.;
- Avaliar os parâmetros de qualidade estudados (pH e teor de cloro ativo) e a atividade antimicrobiana em amostras de água sanitária clandestinas e comparar com os resultados obtidos por produtos registrados.

REFERÊNCIAS

ABICLOR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ÁLCALIS E CLOROS DERIVADOS. Água Sanitária. Disponível em: <http://www.abiclor.com.br/posicionamentos/agua-sanitaria/>. Acesso em: 06 set. 2019.

ANHEMBI. Manual das águas sanitárias. 2014. Disponível em: <http://www.tratamentodeagua.com.br/novo-portal/biblioteca/manual-das-aguas-sanitarias/#.VjIHTNKrThk>. Acesso em: 06 set. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE LIMPEZA E AFINS. **Anuário 2019**. São Paulo, 2019. Disponível em: http://www.abipla.org.br/Admin/Files//Uploads/1/2019-08-28/8265%20-%20Anuário%20ABIPLA%202019_07-08-19_V_COMPLETO.pdf. Acesso em: 12 set 2019.

BORIN, G. **Análise da estabilidade química da solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações em função da embalagem, local e tempo de armazenamento**. (Dissertação – Mestrado). Canoas: Universidade Luterana do Brasil; 2007.

BOTH, Jane Mari Corrêa; LONGARAY, Solange Mendes; AVANCINI, César Augusto Marchionatti. O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente a *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 254-258, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC n.110**, de 6 de setembro de 2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33920/281614/RDC_110_2016/c32ba4f9-d05e-4d35-9c40-0f4fe94e0038. Acesso em: 22 maio 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.59, de 17 de dezembro de 2010. **Procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0059_17_12_2010.pdf/194ebbe3-15ea-4817-b472-f73cc76441c2. Acesso em: 22 maio 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.184, de 22 de outubro de 2001. **Procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários e outros de natureza e finalidade idênticas**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/AGENCIAS/ANVISA/RS0184-221101.PDF>. Acesso em: 22 maio 2019.

BRASIL. Resolução RDC nº 14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. **Diário Oficial** [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 05 mar. 2007. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_14_2007.pdf/3eda65f3-5e07-40b5-b3fb-. Acesso em: 22 maio 2019.

BRASIL. Resolução RDC nº 35 de 16 de agosto de 2010. Abrange os produtos com ação antimicrobiana destinados ao uso em objetos e ambientes relacionados à assistência à saúde para artigos críticos e semi-críticos. **Diário Oficial** [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de agosto de 2010a.

CABRAL, J.B. **Avaliação da qualidade de duas marcas comerciais de disco de antibiograma comercializados no Brasil**. 25 f. Trabalho de conclusão de Curso (Pós-Graduação Lato Sensu “Microbiologia, Fundamentos e Biotecnologia”). Universidade Federal de Tocantins. 2008.

CALIL, Roseli. **Uso racional e seguro de antibióticos em neonatologia**. 2012. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/USO_RACIONAL_SEGURO_ANTI_BIOTICOS_NEONATOLOGIA2.pdf. Acesso em: 17 set. 2019.

CEFAR DIAGNÓSTICA LTDA. Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos para Diagnósticos. Antibiograma passo a passo: teste de sensibilidade por disco difusão (metodologia de Kirby-Bauer). Jurubatuba, SP. [s.d].

DE LUCCA, Lourenço et al. **Controle de qualidade do hipoclorito de sódio no processo de produção**. 2006. Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/105062/Lourenco_de_Lucca.pdf?sequence=1. Acesso em: set. 2019.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; SCHELESKY, M. E. Doseamento da potência da ciprofloxacina em comprimidos orais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 17 – 20, 2005.

ESPERANDIO, Mariane L. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de águas sanitárias comercializadas na cidade de Catanduva-SP. **Revista Unilago**. 2011. Disponível em: <http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/AVALIA%C3%87%C3%83O%20DA%20QUALIDADE%20MICROBIOL%C3%93GICA%20E%20F%C3%8DSICO-QU%C3%8DMICA%20DE%20%C3%81GUAS%20SANIT%C3%81RIAS%20COMERCIALIZADAS%20NA%20CIDADE%20DE%20CATANDUVA.pdf>. Acesso em: set. 2019.

FOGAÇA, Jennifer. **Composição química da água sanitária**. 2015. Disponível em: <http://www.alunosonline.com.br/quimica/composicao-quimica-agua-sanitaria.html>. Acesso em: 22 maio 2019.

GONÇALVES, R. F. **Programa de Pesquisa em Saneamento Básico**. Desinfecção de efluentes sanitários. São Carlos, SP: RIMA, 2003. 422 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). 2012. **Água Sanitária, Desinfetante e Detergente**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/agua_sanitaria.asp. Acesso em: 22 maio 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Programa de análise de produtos**: relatório sobre a análise em água sanitária. Rio de Janeiro: Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior, 2013.

LIMA FILHO, Ubiracir Fernandes et al. **Diretrizes sanitárias para registro de saneantes**: a importância na determinação do prazo de validade de produtos com ação antimicrobiana. 2007. Tese de Doutorado.

MACEDO, JAB de. O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 44, 2004. **Anais...** 2004.

MANUAL das Águas Sanitárias: Guia Completo sobre este produto. São Paulo, 2017. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/manual-das-aguas-sanitarias/>. Acesso em: 12 jul. 2019.

MENEGARO, Adriana et al. Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 2, p. 171-174, 2016.

MURRAY, P.G.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica: classificação, estrutura e replicação bacteriana**. 6. ed. Mosby Elsevier, 2010.

NCCLS (**National Committee for Clinical Laboratory Standards**). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards M7-A5. Wayne, PA. 2000.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.2, p.301-307, abr./jun. 2008.

PASTORIZA, L.; CABO, M. L.; BERNARDEZ, M. et al. Combined effects of modified atmosphere packaging and lauric acid on the stability of pre-cooked fish products during refrigerated storage. **European Food Research and Technology**, v. 215, p.189–193, 2002.

PINHEIRO, Rodrigo Rollin et al. **Aplicação de diferentes métodos no controle de qualidade da atividade antimicrobiana de saneantes domissanitários**. 2012. Tese de Doutorado.

PORTAL Tratamento de Água. **Manual das Águas Sanitárias** – Guia Completo sobre este produto. 2017. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/manual-das-aguas-sanitarias/>. Acesso em: set. 2019.

RÊGO, J.C.; FARO, Z.P. **Manual de limpeza e desinfecção para unidades produtoras de refeições**. São Paulo: Varela, 2003.

RESENDE, Anselmo. Avaliação do hipoclorito de sódio na severidade da ferrugem asiática, do oídio e nas características químicas da soja. 2009.

SANTOS, André Luis dos et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SILVA JÚNIOR. João Ferreira. **Análise de algumas propriedades físico-químicas das águas sanitárias encontradas comercialmente na cidade de Campina Grande-PB.** Campina Grande-PB, 2009. Disponível em:http://www.uniodontomaceio.com.br/portalfinal/cooperados/monografia_joao_ferreia_silva_Junior.pdf. Acesso em: 21 jul. 2019.

SILVA, Pamela Alves Brito Belarmino da. **Avaliação do teor de cloro ativo em águas sanitárias comercializadas no município de Ariquemes-Ro.** 2011.

SIRONI, Paola Barbosa. **Avaliação microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza.** 2009.

SOUZA, Fagner Moreira de; FLORENCIO, Thayná Alves; ALBUQUERQUE, Roberto Lima de. Análise da concentração de hipoclorito de sódio nas águas sanitárias. ENCONTRO DE EXTENSÃO, DOCÊNCIA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA (EEDIC), v. 3, n. 1, 2017.

TEIXEIRA, Maria Suely Braga. **AVALIAÇÃO DO TEOR DE CLORO ATIVO EM DIFERENTES MARCAS DE ÁGUAS SANITÁRIAS.** 2016.

TORTORA GJ; FUNKE BR; Case CL. **Microbiologia.** Porto Alegre: Artmed, 2000.

UNIPAR CARBOCLORO. Disponível em:http://www.uniparcarbocloro.com.br/uniparcarbocloro/web/download_arquivos.asp?id_arquivo=BEE6448C-E087-4D55-901C-D9197E17DAC6. Acesso em: 17 set. 2019.

VIRTO, M.et al. Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. **Biomaterials.** v. 24, 79, 2003.