

BQ

Bacharelado
em Química

Universidade Federal do ABC



Universidade Federal do ABC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Gustavo Souza Bastos

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE CONTAGEM
MICROBIANA POUR PLATE EM
DETERGENTES LAVA-LOUÇAS – UMA
ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR**

Santo André
Abril - 2023

Gustavo Souza Bastos

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE CONTAGEM
MICROBIANA POUR PLATE EM
DETERGENTES LAVA-LOUÇAS – UMA
ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR**

Monografia de Trabalho de Conclusão
de Curso, apresentado ao Bacharelado
em Química da UFABC para obtenção
do título de Graduado em Química.f
Orientadora: Amedea Barozzi Seabra

Santo André
Abril - 2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso de Gustavo Souza Bastos, realizada em 06 de Abril de 2023.

Professora Dra. Amedea Barozzi Seabra
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Professor Dr. Alexandre Zatkovskis
Carvalho
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Professor Dra. Heloiza França Maltez
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à UFABC e ao Bacharelado em Química, que constituíram parte importante não só da minha vida acadêmica mas também do meu desenvolvimento pessoal ao longo dos últimos anos. Agradeço imensamente ao corpo técnico da Clariant, em especial ao time de Pesquisa e Desenvolvimento em Preservantes e ao Desenvolvimento Analítico, por ceder as instalações, equipamentos e todo o conhecimento necessário para a realização deste trabalho. Agradeço também à Alexandra Paschoalin Menezes, Gerente de Desenvolvimento de Novos Negócios - Preservantes por todas as dicas e experiências passadas ao longo desse tempo, sem as quais nada disso teria sido iniciado. Agradeço à minha orientadora, a professora Dra. Amedea Barozzi Seabra pela confiança no projeto e pelo auxílio durante o trabalho. Digo também meu muito obrigado à todos aqueles que em algum momento cruzaram minha trajetória durante a graduação, compartilhando comigo suas angústias, anseios, desejos, objetivos e conhecimento. Somos parte de tudo que vivemos e com quem vivemos, e esse trabalho com certeza é produto disso. Por fim, agradeço à minha mãe, irmã, irmão e namorada, por terem me dado suporte durante essa jornada. Vocês foram essenciais para mim durante todo esse tempo.

RESUMO

Os laboratórios de controle de qualidade das indústrias fabricantes de detergentes lava-louças têm como missão detectar e dimensionar a contaminação microbiana nesses produtos tão logo ela aconteça, sob risco de alterações severas no aspecto da amostra, gerando insatisfação do consumidor final, *recall* de produtos e em última análise risco biológico à população. Desta forma, é de extrema importância que os laboratórios tenham métodos de contagem microbiana que sejam eficientes e precisos, sendo que o método *pour plate* é de longe o mais utilizado. No presente estudo detectou-se que a contagem *pour plate* pode variar até 2 logs em relação a mesma amostra para diferentes inativantes. Efetuaram-se os testes de validação dos caldos inativantes e os resultados demonstraram uma variação acima da faixa de recuperação entre 50 e 200%, para o Teste A, e detectou-se com o Teste B da ASTM E1054 que ambos os caldos testados (TAT e Dey Engley) possuem toxicidade às bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* mesmo elas estando viáveis no momento da validação. Variou-se os tempos de incubação das bactérias testadas na validação, não sendo possível detectar mudança significativa entre as incubações de 48, 72 e 96 horas. Os tempos de inativação foram posteriormente testados, verificando-se assim que o período de contato do inativante com as amostras de detergente não surte efeito na contagem nos intervalos entre 20, 40 e 60 minutos. A incorporação dos inativantes nos meios de cultura ocasionou uma recuperação dentro dos parâmetros da norma ASTM E1054 somente para uma das amostras, o que inviabiliza o método *pour plate* para detergentes lava-louças. Investigaram-se as diferenças físico-químicas entre as duas amostras testadas, a fim de esclarecer as razões entre as respostas díspares nos testes microbiológicos e para tanto, analisou-se diversas moléculas de interesse nas formulações dos detergentes, encontrando-se uma diferença de 1,6% de matéria ativa aniônica entre as duas amostras, que possuem uma concentração de LASS com diferença inferior à 0,3%. Analisou-se também o teor de água e de sólidos totais das amostras, sendo possível notar uma diferença de 0,6% e 2% respectivamente para cada um dos testes. A concentração de glicerina também foi um fator de diferença entre as duas amostras de detergentes, sendo que somente uma teve detectada a presença do composto em sua formulação. Conclui-se que as duas fórmulas analisadas possuem diferenças significativas em suas composições, tornando a inativação completa um desafio complexo.

Palavras-Chave: Contagem Microbiana, Detergentes lava-louça, Caracterização

ABSTRACT

The quality control laboratories of the dishwasher detergent manufacturing industries have the mission of detecting and measuring microbial contamination in these products as soon as it happens, under the risk of severe changes in the appearance of the sample, generating dissatisfaction in the final consumer, recall of products and ultimately biological risk to the population. Therefore, laboratories must have efficient and accurate microbial counting methods, with the pour plate method being by far the most used. In the present study, it was detected that the pour plate count can vary by up to 2 logs in relation to the same sample for different inactivating agents. The validation tests of the inactivating broths were carried out and the results showed a variation above the recovery range between 50 and 200%, for Test A, and it was detected with Test B of ASTM E1054 that both tested broths (TAT and Dey Engley) are toxic to *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria even though they are viable at the time of validation. The incubation times of the bacteria tested in the validation were varied, and it was not possible to detect a significant change between the incubations of 48, 72, and 96 hours. The inactivation times were later tested, thus verifying that the period of contact of the inactivating agent with the detergent samples has no effect on the counts in the intervals between 20, 40, and 60 minutes. The incorporation of the inactivating agents in the culture media resulted in a recovery within the parameters of the ASTM E1054 standard for only one of the samples, which makes the pour plate method for dishwashing detergents unfeasible. The physical-chemical differences between the two tested samples were investigated, to clarify the reasons for the different responses in the microbiological tests, and for that, several molecules of interest in the detergent formulations were analyzed, finding a difference of 1, 6% anionic active matter between the two samples, which have a LASS content with a difference of less than 0.3%. The water content and total solids of the samples were also analyzed, being possible to notice a difference of 0.6% and 2% respectively for each one of the tests. The glycerin content was also a difference factor between the two detergent samples, and only one detected the presence of the compound in its formulation. With this, it is also concluded that the two formulas analyzed have significant differences in their compositions, making complete inactivation a complex challenge.

Keywords: Microbial Counting, Dishwasher Detergents, Characterization

SUMÁRIO

1. Introdução	8
1.1 Detergentes Lava-Louças	8
1.1.2 Formulações de Detergentes Lava-Louças	8
1.1.3 Problemas de contaminação em detergentes	9
1.2 Métodos de Contagem Microbiana	10
1.2.1 Inativantes	11
1.3 Moléculas de Interesse Microbiano	12
2. Objetivos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1 Métodos Microbiológicos	14
3.1.1 Contagem Microbiana Pour Plate	14
3.1.2 Validação de Caldos Inativantes	14
3.2 Métodos Químicos	15
3.2.1 Determinação do teor de Água via Karl-Fischer	15
3.2.2 Determinação do teor de Sólidos	16
3.2.3 Matéria Ativa Aniônica Total	16
3.2.4 Teor de Linear Alquilbenzeno Sulfato de Sódio (LASS) por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE)	17
3.2.5 Determinação do Teor de Glicerina por Cromatografia Gasosa	18
3.2.6 Determinação e Quantificação de Metais por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES)	18
4. Resultados e discussões	19
4.1 Análise de Contagem Microbiana Pour Plate em amostras de mercado	19
4.2 Validação do Caldo Inativante	19
4.2.1 Teste A - Efetividade dos caldos inativantes	19
4.2.2 Teste B - Toxicidade dos caldos inativantes	20
4.2.3 Teste C - Viabilidade dos microrganismos	21
4.3 Avaliação do tempo de incubação	21
4.4 Avaliação do tempo de inativação	24
4.5 Mudança nos meios de cultura	27
4.6 Caracterização das amostras de Detergentes Lava-louças	28
4.6.1 Determinação do teor de Água via Karl Fischer	28
4.6.2 Determinação do teor de Sólidos	29
4.6.3 Matéria Ativa Aniônica Total	30
4.6.4 Teor de Linear Alquilbenzeno Sulfato de Sódio (LASS) por HPLC	30
4.6.5 Determinação do Teor de Glicerina por Cromatografia Gasosa	31
4.6.6 Determinação e Quantificação de Metais por ICP-AES	31
5. Considerações Finais	33
6. Referências	34
Anexo	38

1. Introdução

1.1 Detergentes Lava-Louças

Uma série de produtos de higiene para superfície e tecidos recebe popularmente a denominação de “detergente”, passando principalmente pelos produtos lava-roupas e lava-louças. Todos esses produtos possuem como função principal a limpeza por meio da remoção de impurezas, sujeiras e notoriamente gorduras, porém mesmo com uma função similar, as apresentações desse tipo de produto podem ser diferentes, variando de composições líquidas, em barra, pó ou em gel (SHOWELL, 2006). Segundo o anuário da ABIPLA (Associação Brasileira das Indústrias Produtos de Higiene, Limpeza e Saneantes) lançado em 2021, o mercado de detergentes lava-louças aumentou 12,23% em relação ao ano anterior, impulsionado principalmente pelo maior consumo de produtos de limpeza frente aos novos hábitos durante o período de pandemia de COVID-19 (ABIPLA, 2021).

O relatório divulgado no final de 2022 pela Mintel, grupo de pesquisa de mercado focado em produtos de beleza, limpeza e alimentos, divulgou que 40% dos consumidores brasileiros estão dispostos a pagar um pouco mais caro por produtos lava-louças que possuam algum diferencial de desempenho (SHARMA, 2022). Isso relacionado ao fato de que os produtos de cuidado para casa que possuem um menor preço final são os mais populares, atrelado à perda recente do poder de compra do mercado brasileiro, cria evidentemente uma alta diferenciação nas formulações disponíveis ao público, dificultando assim métodos de análise desenhados para esse tipo de matriz.

1.1.2 Formulações de Detergentes Lava-Louças

Alguns detergentes de mercado podem conter dezenas de ingredientes em sua formulação, muitos deles em concentrações inferiores a 1%, sendo que a quantidade de ingredientes e a natureza destes pode variar em relação ao propósito de uso do lava-louças em questão, bem como o público alvo. Dessa forma, uma descrição completa dos detergentes lava-louças e das moléculas que podem compor sua formulação é uma tarefa de alta complexidade e não constitui o objetivo do presente estudo (SHOWELL, 2006).

O objetivo primário de todos os detergentes lava-louças é a desincrustação de sujidades de superfícies não-porosas e por isso alguns componentes são mais comuns na composição desses produtos e constituem uma espécie de “chassi” para a sua formulação, apesar da alta complexidade e diversidade de ingredientes. (SHOWELL, 2006).

Um dos componentes mais comuns em detergentes lava-louças são os surfactantes, moléculas com característica anfifílica, ou seja, que possuem parte de sua molécula com características hidrofílicas e a outra parte com comportamento lipofílico. Os surfactantes são caracterizados pela sua porção hidrofílica, podendo ser considerados como não iônico, aniônico, catiônico ou anfotérico, enquanto a porção hidrofóbica normalmente é caracterizada por cadeias de hidrocarbonetos lineares variando entre 10 e 20 átomos de carbono. A principal função dos surfactantes é modificar a interface entre duas ou mais substâncias,

promovendo assim a dispersão de uma substância na outra, notadamente estas estando em fases separadas previamente. Isso ocorre pois os surfactantes promovem a limpeza ao reduzir a tensão superficial entre a superfície com sujidade e a água, promovendo assim o arraste da sujeira (SHOWELL, 2006).

Um componente muito importante nessas formulações são os solventes, que constituem a maior parte da composição dos detergentes lava-louças. Dentro dessa perspectiva, a maioria dos produtos lava-louças utiliza a água como único solvente, devido à sua eficiência, baixo custo e não toxicidade, porém algumas formulações podem conter o 1,2-propanediol em sua formulação para ajudar na dispersão de componentes mais lipofílicos como fragrâncias, porém a frequência em que isso ocorre é baixa (SHOWELL, 2006). Outros componentes de grande importância em detergentes, participam em menor quantidade da composição e não estão presentes em todos os produtos encontrados, sendo que dessa forma, a presença deles é declarada em rótulo. Entre esses compostos estão os branqueadores que podem ser representados pelo peróxido de hidrogênio, os modificadores reológicos que mudam a viscosidade e o sensorial de formulações lava-pratos, além dos agentes quelantes, que são substâncias orgânicas multidentadas utilizadas para consumir e suspender os metais livres na formulação, uma vez que vários íons metálicos tem como propriedade a precipitação de alguns surfactantes (SHOWELL, 2006).

1.1.3 Problemas de contaminação em detergentes

Detergentes, assim como outros produtos para cuidados da casa são intimamente ligados à limpeza e assepsia no imaginário popular sendo que essa associação é bastante direta haja visto que uma infinidade de produtos tem como principal objetivo a limpeza. Os produtos para cuidados da casa podem ser classificados nas categorias “cuidados para roupa” ou “limpeza de superfícies”, sendo que detergente lava-louças se enquadram na segunda opção. Ao contrário do que se possa imaginar, detergentes lava-louças não tem como objetivo primário a limpeza de microrganismos, mas sim a limpeza de dejetos que estejam grudados à louças sujas, e por isso os principais ativos desses produtos são os surfactantes que vão interagir com a sujeira devido à sua estrutura polar e apolar em regiões diferentes da molécula. Sendo assim, os únicos componentes que fazem parte da formulação de detergentes não específicos (aqueles que não tem funções e aplicações distintas explícitas em rótulo) e que tem o intuito de matar microrganismos são os preservantes, porém mesmo com a adição desses compostos, múltiplos casos de contaminações bacterianas são reportadas nesse tipo de produto.

Um exemplo disso foi o *recall* de produtos da marca norte-americana *Laundress*, que vendia detergentes *premium* para classe A e B, onde 8 milhões de produtos tiveram que ser recolhidos dos consumidores e mercados devido à contaminação microbiana (KAVILANZ, 2023). A bactéria contaminante era do gênero *Pseudomonas*, uma bactéria gram-negativa, que possui como características relevantes a capacidade de formação de biofilmes, de sobreviver em condições de baixo nível nutricional e é frequentemente encontrada em fontes de água (BEHZADI, BARÁTH e GAJDÁCS, 2021) sendo que

contaminações bacterianas dessa natureza são caracterizadas pelo mau-cheiro, perda de viscosidade e alteração no desempenho dos detergentes.

Recalls são um sinal de que todas as barreiras de controle microbiológico durante a fabricação falharam sucessivamente, podendo causar severos danos não só ao público consumidor, mas também às marcas que vendem. *Recalls* nesse tipo de produto são relativamente pouco divulgados e possuem pouco ou nenhum registro público e por isso são difíceis de se mensurar, porém a maioria deles tem como causa sucessivos relatos de não conformidade nos serviços de atendimento ao consumidor. Laboratórios de controle de qualidade de empresas fabricantes de detergente lava-louças são os principais responsáveis por detectar a contaminação microbiana antes de que os produtos fora dos limites aceitáveis de especificação cheguem ao consumidor final, e para isso métodos de contagem e avaliação microbiana eficientes devem ser implementados para que a contaminação seja corretamente dimensionada e resultados falsos não sejam reportados.

1.2 Métodos de Contagem Microbiana

Uma série de métodos podem ser utilizados para a contagem microbiana, indo da contagem microbiana *pour plate* (GORSUCH, et al., 2019), por filtração (SHEN, et al., 2022), por turbidez (CLAIS, et al., 2014), por citometria de fluxo (RUBIO, et al., 2019) ou Reação em Cadeia da Polimerase(da sigla PCRem inglês) (CLAIS, et al., 2014), sendo que a escolha de cada método a ser utilizado pode variar de acordo com uma série de parâmetros envolvendo o produto testado, o tempo de análise disponível, bem como o nível de capacidade operacional do laboratório.

A contagem microbiana *pour plate*, também conhecida como plaqueamento em profundidade é o método mais simples para a enumeração de fungos e bactérias em diversos tipos de amostras, sendo um método bastante prático e versátil, que consiste na inoculação conjunta do produto (previamente inativado ou não) em placa de petri junto com meio de cultura fundido. O conjunto solidifica a temperatura ambiente, é incubado e o crescimento microbiano é feito por contagem visual de colônias após a incubação. A principal desvantagem do método é o alto consumo de insumos como placas de petri, meios de cultura e inativantes.

Já a filtração substitui a etapa de inoculação em placa de petri, sendo feita a filtração e lavagem da amostra em membranas de 0,22 μm , permitindo a separação física das células viáveis na superfície da membrana, que posteriormente é posta sobre uma placa com meio de cultura sólido. A principal desvantagem desse método é o alto volume de insumos, bem como o maior tempo de duração do procedimento, sendo inviável para laboratórios com alto volume de amostras a serem analisadas.

O método de turbidez é de longe o mais rápido e econômico, sendo necessário somente a preparação prévia de padrões de turbidez, para que a comparação com a enumeração no produto seja feita, entretanto o método esbarra na dependência de se utilizar somente produtos totalmente límpidos, para que a turbidez da amostra não seja erroneamente atribuída à contaminação microbiana.

Já os métodos de citometria de fluxo e de PCR são extremamente precisos e possuem certa automação de processo, fazendo também com que sejam métodos ágeis para a enumeração microbiana, entretanto exigem um alto grau de conhecimento dos analistas bem como valores altos para a aquisição de equipamentos e insumos, o que muitas vezes é um impeditivo para sua utilização. Desta forma, avalia-se que o método mais alinhado com as necessidades de laboratórios de controle de qualidade com alta demanda é o da contagem microbiana *pour plate*, devido sua rapidez atrelada a facilidade e precisão.

1.2.1 Inativantes

Um passo pouco discutido e não obrigatório para todas as análises quantitativas microbianas é a inativação. A inativação ou neutralização é uma etapa onde uma substância ou uma solução contendo várias substâncias é utilizada para neutralizar toda a ação de um composto antimicrobiano, a fim de limitar a ação do composto que afetará negativamente o crescimento bacteriano. Entre os compostos a serem neutralizados estão desinfetantes, ativos antimicrobianos, preservantes, surfactantes e outros compostos de conhecida ação bactericida ou bacteriostática, ou seja, aqueles que matam as bactérias ou restringem seu crescimento populacional (CDC, 2019).

O intuito de utilizar neutralizantes vem da necessidade de parar a ação antimicrobiana em certo ponto da análise, para que o composto de interesse não aja sob as bactérias inoculadas durante o período de incubação em meio de cultura apropriado. Dessa forma a precisão do método é melhorada, já que o efeito negativo da amostra é limitado somente ao tempo de contato do inóculo com a amostra, e depois nas etapas de diluição e incubação, o efeito negativo sobre o crescimento é neutralizado por completo (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, et al., 2013).

Um bom neutralizante deve seguir alguns requisitos básicos, sendo o primeiro deles a eficácia em neutralizar a ação antimicrobiana da amostra. Cada classe de compostos químicos pode ser neutralizada por um ou mais compostos, levando-se em consideração também as concentrações, sendo que desta forma compostos com composições complexas demandam inativantes igualmente complexos (CENGIZ e YAPAR, 2018 e DEY e ENGLEBY, 1995). Além disso, o neutralizante utilizado não pode ter em si uma toxicidade aos microrganismos, já que se este efeito ocorrer, falsos negativos e erros que subestimam o crescimento microbiano vão acontecer, sendo assim também interessante que o inativante não reaja ou interaja de alguma forma com as amostras gerando como produtos substâncias com atividade antimicrobiana (GRISPOLDI, et al., 2020 e SOZZI, et al., 2019).

Vários métodos separados podem ser utilizados para verificar a eficácia de um neutralizante, e alguns são normatizados na forma de métodos padrão desenvolvidos por agências de regulamentação e normatização internacional. Para os inativantes, o teste escolhido para a validação foi uma adaptação do método descrito na norma internacional ASTM E1054 - *Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents*, redigido pela *American Society for Testing and Materials*, que será

explicado com maiores detalhes adiante (ASTM, 2022).

1.3 Moléculas de Interesse Microbiano

Diversos tipos de moléculas podem afetar tanto negativa quanto positivamente o crescimento bacteriano, ou seja, podem ajudar ou prejudicar as colônias bacterianas a se multiplicarem em determinado tipo de ambiente (HALLA, et al., 2018). O estudo desse tipo de molécula é complexo já que substâncias podem ter efeitos complexos nos microrganismos, que por sua vez podem ser influenciados de forma diferente aquele tipo de componente, fazendo com que devido à rápida resistência adquirida, a bactéria em questão passe a não ser influenciada por aquela substância (NILIAN, et al., 2016 e TONG, et al., 2021).

Com essa complexidade, a caracterização das formulações se faz muito importante, já que uma infinidade de moléculas pode afetar não só a interação detergente-microrganismo como também a reprodutibilidade e nível de detecção do método microbiano. Sendo assim, um dos principais componentes das formulações de detergentes lava-louças são os surfactantes aniônicos, ou seja, aqueles que possuem uma longa cadeia apolar seguida de uma extremidade polar composta por um ânion (SHOWELL, 2006). Os surfactantes aniônicos são agentes antimicrobianos bastante conhecidos e estudos mostram como diversas bactérias são influenciadas negativamente pela presença de ativos aniônicos (GILL, et al., 2022).

Surfactantes catiônicos, por sua vez, são encontrados em menor quantidade em formulações de detergentes lava-louças e são amplamente empregados como preservantes, principalmente na figura dos quaternários de amônia (MCDONELL, 2007). A ação clássica da maioria dos agentes antimicrobianos bactericidas é a interação com a superfície celular, porém para os surfactantes aniônicos o mecanismo pode ser ainda mais intrincado: Primeiro há a adsorção seguida da penetração na parede celular bacteriana, seguida da interação com a membrana citoplasmática causando desordem no arranjo das proteínas, subsequentemente à desordem da membrana citoplasmática há o vazamento de material citoplasmático intracelular. Após esse processo, há a degradação das proteínas e do material nucleico da bactéria, proporcionando assim a lise celular completa e posterior morte (MCDONELL, 2007).

Um importante componente dos detergentes lava-louças e de outros produtos para cuidado doméstico, é a água, sendo responsável pela maior parte da composição desse tipo de produto. A presença de água por si só já é um fator determinante na dimensão do crescimento bacteriano, porém a principal medida de quanto a água influencia as bactérias é a atividade de água (a_w), que pode ser definida pela relação entre a pressão de vapor da água na formulação e a pressão de vapor da água pura, sendo também definida como a quantidade de água disponível ou livre dentro do produto, sem estar associada com outras estruturas e/ou substâncias (PELEG, 2022).

A qualidade da água utilizada na fabricação de detergentes também é de extrema importância, uma vez que se a água utilizada não estiver com o nível de contaminação abaixo do mínimo requerido, uma série de bactérias, entre elas as algumas possivelmente patogênicas, podem já estar incorporadas no produto desde

os primeiros estágios de fabricação, podendo causar contaminações não só aos produtos fabricados com essa água, mas também ao ser humano (MICHALEK, JOHN, e CAETANO DOS SANTOS, 2019).

Algumas formulações de detergentes podem conter glicerina, e essa substância deve ser sempre avaliada como uma molécula de interesse microbiano. Em quantidades altas próximas à 100% em uma formulação, a glicerina pode agir como um composto antimicrobiano que dificulta a troca iônica entre os meios intracelular e extracelular gerando uma disfunção osmótica grave, que não matará as células de imediato, mas que dificulta todo o processo de replicação celular, afetando diretamente na multiplicação bacteriana (NALAWADE, BHAT e SOGI, 2015). Em quantidades inferiores, o efeito osmótico diminuirá proporcionalmente, havendo também a possibilidade da glicerina se tornar um alimento para bactérias, já que esta é uma fonte de carbono disponível no meio.

Metais não são o tipo de composto esperado em produtos lava-louças, porém por uma série de processos de fabricação além da composição de alguns ativos, os metais podem aparecer como substâncias presentes em detergentes, porém em pequenas quantidades. Estudar como os metais influenciam o crescimento bacteriano é relativamente difícil pois nem todos os metais agem da mesma maneira devido às suas diferentes propriedades químicas, sendo o único mecanismo de ação atrelado à todos os metais o choque hiperosmótico que é o aumento repentino da concentração de soluto nos arredores da célula, resultando no vazamento de água do interior da bactéria (FREI, et al., 2023). Alguns dos mecanismos de ação antimicrobiana dos metais envolvem a disfunção estrutural de proteínas, rompimento direto da membrana, interferência na absorção de nutrientes, genotoxicidade e alteração do material nucleico, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo que nem todos os mecanismos bioquímicos foram completamente elucidados (FREI, et al., 2023).

O entendimento da formulação analisada bem como o conhecimento de todos os componentes de interesse microbiológico é importante para detectar-se não só quais inativantes devem-se utilizar, mas também entender quais fatores podem ou não estarem influenciando o método de contagem microbiana. Para tanto, uma boa identificação dos compostos de interesse microbiano das amostras de detergente lava-louças deve ser feita, para que o entendimento seja completo, aliando o conhecimento químico e microbiológico.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a eficiência do método de contagem microbiana *pour plate* para detergentes lava-louças;

Avaliar alterações de condições no método de contagem microbiana *pour plate*;

2.2 Objetivos Específicos

Investigar os fatores que podem influenciar a eficiência e validade do método *pour plate*;

Identificar e quantificar moléculas de interesse microbiológico em amostras de detergentes lava-louças.

3. Materiais e Métodos

Todas as análises foram feitas em duas amostras comerciais de detergentes de mercado, compradas em fevereiro de 2022, sendo escolhidas por representarem detergentes lava-louças comuns mas com ações diferentes entre si descritas em rótulo. As amostras serão descritas no presente trabalho como “Detergente Lava-Louças Anti-odor Cristal com Glicerina” e “Detergente Lava-Louças Neutro”.

3.1 Métodos Microbiológicos

3.1.1 Contagem Microbiana Pour Plate

Com o auxílio de uma micropipeta automática, adicionou-se 1000 µL dos detergentes lava-louças a serem testados a um tubo de ensaio contendo 9 mL do caldo inativante escolhido, homogeneizando o tubo em vórtex por 5 segundos. Deixou-se o tubo em repouso por 20 minutos como tempo de contato indicado, para que todo o conteúdo do detergente seja neutralizado. Após esse período, diluiu-se o conteúdo do primeiro tubo de ensaio em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução tampão fosfato e fez-se a diluição seriada do conteúdo, derramando quantidades seriadas do tubo nas placas de petri vazias. Em seguida, derramou-se aproximadamente 10 mL do meio de cultura não seletivo TSA (*Tryptic Soy Agar*) liquefeito com adição de solução do corante cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 1% m/m na proporção 1:100 em relação ao meio de cultura. Esperou-se a solidificação e as placas foram incubadas de maneira invertida em incubadoras na temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas.

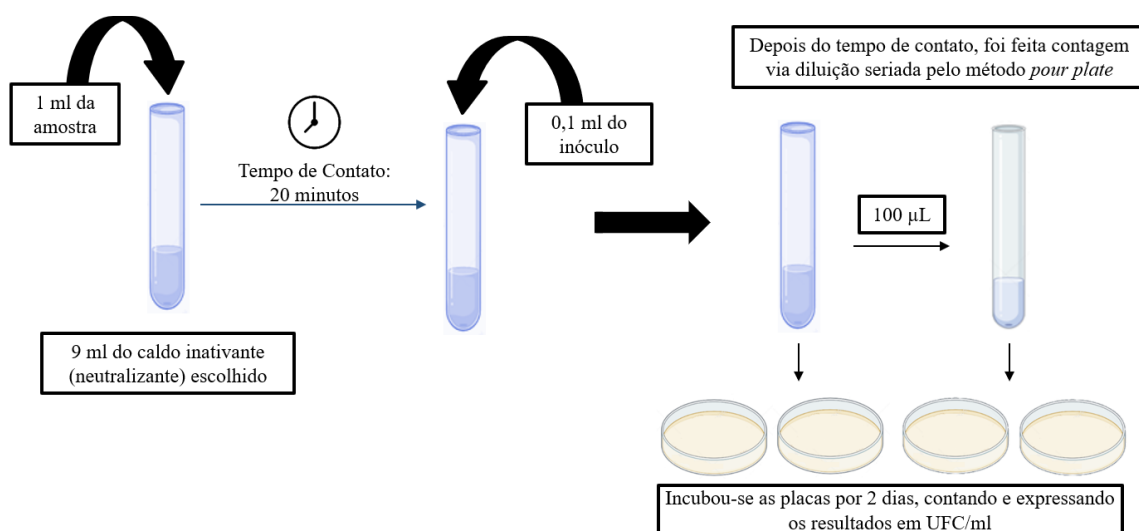
O procedimento foi feito separadamente e em duplicata para cada uma das amostras testadas, e para cada um dos caldos inativantes a serem comparados. As amostras de mercado foram o “Detergente Lava-Louças Anti-odor Cristal com Glicerina” e o “Detergente Lava-Louças Neutro”. Os caldos inativantes a serem comparados foram o caldo base TAT (Tryptose, Azolectina, Tween) da Merck Millipore® e o caldo D/E (Dey-Engley) da Merck Millipore®.

3.1.2 Validação de Caldos Inativantes

A validação de caldos inativantes foi feita segundo a metodologia ASTM E1054 - *Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents*, redigido pela *American Society for Testing and Materials* e é constituída de três partes principais. O teste A é o teste que mede a eficiência do caldo inativante em neutralizar a ação antimicrobiana da amostra. No teste A da ASTM E1054 1 mL do produto a ser testado, no caso cada um dos detergentes analisados na contagem *pour plate*, foi transferido para um tubo de ensaio contendo cada um dos caldos inativantes testados (Caldo D/E e Caldo TAT) homogeneizando o tubo em vórtex por 5 segundos. Deixou-se o tubo em repouso por 20 minutos como tempo de contato indicado, para que todo o conteúdo do detergente seja neutralizado. Após esse período, 0,1 mL da suspensão salina das bactérias *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *S. aureus* ATCC 6538 foram inoculados separadamente à uma concentração previamente medida em torno de 10^8 UFC/mL, após essa etapa diluiu-se o conteúdo do

primeiro tubo de ensaio contendo 10 mL de solução tampão de fosfato e faz-se a diluição seriada do conteúdo, derramando quantidades seriadas nas placas de petri vazias. Em seguida, derramou-se aproximadamente 10 mL do meio de cultura TSA liquefeito com adição de solução do corante cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 1% m/m na proporção 1:100 em relação ao meio de cultura. Esperou-se a solidificação e as placas foram incubadas de maneira invertida em incubadoras na temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Na Figura 1 é mostrado um esquema simplificado do procedimento do Teste A.

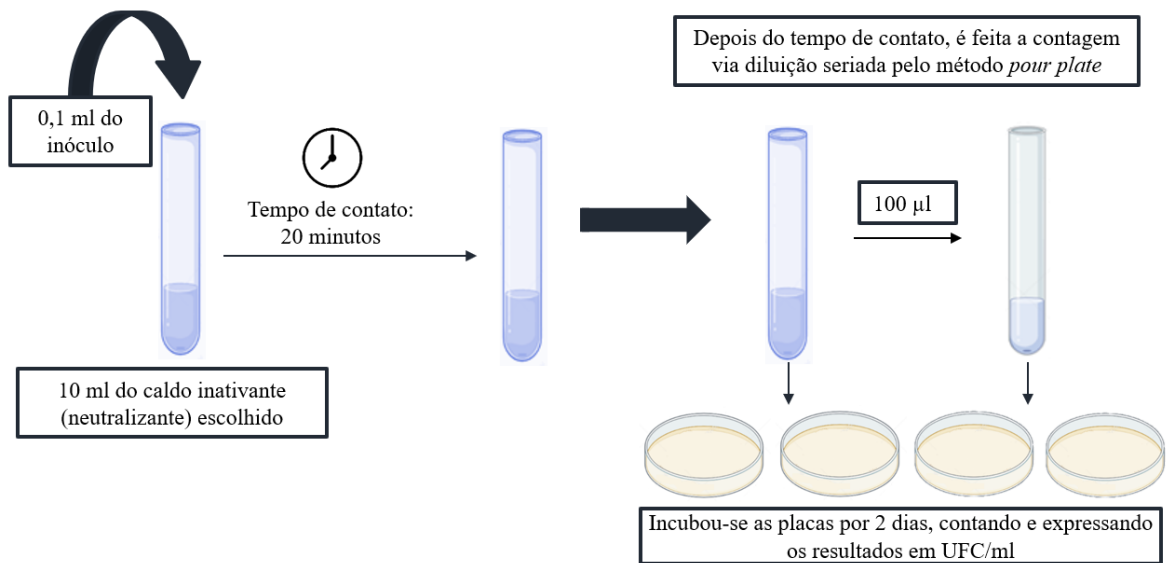
Figura 1 – Esquema simplificado do procedimento do Teste A da metodologia ASTM E1054



Fonte: Próprio Autor

Já o teste B é indicado para medir a toxicidade dos caldos inativantes testados para as bactérias em questão, e dessa forma no teste, 0,1 mL da suspensão salina das bactérias *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *S. aureus* ATCC 6538 foram inoculados separadamente à uma concentração previamente medida em torno de 10^8 UFC/mL em 10 mL de cada um dos caldos inativantes e após uma agitação de 5 segundos em vórtex, deixou-se o tubo em repouso por 20 minutos como tempo de contato indicado. Após esse período, diluiu-se o conteúdo do primeiro tubo de ensaio em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução tampão de fosfato e faz-se a diluição seriada do conteúdo, derramando quantidades seriadas do tubo nas placas de petri vazias. Em seguida, derramou-se aproximadamente 10 mL do meio de cultura TSA liquefeito com adição de solução do corante cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 1% m/m na proporção 1:100 em relação ao meio de cultura. Espera-se a solidificação e as placas são incubadas de maneira invertida em incubadoras na temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Na Figura 2 é mostrado um esquema simplificado do procedimento do Teste B.

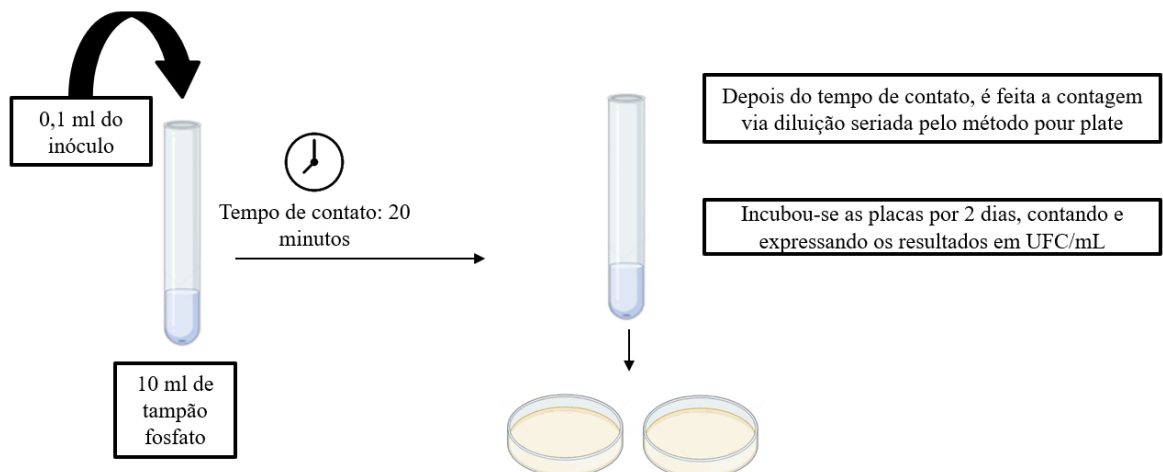
Figura 2 – Esquema simplificado do procedimento do Teste B da metodologia ASTM E1054



Fonte: Próprio Autor

O último teste é o C, que atesta a viabilidade dos microrganismos testados, e foi feito inoculando 0,1 mL da suspensão salina das bactérias *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *S. aureus* ATCC 6538 separadamente à uma concentração previamente medida em torno de 10^8 UFC/ml em 10 mL de Tampão Fosfato e após uma agitação de 5 segundos em vórtex, deixou-se o tubo em repouso por 20 minutos como tempo de contato indicado. Após esse período diluiu-se o conteúdo do primeiro tubo de ensaio em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução tampão de fosfato e fez-se a diluição seriada do conteúdo, derramando quantidades seriadas do tubo nas placas de petri vazias. Em seguida, derramou-se aproximadamente 10 mL do meio de cultura TSA liquefeito com adição de solução do corante cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 1% m/m na proporção 1:100 em relação ao meio de cultura. Esperou-se a solidificação e as placas são incubadas de maneira invertida em incubadoras na temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Na Figura 2 é mostrado um esquema simplificado do procedimento do Teste C.

Figura 3 – Esquema simplificado do procedimento do Teste C da metodologia ASTM E1054



Fonte: Próprio Autor

Todas as modificações derivadas dos Testes A, B e C serão descritas junto com suas interpretações futuramente neste trabalho, para as análises com condições modificadas os inóculos utilizados de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 estavam à $1,6 \times 10^6$ UFC/mL e os de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 estavam à $3,4 \times 10^6$ UFC/mL.

3.2 Métodos Químicos

3.2.1 Determinação da concentração de água via Karl-Fischer

A análise da concentração de água das amostras de detergentes comerciais testados anteriormente foi feita a partir da aplicação de 3 a 4 gotas da amostra analisada em ambiente fechado dentro do titulador Karl Fischer. A massa das gotas introduzidas é medida por pesagem por diferença. O processo é repetido em triplicata, com diferenças não inferiores à 0,5% entre os valores das replicatas, calculando-se assim a concentração de água de cada uma das amostras testadas conforme fórmula abaixo.

$$\text{Teor de Água (\%)} = \frac{F \times V}{M} \quad (1)$$

Onde F corresponde ao fator de padronização da solução Karl-Fischer, V corresponde ao volume de solução de Karl-Fischer gasto na titulação da amostra em mililitros e M corresponde à massa de amostra introduzida no equipamento em gramas. Para essa análise, utilizou-se o titulador Karl Fischer Metrohm 870 Titrino Plus, Metanol 99,9% da Merck e solução Apura Karl-Fischer 5 mg H₂O mL⁻¹.

3.2.2 Determinação do teor de Sólidos

Para essa determinação, optou-se pela secagem a peso constante em estufa, método onde 2 g de cada uma das amostras comerciais de detergente foram pesadas em um recipiente plano previamente pesado em balança analítica, podendo ser um vidro de relógio ou placa de petri, e colocado em estufa à 105 °C por 3 horas. O percentual de resíduo é anotado e o sólido residual volta à estufa sob as mesmas condições, repetindo o processo até que não haja uma diferença superior a 0,2% em relação à medida anterior. O procedimento é repetido em duplicata, calculando-se a média de teor de sólidos não-voláteis na amostra em questão conforme fórmula abaixo.

$$\text{Teor de Sólidos (\%)} = \frac{M_f - M_i}{M_a} \times 100 \quad (2)$$

Onde M_f representa a massa final do conjunto recipiente mais o residual da amostra em gramas, M_i corresponde a massa do conjunto recipiente mais a amostra antes do aquecimento em estufa em gramas e M_a representa a massa da amostra antes do aquecimento em estufa.

3.2.3 Matéria Ativa Aniônica Total

Para a determinação da matéria ativa aniônica nas amostras de detergentes comerciais, dissolve-se a amostra em água, adicionando-se algumas gotas de solução de fenolftaleína. Neutralizou-se a amostra com NaOH 1,0 mol/L ou H₂SO₄ 1,0 mol/L. O conteúdo neutralizado foi transferido para um balão volumétrico

de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada, homogeneizando após isso. Pipetou-se 25 mL da solução diluída em balão volumétrico anteriormente para uma proveta de 100 mL com tampa, adicionou-se 10 mL de água destilada, 15 mL de clorofórmio e 10 mL de indicador ácido misto. Adicionou-se a solução titulante (Hyamine 1622 0,004 M) utilizando uma bureta automática para fazer a titulação. Fecha-se a proveta após cada adição de volume e agita-se. Se a fase inferior for rosa, continua-se a adição com repetidas agitações, observando se as fases começam a ser separar com maior rapidez, isso indica que o ponto de equivalência está próximo. Continua-se a titulação gota a gota, agitando após cada adição de titulante até o ponto final, até a coloração do clorofórmio mudar de rosa para levemente azul acinzentado. A análise é feita em duplicata para cada uma das amostras testadas, sendo um método baseado na norma Norma ISO 2271, que descreve o cálculo segundo formula abaixo (ISO, 1989).

$$\text{Teor de Matéria Ativa Aniônica (\%)} = \frac{V \times M \times \text{mol} \times 4 \times F}{m} \quad (3)$$

Onde m corresponde à massa da amostra inicial em gramas, V representa o volume de solução Hyamine gasto na titulação em mL, M a molaridade da solução de Hyamine em mol/L, mol representa massa molecular da matéria ativa aniônica em g/mol, 4 é o fator de diluição de cálculo para % e F corresponde ao fator de padronização da solução de Hyamine.

3.2.4 Determinação de Linear Alquilbenzeno Sulfato de Sódio (LASS) por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE)

A determinação de Linear Alquilbenzeno Sulfato de Sódio (LASS) presente nas duas amostras de detergente escolhidas foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE ou HPLC em inglês) no laboratório de desenvolvimento analítico da Clariant, em Suzano pela equipe do laboratório central. A determinação da molécula de LASS pode ser feita por CLAE, no cromatógrafo Agilent 1100 ou equivalente equipado com detector de UV-Visível, conectado à ChemStation, empregando coluna de fase reversa e detecção UV em 210 e 254 nm, mas pode ser aplicado para outras moléculas como tensoativos anfóteros (Cocoamidopropil betaína, Coco betaína e lauril anfoacetato de sódio) e aniônicos (ácido dodecilbenzeno sulfônico ou sais derivados do mesmo). No procedimento operacional, injetou-se 10 microlitros do padrão de LASS e verificou-se a área obtida, posteriormente injetando 20 microlitros da amostra a ser analisada e comparando a área obtida. Verifica-se então quantos microlitros do padrão devem ser injetados para que a área obtida na amostra seja similar à área obtida no padrão, com uma diferença máxima de 5%. Após isso, injeta-se em duplicata padrões a amostras, de maneira que a máxima variação de áreas do padrão e as amostras seja de 1,0%. Na Figura 1 do anexo é possível visualizar os cromatogramas sobrepostos dos padrões de LASS (0,5; 1,2; 2,5; 7,5 e 12% m/v) nas condições cromatográficas estabelecidas na metodologia, com esses cromatogramas, é possível traçar uma curva de calibração entre as concentrações dos padrões injetados e as áreas dos picos encontrados no cromatograma. Na Figura 2 do anexo vê-se a curva de calibração para os padrões de LASS, sendo o coeficiente de correlação apresentado

com valor 0,9998, e a equação da reta pode ser vista abaixo:

$$y = 744,04x + 5,4463 \quad (4)$$

Com os padrões medidos, é possível estabelecer uma linearidade quanto a resposta na detecção de LASS e um limite de detecção de $0,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação ao LASS como analito, bem como averiguar o tempo de corrida onde o analito começa a eluir e demonstrar sinal no detector. Após esta etapa, foi feita a quantificação por adição de padrão, pesando em duplicata uma quantidade de amostra adequada, em um frasco dissolve-se a amostra com solvente adequado e avolumar; e em outro frasco adiciona-se uma quantidade de analito a ser analisado nesta amostra, de modo a se obter o dobro de área obtido na amostra tal qual.

3.2.5 Determinação da concentração de Glicerina por Cromatografia Gasosa

A quantidade de glicerina presente nas duas amostras de detergente lava-louças foi determinada utilizando a técnica de cromatografia a gás, efetuada no laboratório de desenvolvimento analítico da Clariant, em Suzano pela equipe do laboratório central. Após a etapa de calibração do equipamento, pesa-se uma massa adequada do padrão de glicerina a ser analisado e realiza-se as diluições de modo a compreender a concentração do analito dentro da faixa de calibração utilizada que varia entre 0,11 e 3,0 mg.mL^{-1} , repetindo o procedimento pesando uma massa adequada do detergente a ser analisado de modo que a área obtida fique o mais próximo possível da área da amostra. Na Figura 3 do anexo é possível ver os cromatogramas dos padrões de glicerina utilizados, enquanto na Figura 4 do anexo é possível ver a curva de calibração dos padrões de glicerina, sendo o coeficiente de correlação apresentado com valor de 0,9956, e a equação da reta pode ser vista abaixo:

$$y = 111,32x - 15,052 \quad (5)$$

Com os padrões medidos, é possível estabelecer uma linearidade quanto a resposta na detecção de glicerina e um limite de detecção de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ em relação à glicerina como analito, bem como averiguar o tempo de corrida onde o analito começa a eluir e demonstrar sinal no detector. Após esta etapa, foi feita a quantificação por adição de padrão, pesando em duplicata uma quantidade de amostra adequada, em um frasco dissolveu-se a amostra com Metanol e avolumou-se; e em outro frasco adicionou-se uma quantidade do padrão de glicerina a ser analisado nas amostras comerciais, de modo a se obter o dobro de área obtido na amostra tal qual. A análise foi feita em coluna cromatográfica capilar de sílica fundida adequada, temperatura do injetor entre 150°C e 260°C , com a temperatura do detector de ionização de chama (DIC ou FID em inglês) entre 250°C e 320°C .

3.2.6 Determinação e Quantificação de Metais por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)

A determinação e quantificação de metais nas amostras de detergentes lava-louças foi feita no

laboratório de desenvolvimento analítico da Clariant, em Suzano pela equipe do laboratório central. Para a determinação de metais nos produtos analisados, efetuou-se a Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES em inglês), efetuando-se a varredura para 39 elementos diferentes, baseando-se na normativa *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater da American Public Health Association* (APHA), seguindo como comprimento de onda identificador de cada um dos elementos, os parâmetros indicados na normativa. Para a leitura das amostras, foi previamente feita a digestão ácida em forno micro-ondas por 1 hora, utilizando ácido nítrico 5% v/v. As amostras foram lidas e analisadas em duplicata com o auxílio do ICP OES Varian 720-ES e software apropriado.

4. Resultados e discussões

4.1 Análise de Contagem Microbiana *Pour Plate* em amostras de mercado

Os resultados das análises após o período de incubação estão contidos na tabela resumo abaixo:

Tabela 1 - Resultados das análises de contagem total dos detergentes lava-louças com variação dos caldos inativantes.

Descrição da Amostra	pH da Amostra	Contagem Total UFC/mL	
		Caldo TAT	Caldo D/E
Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina -	6,67 ± 0,01	2,0 ± 0,02.10 ¹	6,4 ± 0,15.10 ²
Detergente Lava-Louças Neutro	6,34 ± 0,01	6,6 ± 0,10 10 ⁴	2,2 ± 0,25.10 ⁶

Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 1 acima demonstra que as contagens microbianas para ambos os caldos e para ambas as amostras, tiveram valores de recuperação bacteriana em ordens de grandeza diferentes, o que é um indício de que mensurar de fato qual é a magnitude da contaminação microbiana dessas amostras pode ser complexo, uma vez que os caldos utilizados demonstram resultados distintos.

Foi feito também análises de pH para ambos os detergentes lava-louças, a fim de verificar as diferenças físico-químicas das amostras, verificando que os dois produtos medidos possuem uma faixa de pH levemente ácida, mas muito próxima do pH neutro.

4.2 Validação do Caldo Inativante

4.2.1 Teste A - Efetividade dos caldos inativantes

Com esse procedimento, é possível avaliar por meio de um cálculo de recuperação microbiana, se os caldos inativantes de fato neutralizam o produto testado. Como critério de avaliação para esse teste, a recuperação microbiana deve estar entre 50 e 200% em relação ao crescimento do inóculo. Os resultados obtidos no Teste A podem ser vistos na Tabela 2, demonstrando que nenhum dos dois caldos inativantes desempenharam dentro da faixa entre 50 e 200% de recuperação para nenhuma das amostras de detergentes lava-louças com nenhum dos microrganismos testados.

Tabela 2 - Resultados das análises do Teste A da norma ASTM E1054 e avaliação do critério de aceitação, levando em conta os detergentes lava-louças com variação dos caldos inativantes e dos microrganismos. Todos os resultados estão expressos em 10^6 UFC/mL

Amostra	Microrganismo	Contagem do teste (10^6 UFC/mL)	Caldo	Contagem do inóculo (10^6 UFC/mL)	Recuperação (%)	Critério de Aceitação
Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	4,3 ± 0,2	Dey Engley	310 ± 10	1,4	×
		45 ± 1	TAT		14,5	×
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	30 ± 4	Dey Engley	200 ± 1	14,9	×
		15 ± 3	TAT		7,3	×
Detergente Lava-Louças Neutro	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8,4 ± 4,2	Dey Engley	310 ± 10	2,7	×
		2,8 ± 0,7	TAT		0,9	×
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	29 ± 2,0	Dey Engley	200 ± 1	14,4	×
		22 ± 3	TAT		10,9	×

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.2 Teste B - Toxicidade dos caldos inativantes

No teste B o objetivo é verificar se os caldos neutralizantes utilizados possuem algum tipo de toxicidade em relação aos microrganismos testados, ou seja, se essas substâncias exercem atividade bactericida ou restringem de alguma forma o crescimento populacional das bactérias testadas. Verificar a toxicidade dos caldos é importante já que o objetivo de toda a norma ASTM E1054 é analisar a recuperação dos microrganismos utilizados. Os resultados obtidos no Teste B podem ser vistos na Tabela 3, que apresenta um resumo dos resultados obtidos no Teste B, demonstrando que nenhum dos dois caldos inativantes tiveram resultados dentro da faixa esperada para nenhuma amostra de detergentes lava-louças com nenhum dos microrganismos testados.

É importante notar que na Tabela 3, os resultados da contagem do Teste A estão representados, pois os critérios de aceitação do Teste B estão relacionados com o Teste A, uma vez que o Teste B serve como controle positivo do Teste A. A recuperação percentual obtida pelo teste B possui alta variabilidade, que pode ser relacionada à variabilidade da composição das duas amostras e dos caldos.

Tabela 3 - Resultados das análises do Teste B da norma ASTM E1054 e avaliação do critério de aceitação, levando em conta os detergentes lava-louças com variação dos caldos inativantes e dos microrganismos. Todos os resultados estão expressos em 10^6 UFC/mL.

Amostra	Caldo	Microrganismo	Contagem do Teste A (10^6 UFC/mL)	Contagem do Teste B (10^6 UFC/mL)	Recuperação (%)	Critério de Aceitação
Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina	Dey Engley	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$4,3 \pm 0,2$	43 ± 2	9,3	✗
	TAT		45 ± 1	45 ± 3	96,8	✓
	Dey Engley	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	30 ± 4	16 ± 1	190,3	✓
	TAT		15 ± 3	31 ± 5	48,1	✗
Detergente Lava-Louças Neutro	Dey Engley	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$8,4 \pm 4,2$	43 ± 2	18,4	✗
	TAT		$2,8 \pm 0,7$	45 ± 3	5,9	✗
	Dey Engley	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	29 ± 2	16 ± 1	183,2	✓
	TAT		22 ± 3	31 ± 5	72,1	✓

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.3 Teste C - Viabilidade dos microrganismos

Já no teste C o objetivo é verificar se os microrganismos testados estavam viáveis no momento do teste, ou seja, se estes demonstraram o crescimento esperado se todas as condições analíticas fossem de fato favoráveis. Os resultados obtidos no Teste C podem ser vistos na Tabela 4, demonstrando que todos os microrganismos utilizados nos testes estavam de fato viáveis, e que sua capacidade de crescimento e recuperação estavam dentro dos limites declarados no método de validação dos caldos inativantes.

Tabela 4 - Resultados das análises do Teste C da norma ASTM E1054 e avaliação do critério de aceitação, levando em conta os microrganismos testados. Todos os resultados estão expressos em 10^8 UFC/mL

Microrganismo	Caldo	Contagem do inóculo (10^8 UFC/mL)	Recuperação (%)	Critério de Aceitação
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Tampão Fosfato	$3,1 \pm 0,1$	77,3	✓
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		$2,0 \pm 0,1$	107,8	✓

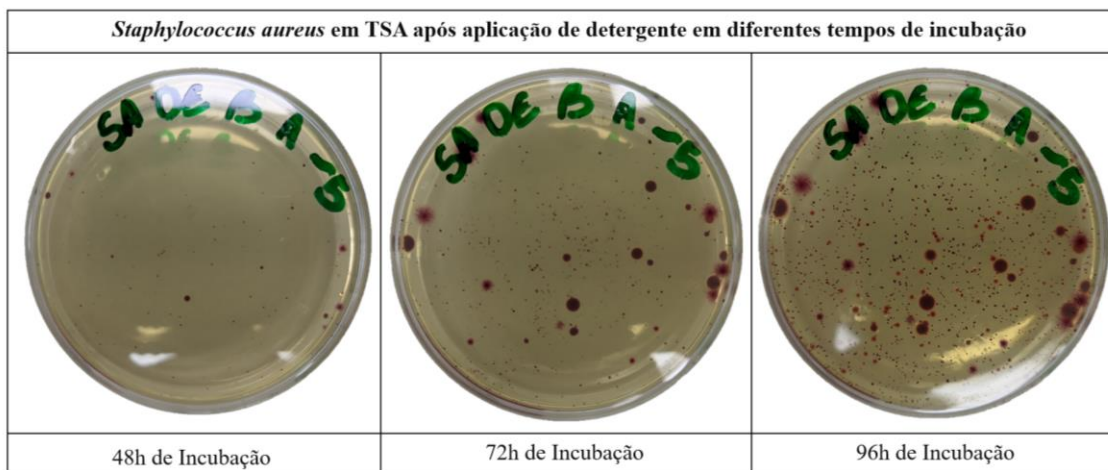
Fonte: Dados da pesquisa.

4.3 Avaliação do tempo de incubação

Devido aos resultados dos testes de validação dos caldos inativantes não terem apresentado resultados positivos, decidiu-se avaliar se esses resultados seriam influenciados pelo tempo de incubação das placas inoculadas. As bactérias inoculadas estavam em contato direto com detergentes durante o Teste A, e devido ao fato de que essas amostras são conhecidamente ativas contra bactérias é de se esperar que o

crescimento microbiano seria negativamente afetado, ou seja, as bactérias cresceriam em um ambiente estressante que dificultaria sua multiplicação populacional, por isso optou-se por manter as amostras inoculadas no Teste A da validação dos caldos inativantes por períodos mais longos do que o usual. Segundo a norma E1054, o crescimento bacteriano é avaliado com 48 horas de incubação, e decidiu-se avaliar também em períodos maiores de 72 e 96 horas. Uma das avaliações possíveis de se fazer é a análise visual comparativa das placas inoculadas ao longo do tempo. A comparação pode ser vista na Tabela 5, abaixo:

Tabela 5 - Visualização do crescimento de *Staphylococcus aureus* após a aplicação em detergentes em 48, 72 e 96 horas.

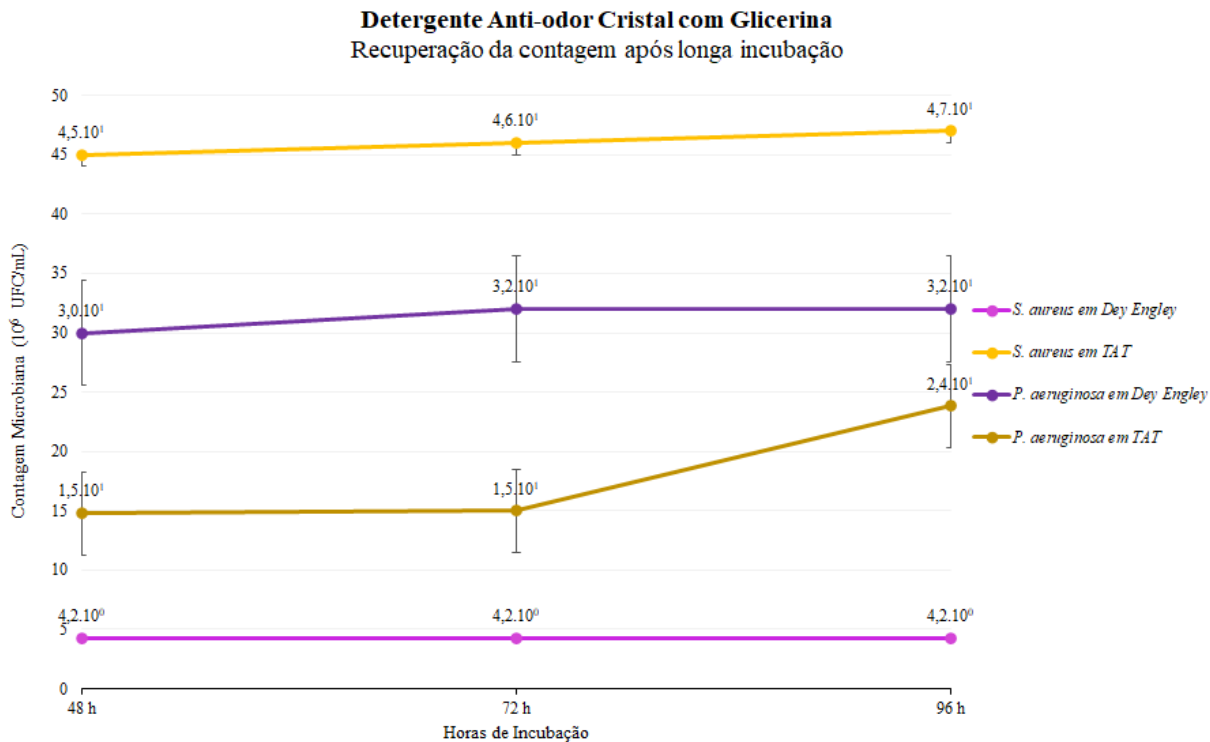


Fonte: Dados da pesquisa.

É possível ver uma clara mudança na quantidade e no tamanho das colônias de *S. aureus*, sinalizadas pelas manchas vermelhas sobre o ágar TSA. A coloração vermelha é vista pela introdução do corante cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), utilizado especialmente para aumentar o contraste e a precisão ao contar colônias bacterianas, já que este é um corante que muda de cor após a sua redução ser catalisada pela respiração celular. Um benefício notável no aumento do tempo de incubação é o tamanho das colônias visualizadas já que com 48 horas de incubação um grande número de colônias puntiformes (com tamanho inferior à 1 mm) estavam presentes. Esse tipo de morfologia torna a contagem visual de colônias muito mais difícil e exaustiva, já que o analista deve forçar a visão para notar os pequenos pontos vermelhos. Com o aumento no tempo de incubação, a morfologia das colônias aumentou bastante em tamanho, facilitando a contagem e diminuindo possíveis erros.

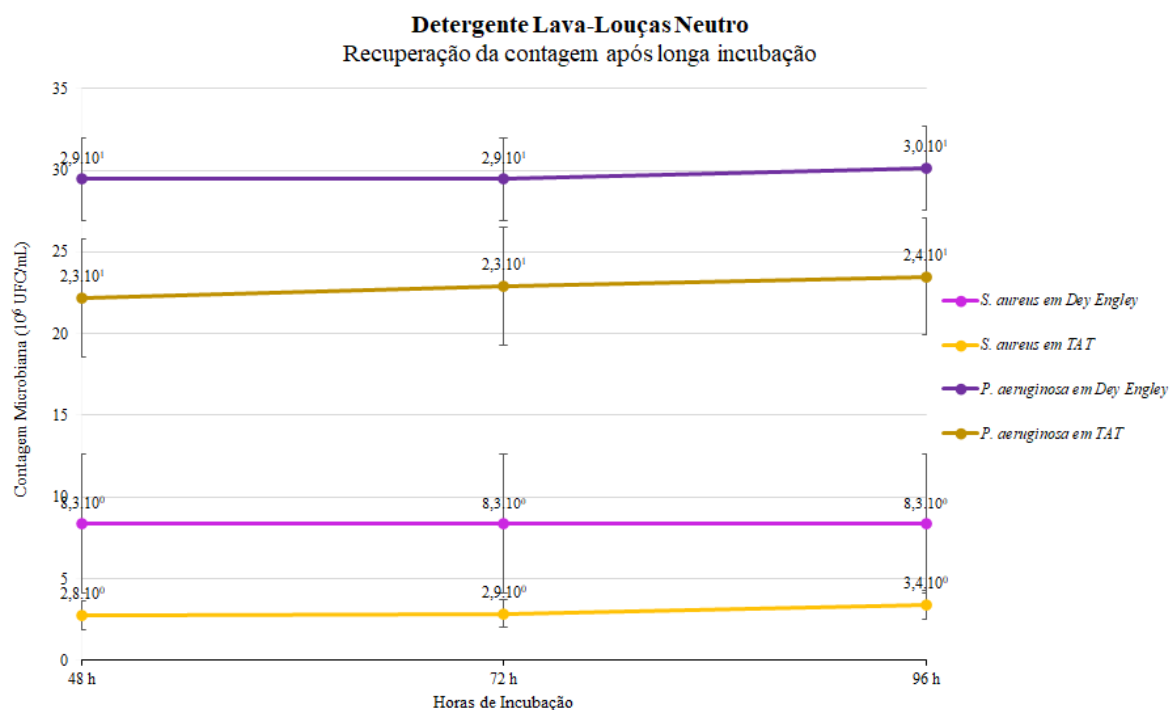
A avaliação qualitativa demonstrou uma mudança visual significativa no tamanho das colônias crescidas em ágar, além disso, a avaliação quantitativa também foi efetuada, a fim de obter uma diferenciação mais precisa no crescimento bacteriano. As Figuras 3 e 4 abaixo mostram os comparativos de crescimento bacteriano podem ser vistos abaixo:

Figura 3 - Crescimento bacteriano nas placas inoculadas com o detergente lava-louças Anti-odor Cristal com Glicerina ao longo de 48, 72 e 96 horas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 4 - Crescimento bacteriano nas inoculadas com o detergente lava-louças Anti-odor Cristal com Glicerina ao longo de 48, 72 e 96 horas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Ao analisar os gráficos acima é possível avaliar que poucas variações aconteceram do ponto de vista quantitativo, pois por mais que algumas contagens tenham aumentado o valor, nenhuma delas teve um

aumento suficiente para que houvesse uma mudança logarítmica sensível. Do ponto de vista de laboratórios industriais com uma alta demanda de análises de contaminação, um método deve ser significativamente mais sensível e mais preciso para aumentar o tempo de análise para 72 ou 96 horas, o que não é visto na análise feita acima.

4.4 Avaliação do tempo de inativação

Também tentando trabalhar com as diferentes variáveis inerentes aos testes de contagem microbiológica, testou-se uma variação no tempo de inativação. A normativa da ASTM E1054 indica como tempo de inativação ideal como de 20 minutos, ou seja, esse é o tempo que o detergente em questão (ou qualquer outra molécula bioativa) deve se manter em contato com o inativante para que este consiga de fato neutralizar a ação antimicrobiana da molécula a ser avaliada. Como nos testes anteriores a recuperação microbiana não foi compatível com o esperado e teve grande variação, optou-se por investigar o aumento do tempo de inativação para cada uma dos detergentes e dos caldos testados. Optou-se por refazer os testes de contagem, mas dessa vez não só com o tempo de contato de 20 minutos, mas também com 40 e 60 minutos de inativação, seguindo todo o procedimento descrito, alterando somente o tempo de contato da amostra com o inativante. O procedimento foi feito separadamente e em duplicata para cada uma das amostras testadas, e para cada um dos caldos inativantes a serem comparados. Os critérios de aprovação foram mantidos iguais aos recomendados pela normativa ASTM E1054, ou seja, aprovação com as recuperações microbianas entre 50 e 200% em relação ao inóculo. Abaixo, segue a Tabela 6, com os resultados das análises com as médias calculadas e a recuperação obtida.

É possível interpretar os dados obtidos com essa análise de diversas formas, sendo primeiramente notável como houve pouca variação entre os resultados de 20, 40 e 60 minutos para cada um dos caldos inativantes testados. As variações no geral foram incapazes de mudar a aprovação de cada uma das análises e para isso, sinalizou-se na tabela em verde os resultados dentro da faixa de aprovação (recuperação entre 50 e 200%), e em vermelho os resultados fora do intervalo aceitável. Há de se notar também que o único resultado em que o tempo de inativação foi responsável por uma mudança na aprovação do resultado foi para a análise do caldo Dey Engley para a amostra Detergente Lava-Louças Neutro inoculado com *S. aureus*. Essa mudança é atribuída à uma variação no percentual de contagem em uma faixa limítrofe ao critério inferior de aprovação, dessa maneira, variações sutis podem modificar o resultado final. Devido a isso, na Tabela 6 a aprovação está sinalizada com um traço amarelo.

Tabela 6 - Médias das análises das contagens com tempos de inativação estendidos (20, 40 e 60 minutos) para cada uma das amostras, microrganismos e inativantes testados. Todos os resultados estão expressos em 10^6 UFC/mL.

Amostra	Microorganismo	Caldo inativante	20 minutos		40 minutos		60 minutos		Aprovação
			Contagem (10^6 UFC/mL)	Recuperação (%)	Contagem (10^6 UFC/mL)	Recuperação (%)	Contagem (10^6 UFC/mL)	Recuperação (%)	
Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Dey Engley	0,2 ± 0,01	4,4 ± 0,0	0,2 ± 0,01	4,6 ± 0,0	0,1 ± 0,01	4,1 ± 0,1	✗
		TAT	2,5 ± 0,1	73,1 ± 0,4	4,0 ± 0,1	119,1 ± 1,5	2,1 ± 0,1	62,6 ± 0,6	✓
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Dey Engley	1,4 ± 0,2	88,9 ± 1,6	2,3 ± 0,1	146,5 ± 0,3	9,6 ± 0,1	60,4 ± 0,3	✓
		TAT	1,7 ± 0,2	105,4 ± 0,9	9,9 ± 0,1	62,7 ± 0,6	1,6 ± 0,1	103,8 ± 0,6	✓
Detergente Lava-Louças Neutro	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Dey Engley	1,8 ± 0,5	51,5 ± 1,5	1,5 ± 0,1	42,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	51,6 ± 0,1	—
		TAT	3,6 ± 0,1	105,9 ± 2,9	3,8 ± 0,1	111,8 ± 2,9	4,1 ± 0,1	119,1 ± 1,5	✓
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Dey Engley	4,1 ± 0,1	259,5 ± 6,3	3,7 ± 0,1	234,2 ± 6,3	3,3 ± 0,1	208,9 ± 0,0	✗
		TAT	3,2 ± 0,1	199,4 ± 3,2	1,9 ± 0,1	120,9 ± 0,6	3,1 ± 0,1	193,0 ± 3,1	✓

Fonte: Dados da pesquisa.

É possível detectar como para ambos os detergentes, e para ambas as bactérias testadas, a utilização do Caldo TAT se mostrou mais eficaz já que a recuperação microbiana sempre oscilou entre 50 e 200% em relação à concentração inoculada, porém é possível detectar grande variação nos resultados entre os diferentes tempos de inativação.

Essa flutuação dos resultados pode ser explicada por diferenças pontuais durante a análise como diferença na pipetagem, homogeneização da amostra ou outros fatores atrelados ao momento da análise, entretanto mesmo considerando esses fatores, a flutuação não foi esperada, já que os resultados de duplicata não tiveram diferença significativa, o que é indicado pelos valores de desvio padrão encontrados na tabela 6.

A diferença entre esses resultados põe sob evidência a necessidade de estudar como esses inativantes realmente funcionam na interação com detergentes lava-louças. Há a possibilidade de que uma homogeneização mais efetiva seja necessária para a inativação ou até que parte do detergente não tenha sido inativado, acompanhando então a amostra até seu plaqueamento. A inativação parcial das amostras atrapalha o crescimento bacteriano normal, já que moléculas responsáveis pela lise celular estariam presentes junto com o meio de cultura e as próprias bactérias, causando um estresse celular que diminuiria a recuperação do inóculo.

Também há de se observar que os comportamentos e interações entre os dois caldos testados e os dois detergentes avaliados variaram bastante, dando a entender que essas duas amostras de mercado, apesar de terem a mesma função e categoria de produto, possam variar bastante em relação à composição.

Sendo assim, estabelece-se como melhor tempo de inativação um intervalo entre 20 e 40 minutos, já que para análises de controle de qualidade (com grande quantidade de amostras), o custo-benefício de uma inativação prolongada não é justificada.

4.5 Mudança nos meios de cultura

Um dos meios de cultura mais utilizados para o crescimento de bactérias mesófilas totais é o ágar TSA (TERRONES-FERNANDEZ et al., 2023), que é um meio altamente nutritivo, mas que não possui nenhum componente que limite o crescimento microbiano. Alguns meios de cultura disponíveis no mercado se destacam por conter substâncias com capacidade inativadora em sua composição, e são utilizados justamente para os casos onde o processo de análise antes do plaqueamento não pode ser inativado. A utilização desses meios normalmente se dá quando a técnica de plaqueamento e cultivo não é a *pour plate* mas sim a de estriamento. Nessa técnica a amostra é coletada em *swab* ou alça e esfregada diretamente no ágar sólido e como nessa amostra podem existir moléculas que inibem ou retardam o crescimento microbiano, ter no próprio meio de cultura sólido um inativante, pode possibilitar uma melhor recuperação.

Optou-se por utilizar meios com inativantes em sua formulação nos testes *pour plate* para que caso a inativação por caldo não seja suficiente, uma segunda inativação aconteça já na placa sólida. Para essa avaliação utilizou-se os mesmos caldos inativantes líquidos dos testes anteriores Caldo D/E e Caldo TAT, mas agora em associação com meios de cultura modificados. Os meios escolhidos foram o TSA com inativante, Ágar Dey-Engley modificado e Ágar Lethen modificado. Os dois últimos meios foram modificados em laboratório ao adicionar 20% do conteúdo indicado em ágar-ágar como gelificante, ou seja, para produzir o Ágar Dey-Engley adicionou-se 20% de àgar-àgar em relação à massa indicada de Caldo Dey-Engley desidratado. O mesmo processo foi feito com o Ágar Lethen modificado, enquanto o TSA com inativante foi adquirido da marca Plastilabor. A Tabela 7 lista os componentes de cada um dos meios utilizados, para a preparação de um litro de meio de cultura.

Tabela 7 – Composição dos meios de culturas modificados empregados no teste de inativação prolongada.

Composição dos meios de cultura modificados (Para 1L de meio preparado)			
Componentes	TSA com Inativante	Lethen Ágar Modificado	Dey Engley Ágar
	Digerido Pancreático de Caseína (15,0g)	Peptona de carne (20,0g)	Hidrolisado enzimático de caseína (5,0g)
	Peptona de Soja (5,0g)	Peptona de Caseína (5,0g)	Extrato de Levedura (2,5g)
	Cloreto de Sódio (5,0g)	Lecitina (0,7g)	Dextrose(10,0g)
	Lecitina (0,7g)	Bissulfito de Sódio (0,10g)	Tiosulfato de Sódio (6,0g)
	Polissorbato 8 (5,0g)	Extrato de Levedura (2,0g)	Tioglicolato de Sódio (1,0g)
	Ágar (20,0g)	Extrato de Carne (5,0g)	Bissulfito de Sódio (2,5g)
	Água desmineralizada q.s.p.	NaCl (5,0g)	Lecitina (7,0g)
		Ágar (20,0g)	Polissorbato 8 (5,0g)
Água desmineralizada q.s.p.		Ágar (20,0g)	
		Púrpura de Bromocresol (0,02g)	
	Água desmineralizada q.s.p.		
Fabricante	Plastlabor	Merck	Sigma Aldrich

Fonte: Dados da pesquisa.

Os testes com os novos meios de cultura foram feitos apenas com a inoculação de *P. aeruginosa* ATCC 15442, em uma concentração de $1,6 \times 10^6$ UFC/mL, e os critérios de aprovação juntamente com o procedimento de inoculação e contagem continuam os mesmos da ASTM E1054. Os resultados das combinações entre os inativantes líquidos e os meios de cultura com inativantes são mostrados na tabela 8, onde é possível ver que os testes com o caldo TAT e TSA c/ inativante não puderam ser efetuados devido à pequena quantidade de placas de TSA disponíveis.

Tabela 8 - Média das análises das contagens com meios de cultura com inativantes incorporados para cada uma das amostras, inativantes líquidos testados. Todos os resultados estão expressos em 10^3 UFC/mL.

Amostra	Caldo Inativante	Meio de Cultura	Contagem (10^3 UFC/mL)	Recuperação (%)	Aprovação
Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina	Dey Engley	D/E Ágar	28 ± 1	1,3	✗
		Lethen Ágar	< 10	0	✗
		TSA c/ Inativante	$7,5 \pm 0,5$	0,5	✗
	TAT	D/E Ágar	36 ± 1	2,3	✗
		Lethen Ágar	< 10	0	✗
		TSA c/ Inativante	N/A	N/A	—
Detergente Lava-Louças Neutro	Dey Engley	D/E Ágar	14000 ± 1000	90,2	✓
		Lethen Ágar	30000 ± 1000	186,7	✓
		TSA c/ Inativante	19000 ± 1000	119	✓
	TAT	D/E Ágar	11000 ± 1000	68,4	✓
		Lethen Ágar	18000 ± 1000	116,5	✓
		TSA c/ Inativante	N/A	N/A	—

Fonte: Dados da pesquisa.

É importante notar como todos os resultados para o Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina tiveram uma taxa de recuperação muito baixa, enquanto a amostra de Detergente Lava-louças Neutro teve todas as recuperações dentro do intervalo entre 50 e 200%. Essa variação é ainda mais evidente ao se analisar que todos os reagentes, meios de cultura e inóculos utilizados foram os mesmos, e a única variável nos testes era de fato a interação de cada amostra com os diferentes inativantes utilizados.

4.6 Caracterização das amostras de Detergentes Lava-louças

Levando em conta que o estabelecimento de um método robusto para a contagem microbiana em amostras de detergentes lava-louças passa diretamente pela capacidade desse método em responder com boa recuperação e com pouca variação para os diferentes tipos de amostras presentes no mercado. Por isso, investigar o quanto as duas amostras analisadas diferem entre si se torna uma necessidade, já que suas composições podem ter variáveis importantes que podem ou não serem inativadas

4.6.1 Determinação da concentração de Água via Karl Fischer

Os microrganismos no geral, mas especialmente as bactérias precisam de certa quantidade de água nos ambientes em que vivem, para crescerem tanto quanto eles podem. A quantidade de água na maioria das vezes é proporcional à susceptibilidade de uma amostra à contaminação bacteriana, ou seja, quanto maior o teor de água em uma amostra, mais ela pode manter o crescimento bacteriano e por isso é importante determinar a quantidade de água presente nas amostras (PELEG, 2022). Se as amostras possuírem uma quantidade menor de água, isso significa que os microrganismos não estarão nas melhores condições para seu crescimento. Segundo Kemel e colaboradores, a umidade pode limitar a atividade microbiana em uma ampla gama de formas e a baixa disponibilidade de água pode inibir a atividade microbiana, aumentando a fase *lag* de crescimento e diminuindo o potencial hídrico intracelular e, assim, reduzindo a hidratação causando uma diminuição sensível no crescimento máximo das colônias (KEMEL et al., 2018).

Por isso, optou-se por determinar a água das duas amostras de detergentes do mercado com o método de titulação por Karl Fischer. Neste método a amostra de detergente foi dissolvida em metanol e titulada com o reagente Karl-Fischer, que é uma mistura de iodo, dióxido de enxofre e piridina. Enquanto a água estiver presente o iodo é reduzido a ácido iodídrico. O ponto final é dado pela presença de iodo livre que pode ser determinado eletronicamente. Os resultados para a concentração de água foram obtidos em duplicata para cada uma das amostras e o resultado médio foi de $89,4 \pm 0,06\%$ m/v de água para o Detergente Lava-Louças Neutro e $88,8 \pm 0,05\%$ m/v de água na formulação do Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina. Os resultados mostram que as formulações dos detergentes analisados em geral são majoritariamente formadas por água, sendo que o alto teor de água nessas formulações é um indicativo de que há uma tendência à suscetibilidade de contaminação bacteriana desse tipo de produto.

4.6.2 Determinação do teor de Sólidos

Uma das maneiras possíveis para monitorar os compostos de interesse em uma formulação é acompanhar o teor de sólidos da mesma, ou seja, saber o quanto daquele material não é volátil à uma determinada temperatura. Tendo conhecimento do volume de água da amostra pela análise de Karl Fischer e o quanto a fórmula tem de sólidos, é possível calcular também o conteúdo de líquidos voláteis que não são água.

Os resultados do teor de sólidos totais foram feitos em triplicata para cada uma das amostras de detergente testadas, e o resultado médio foi de $9,27 \pm 0,12\%$ m/m de resíduo sólido no Detergente Lava-Louças Neutro e $6,9 \pm 0,10\%$ m/m de resíduo sólido na formulação do Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina. A diferença no teor de resíduos sólidos das duas amostras é sutil, porém denota que a quantidade de outros compostos voláteis pode ser significativa, se considerarmos aquilo que não é água e nem foi volatilizado na análise de resíduos sólidos, o Detergente Lava-Louças Neutro possui um teor de voláteis no entorno de 1,4% enquanto o Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina possui 4,3% de compostos voláteis que não são água. Essa diferença entre a quantidade de componentes voláteis para além da água é a primeira evidência de que as duas formulações possuem diferenças significativas.

4.6.3 Matéria Ativa Aniônica Total

A matéria ativa aniônica é determinada por titulação volumétrica de duas fases com uma solução padrão de matéria catiônica que pode ser cloreto de benzalcônio ou cloreto de benzetônio, também chamado de Hyamine 1622, na presença de uma mistura de um indicador catiônico e um indicador aniônico também chamado de indicador misto. Este método é aplicável a análise de compostos alquilbenzenos sulfonados, alquilsulfonados, sulfatos e hidroxissulfatos, alquilfenóis e álcoois etoxissulfatados, dialquilsulfossuccinatos e para a determinação de matéria ativa contendo um grupo hidrofílico por molécula. Os detergentes de mercado, normalmente possuem como ativo principal compostos aniônicos que se classificam nessa lista.

Os resultados de matéria ativa aniônica fornecem quanto de ativo a formulação em questão possui em sua composição, já que os surfactantes aniônicos são os principais compostos a promoverem a limpeza em produtos lava-louças. Os resultados das titulações foram obtidos em duplicata para cada uma das amostras e a média foi de $7,1 \pm 0,04\%$ de matéria ativa aniônica para o Detergente Lava-Louças Neutro e $5,5 \pm 0,03\%$ de ativo aniônico na formulação do Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina.

A diferença entre as duas amostras para a concentração de matéria ativa catiônica é no entorno de 1,6%, o sendo essa uma diferença que pode influenciar na susceptibilidade bacteriana, ou seja, a quantidade superior de ativo que o Detergente Lava-Louças Neutro pode tornar a contaminação microbiana inviável.

4.6.4 Determinação de Linear Alquilbenzeno Sulfato de Sódio (LASS) por HPLC

O Linear Alquilbenzeno Sulfato de Sódio, também chamado de LAS ou LASS é a principal molécula

ativa surfactante de detergentes lava-louças domésticos, contêm uma longa porção apolar (hidrofóbica) e um pequeno grupo polar (hidrofílico), caracterizando-se como uma molécula aniônica. Dessa forma, o detergente interage tanto com a gordura (parte apolar) quanto com a água (parte polar) e promove a limpeza das superfícies. Nas Figuras 5 e 6 do anexo, é possível ver os cromatogramas sobrepostos do padrão de LAS com a amostra de Detergente Lava-Louças Neutro e Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina respectivamente. Analisando os cromatogramas, é possível detectar que a amostra de Detergente Lava-Louças Neutro possui $5,0 \pm 0,16\%$ de Linear Alquilbenzeno Sulfato de Sódio, enquanto o Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina possui $5,2 \pm 0,04\%$ de sua composição sendo como ativo LASS.

Com base na quantidade de LASS e nos valores de matéria ativa aniônica do obtidos anteriormente, é possível afirmar que há a presença de outros surfactantes aniônicos em ambas as amostras de detergentes de mercado. Com uma subtração é possível determinar que a amostra de Detergente Lava-Louças Neutro possui em média 2,0% de ativos aniônicos diferentes de LASS, enquanto a amostra Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina possui entorno de 0,3% de outros ativos aniônicos diferentes de LASS.

4.6.5 Determinação da Concentração de Glicerina por Cromatografia Gasosa

Uma das grandes diferenças entre as duas amostras selecionadas é que em seus rótulos uma das amostras claramente descreve a utilização da glicerina em sua composição, enquanto a outra amostra omitiu essa informação. Em detergentes lava-louças, a adição de glicerina pode se dar por diversos aspectos pois esse componente pode dar estabilidade à formulação, agir como umectante, ou até mesmo como solvente para incorporação facilitada de outras substâncias. O estudo da quantidade de glicerina na composição de uma formulação é importante, já que essa molécula possui efeitos interessantes no contato com microrganismos. Altas concentrações de glicerina podem fazer com que diversos microrganismos entrem em choque osmótico, ou seja, a quantidade de osmólito fora da célula é tão grande que impede a bactéria de liberar água de seu interior, causando um inchaço celular e uma dificuldade na multiplicação bacteriana. Já em menores concentrações, (mais especificamente abaixo de 2%) a glicerina não afetará o equilíbrio osmótico e conforme mostrado no artigo Nawalade et al, a glicerina possui pouca ou nenhuma atividade bactericida, sendo uma importante fonte de carbono para a multiplicação celular (NALAWADE, BHAT e SOGI, 2015). Desta forma, podemos avaliar que a glicerina impacta negativamente o crescimento bacteriano em altas concentrações, mas em quantidades pequenas pode servir como meio de cultura, promovendo o crescimento populacional bacteriano.

Ao se analisar matrizes complexas com uma alta quantidade de picos, é de extrema importância a análise do padrão isolado para o composto de interesse, para auxiliar na detecção e identificação da molécula no cromatograma. Nas figuras 7 e 8 do anexo vê-se os cromatogramas das amostras Detergente Lava-Louças Neutro e Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina respectivamente, dando foco na região do pico de glicerina.

Para a amostra de Detergente Lava-Louças Neutro a quantificação de glicerina na composição foi menor do que 0,01%, ou seja, obteve valores inferiores ao limite de detecção. Já para a amostra Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina a concentração de glicerina foi de $0,14 \pm 0,01\%$.

Esses valores são mais um indicativo que as duas formulações diferem bastante quanto à sua composição, não só em relação às quantidades de cada componente, mas também à presença ou não de determinadas moléculas. No caso da glicerina avalia-se então que a amostra Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina possui uma quantidade inferior à 2%, que não afetaria negativamente o equilíbrio osmótico das células e serviria de alimento para as bactérias inoculadas, sendo assim essa amostra se mostra, nesse quesito, mais suscetível à contaminação microbiana do que o Detergente Lava-Louças Neutro.

4.6.6 Determinação e Quantificação de Metais por ICP-AES

O crescimento bacteriano pode ser influenciado por diversos metais, devido às interações desses metais com a superfície celular das bactérias, nesse caso se faz importante a investigação dos metais nas suas formulações testadas. Para a determinação de metais nos produtos analisados, efetuou-se a espectrometria via ICP-AES, efetuando-se a varredura para diversos elementos. Metais com conhecida atividade biocida como Cobre, Alumínio, Zinco, Zircônio, Prata, Paládio entre outros 32 elementos, não foram encontrados em quantidades acima dos limites de detecção.

Apenas os elementos listados na Tabela 9 a seguir foram encontrados em quantidades significativas, e os resultados médios encontrados são descritos na tabela abaixo:

Tabela 9 - Resultado das varreduras dos metais em quantidades superiores aos limites de quantificação em ICP-AES

Elemento	Concentração (ppm)	
	Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina	Detergente Lava-Louças Neutro
Cálcio	14	20
Enxofre	7912	11120
Fósforo	4,4	<1,5
Magnésio	1602	2294
Potássio	7,4	72
Silício	6	3,4
Sódio	4048	5558

Fonte: Dados da pesquisa.

O sódio e o enxofre possuem como origem óbvia a composição de seus ativos surfactantes, que possuem os dois elementos em sua composição, o que explica as altas concentrações identificadas nas amostras. O potássio está muito mais presente na amostra do detergente neutro, sendo mais uma evidência da diferença entre os dois componentes, sendo algo crítico pois alguns microrganismos tem seu crescimento

inibido devido à presença de potássio e seus sais (SUTRISNO, et al., 2020). O magnésio também foi encontrado em altas quantidades nas duas formulações, mas com uma notável diferença entre as concentrações obtidas, sendo que a sua origem na formulação também deve ser investigada. O magnésio possui atividade antimicrobiana conhecida e estudada, e por isso, para uma análise de contagem microbiana, esse tipo de elemento deve ser neutralizado (HUANG, et al., 2018). Outros elementos detectados como o Cálcio, Fósforo e Silício foram encontrados em concentrações relativamente baixas, com um impacto bem menor no crescimento microbiano do que os outros elementos citados anteriormente.

5. Considerações Finais

Com o presente trabalho conclui-se que a contagem microbiana *pour plate* não é um método indicado para a análise quantitativa de bactérias gram-positivas ou gram-negativas em detergentes lava-louças, mesmo com a variação de características importantes do método como o tempo de inativação, tempo de incubação ou tipo do inativante. A avaliação dos caldos inativantes pela metodologia ASTM E1054 indica que nenhum dos inativantes utilizados é suficientemente eficaz na neutralização dos detergentes lava-louças, o que pode ser relacionado com a alta complexidade da amostra trabalhada.

A investigação da composição e caracterização das duas amostras de mercado escolhidas, mostrou que há uma grande variedade de compostos que diferem em presença e concentração entre os dois produtos analisados. A diferença nas concentrações de ativos surfactantes, a presença de glicerina bem como a alta variedade de metais encontrados nas duas formulações evidencia que detergentes lava-louças não são uma classe de produtos homogênea, sendo assim de difícil comparação.

Conclui-se também que devido à complexidade e variância das amostras de detergentes lava-louças, uma neutralização eficiente para todos os produtos dessa categoria é de extrema complexidade e inviabiliza a utilização do método *pour plate* como contagem microbiana quantitativa, requerendo assim estudos futuros sobre a escolha de outras metodologias.

6. Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 22° Edição. Estados Unidos da América, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM E1054: Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents. Estados Unidos da América: **ASTM**, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS DE HIGIENE, LIMPEZA E SANEANTES DE USO DOMÉSTICO E USO PROFISSIONAL. **Anuário 2021**. 16° Edição. São Paulo, 2021

BEHZADI, P.; BARÁTH, Z.; GAJDÁCS, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 10, p. 42, 2021.

CENGIZ, G.; YAPAR, E. A. Neutralizants for Antimicrobial Effective Preservatives in Microbiological Analysis in Cosmetic Products. **Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 02, p. 117-119, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Estados Unidos da América, 2019.

CLAIS, S. et al. Comparison of viable plate count, turbidity measurement and real-time PCR for quantification of *Porphyromonas gingivalis*. 60° Edição, **Letters in Applied Microbiology: Applied Microbiology International**, 2014.

DEY, B. P.; ENGLELY JR, F. B. Comparison of Dey and Engley (D/E) neutralizing medium to Letheen medium and standard methods medium for recovery of *Staphylococcus aureus* from sanitized surfaces. 14° Edição, **Journal of Industrial Microbiology**, Estados Unidos da América, 1995.

FREI, A.; et al. Metals to combat antimicrobial resistance. **Nature Reviews Chemistry**, v. 7, p. 202-224, 2023.

GILL, P. S.; et al. Biological and synthetic surfactant exposure increase anti-microbial gene occurrence in

a freshwater mixed microbial biofilm environment. **bioRxiv**, 2022.

GORSUCH, J. et al. A comparison of methods for enumerating bacteria in direct fed microbials for animal feed. **Journal of Microbiological Methods**, 2019.

GRISPOLDI, L.; et al. How to Assess in vitro Probiotic Viability and the Correct Use of Neutralizing Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

HALLA, N. et al.; Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies., **Molecules**, v. 23, 2018.

HUANG, Z. et al. Antimicrobial Magnesium Hydroxide Nanoparticles As an Alternative to Cu Biocide for Crop Protection. 66° Edição, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Estados Unidos da América, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 2271:1989 - Surface active agents — Detergents — Determination of anionic-active matter by manual or mechanical direct two-phase titration procedure. Estados Unidos da América: **ISO**, 1989.

KAMEL, D. G.; et al. Effect of Water Activity on Growth of Certain Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food and Dairy Science**, v. 03, p. 97-102, 2018,

KAVILANZ, P. 8 million cleaning products recalled over bacteria exposure risk. Estados Unidos da América: **CNN**, 2022. Disponível em: <<https://edition.cnn.com/2022/12/05/business/laundress-recall-8-million-products/index.html>> acessado em 20/02/2023.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, N. E. et al. Effect of the use of a neutralizing step after antimicrobial application on microbial counts during challenge studies for orange disinfection. 76° Edição, **Journal of Food Protection**, 2013.

MCDONELL, G. E. Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance. 2° Edição, **ASM Press**, Estados Unidos da América, 2017.

MICHALEK, I.M.; JOHN, S.M.; CAETANO DOS SANTOS, F.L. Microbiological contamination of cosmetic products – observations from Europe, 2005–2018. **Journal of European Academy of**

Dermatology and Venereology, Wiley, v. 33, 2019

NALAWADE, T. M.; BHAT, K.; SOGI, S. H.P. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. 5° Edição, **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, Estados Unidos da América, 2015.

NILLIAN, E. et al. Efficiency of Detergents against Microbial Biofilm Growth in Kuching, Sarawak. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 05, 2016

PELEG, M. Models of the water activity effect on microbial growth rate and initiation. 106° Edição, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Estados Unidos da América, 2022.

RUBIO, E.. et al., Evaluation of flow cytometry for the detection of bacteria in biological fluids. 14° Edição, **PLoS ONE**, 2019.

SHARMA, A. A year of innovation in fabric and dish care, 2022. Reino Unido: **Mintel**, 2022. Disponível em: https://clients.mintel.com/content/report/a-year-of-innovation-in-fabric-and-dish-care-2022?fromSearch=%3Ffilters.category%3D16%26last_filter%3Dcategory%26resultPosition%3D1, acessado em 20/02/2023.

SHEN, X. et al. A Technique for Rapid Bacterial-Density Enumeration through Membrane Filtration and Differential Pressure Measurements. 13° Edição, **Micromachines**, 2022.

SHOWELL, M. S. Handbook of Detergents: Part D: Formulation. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

SOZZI, E.; et al. A bioassay-based protocol for chemical neutralization of human faecal wastes treated by physico-chemical disinfection processes: A case study on benzalkonium chloride. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 222, p. 155-167, 2019.

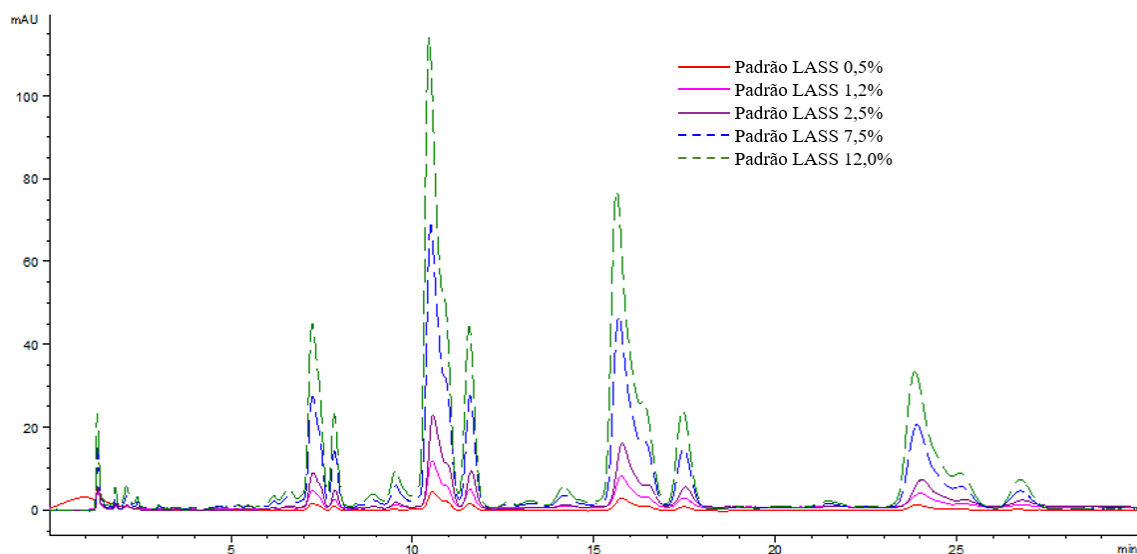
SUTRISNO, K. et al., Antibacterial Activity of Potassium Salt, Fatty Acids, and Methyl Esters of Candlenut Seed Oil Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **AIP Conference Proceedings**, v. 2231, 2020

TERRONES-FERNANDES, I. et al. Improvement of the Pour Plate Method by Separate Sterilization of Agar and Other Medium Components and Reduction of the Agar Concentration. 11^o Edição, **Microbiology Spectrum**, 2023

TONG, C. et al. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. **Environmental Research**, v. 195, 2021

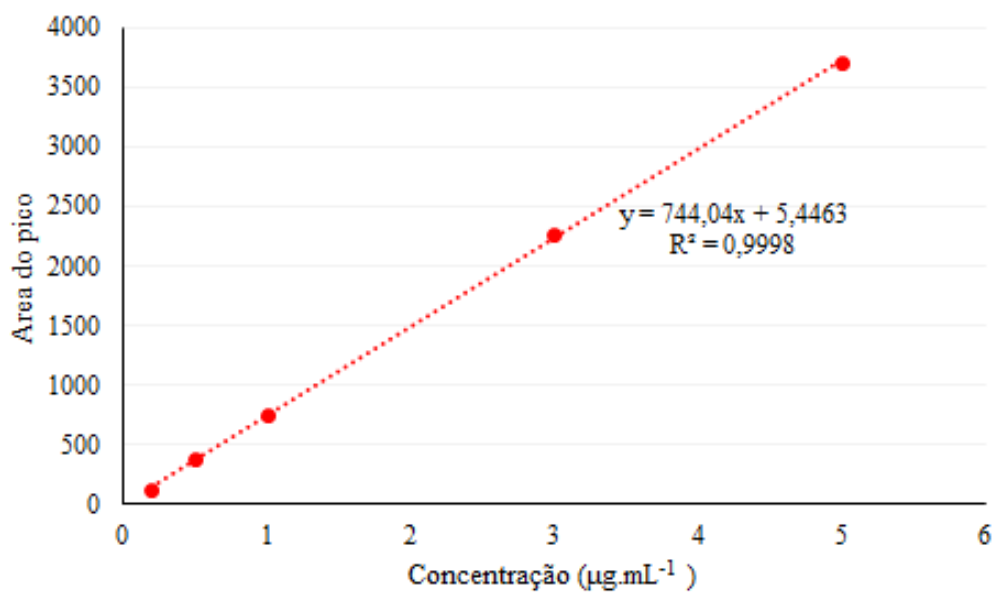
Anexo

Figura 1 - Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de LASS em concentrações de 0,5; 1,2; 2,5; 7,5 e 12%.



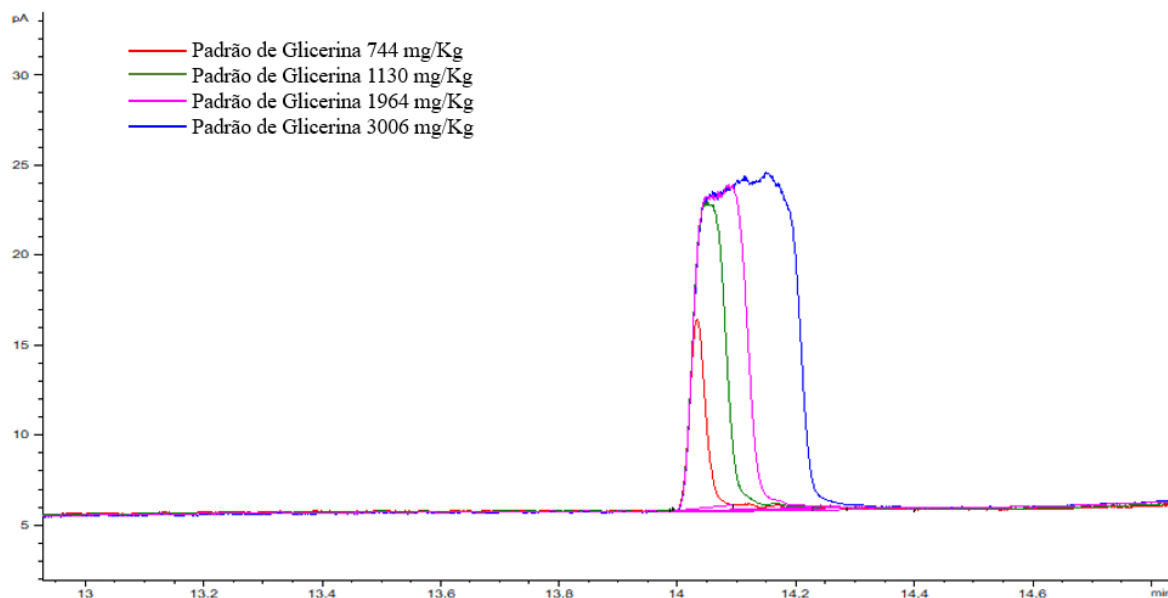
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2 - Curva de calibração dos padrões de LASS



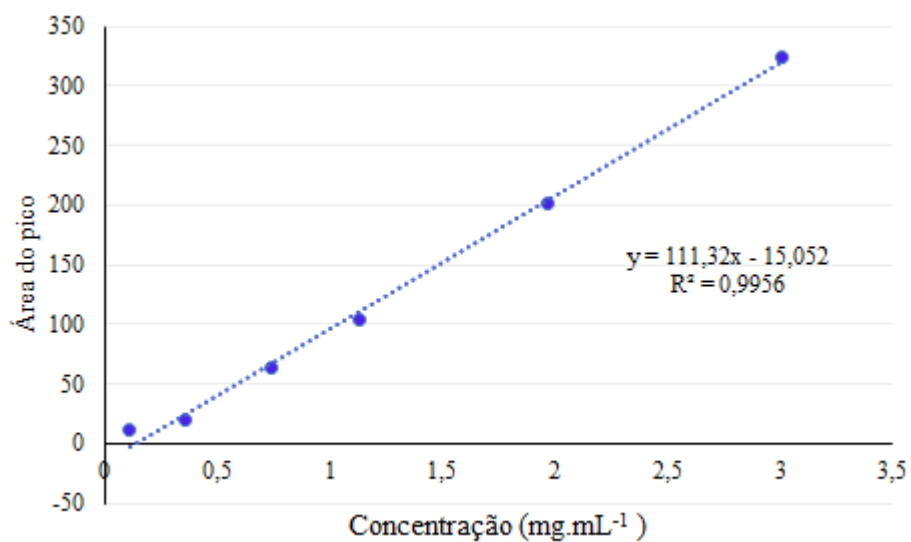
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 3 - Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de Glicerina (744; 1130; 1964; e 3006 mg/kg).



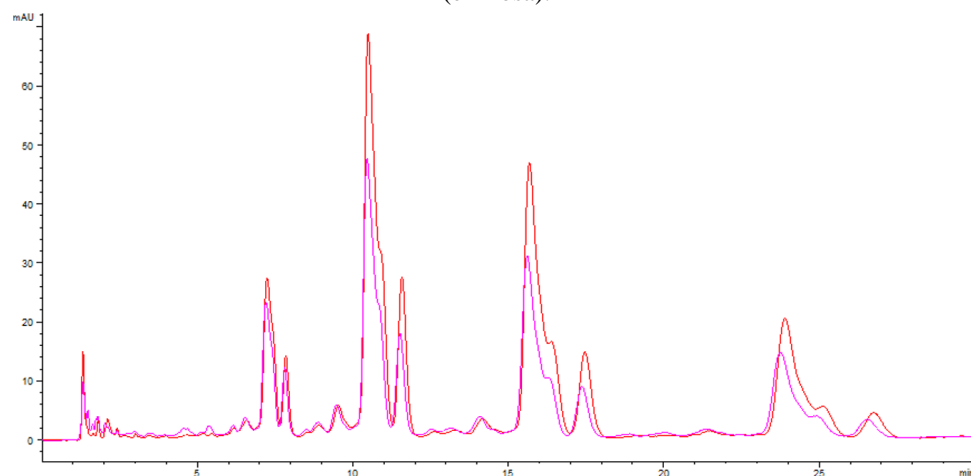
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 4 - Curva de calibração dos padrões de glicerina



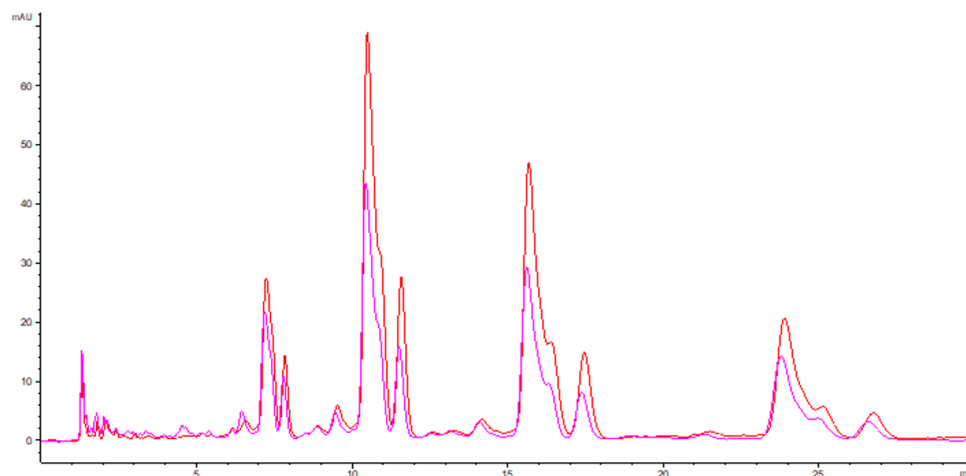
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 5 - Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de LAS (em vermelho) e do Detergente Lava-Louças Neutro (em rosa).



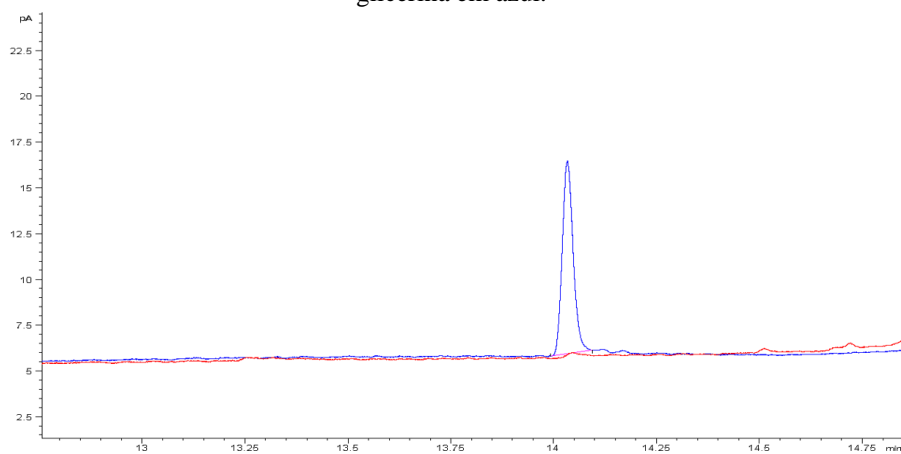
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 6 - Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de LASS (em vermelho) e do Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina (em rosa).



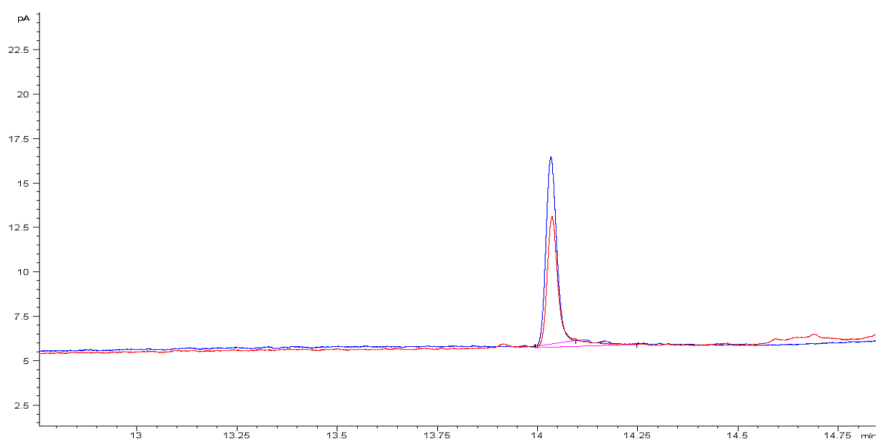
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7 - Sobreposição dos cromatogramas da amostra Detergente Lava-Louças Neutro em vermelho e o padrão de glicerina em azul.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 8 - Sobreposição dos cromatogramas da amostra Detergente Anti-odor Cristal com Glicerina em vermelho e o padrão de glicerina em azul.



Fonte: Dados da pesquisa.