

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE SUSPENSÃO PARA
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE
DESINFETANTES A BASE DE CLORETO DE BENZALCÔNIO EM
CONCENTRAÇÕES ACIMA DE 200 mg/L**

Margarete Midori Okazaki

Engenheira de Alimentos

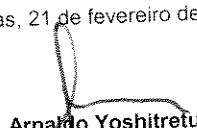
Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Margarete Midori Okazaki** aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de fevereiro de 2003.

Campinas, 21 de fevereiro de 2003.


Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,
para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP

2003

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Okla
V	EX
TOMBO BC/	54291
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/06/03
Nº CPD	

CM00185613-6

BIB ID 293688

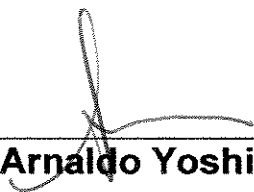
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Okla Okazaki, Margarete Midori
Adaptação do método de suspensão para determinação da atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio em concentrações acima de 200 mg/L / Margarete Midori Okazaki. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Desinfecção e desinfetantes. 2.Agentes antimicrobianos. 3.Diluição. I.Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

(Orientador)



Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira

(Membro)



Prof. Dr. Ernani Porto

(Membro)

Prof. Dr. Fumio Yokoya

(Membro)

0286000300

Aos meus pais,
Takeshi e Missao (*in memorian*)
pelo exemplo de perseverança
e espírito de luta.

Aos meus irmãos:
Yukishigue, Eduardo, Ademar e Marcelo,
pelo apoio na continuidade dos estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a graça que tenho alcançado.

Ao Professor Doutor Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pela orientação e apoio constante durante este trabalho.

À Neusely da Silva, pela oportunidade de execução deste trabalho dentro da Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do ITAL; pela disposição em me apoiar, buscando a cada instante o incentivo e a confiança no trabalho, além de uma amizade valiosa.

Ao CNPq e à FAPESP, pelos auxílios financeiros concedidos.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas valiosas contribuições e sugestões apresentadas.

À Luciene Figueiredo, que me orientou de forma magnífica e paciente durante o estágio no Instituto Adolfo Lutz (SP) para o treinamento de análises de desinfetantes.

À Karla Regulin, Keila dos Santos Gomes e demais colaboradores que me deram assistência no laboratório .

A todos os funcionários da Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL); em especial à Dionir Baptista Jeremias, à Maria Adelaide dos Santos e à Maria Luciara Guimarães Moraes.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram na execução deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE QUADROS.....	XI
RESUMO	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Importância da higienização na indústria de alimentos	7
3.2. Métodos de higienização.....	8
3.3. Agentes desinfetantes.....	12
3.3.1. Compostos clorados.....	13
3.3.2. Compostos iodóforos.....	13
3.3.3. Compostos de quaternário de amônio.....	14
3.4. Métodos de avaliação da atividade bactericida de desinfetantes.....	17
3.4.1. Teste do coeficiente fenólico.....	19
3.4.2. Teste de diluição de uso.....	21
3.4.3. Teste de suspensão.....	22
3.5. Comparação entre o teste de diluição de uso e o teste de suspensão.....	23
3.6. Agentes neutralizantes.....	27
3.7. Formas de neutralização do efeito residual dos desinfetantes no método de diluição de uso.....	29

3.8. Formas de neutralização do efeito residual dos desinfetantes no método de suspensão.....	29
3.9. Neutralização de compostos de amônio quaternário.....	31
3.10. Classificação dos desinfetantes no Brasil.....	32
3.11. Métodos oficiais para avaliar a eficácia antimicrobiana de desinfetantes no Brasil	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Adaptação do método de suspensão AOAC 960.09 para análise de desinfetantes à base de cloreto de benzalcônio.....	35
4.1.1. Materiais.....	35
4.1.2. Métodos.....	38
4.1.2.1. Avaliação da eficácia dos procedimentos de filtração.....	42
4.1.2.1.1. Dosagem do cloreto de benzalcônio residual nas membranas após o processo de filtração.....	42
4.1.2.1.2. Avaliação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração.....	45
4.2. Estudo comparativo do método de diluição de uso e método de suspensão adaptado	49
4.2.1. Materiais.....	49
4.2.2. Métodos.....	52
4.2.2.1. Método de suspensão adaptado.....	52
4.2.2.2. Método de diluição de uso da AOAC.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. Adaptação do método de suspensão AOAC 960.09 para análise de desinfetantes à base de cloreto de benzalcônio.....	56
5.1.1. Dosagem do teor de cloreto de benzalcônio residual nas membranas após o processo de filtração.....	56

5.1.2. Verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração utilizando o método de tubos.....	56
5.1.3. Verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração utilizando o método de placas	59
5.2. Comparação entre o método de diluição de uso e o método de suspensão adaptado.....	60
6. CONCLUSÕES.....	65
7. ANEXOS.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Influência do comprimento da cadeia carbônica sobre a atividade bactericida de cloreto de benzalcônio.....	16
Tabela 2. Diferenças encontradas nas superfícies de cilindros em função do tipo e marca do material.....	24
Tabela 3. Quantidade de microrganismos fixados sobre cilindros de diferentes marcas e materiais.....	24
Tabela 4. Valores médios de células (UFC) remanescentes e removidas pelo efeito da lavagem dos cilindros carregadores com solução tampão fosfato (10 min / 20°C).....	26
Tabela 5. Agentes neutralizantes recomendados pelo INCQS para diferentes compostos químicos.....	27
Tabela 6. Avaliação do efeito tóxico e eficácia de neutralização de 5 neutralizantes para compostos de amônio quaternário.....	34
Tabela 7. Microrganismos padrão utilizados na avaliação da eficácia antimicrobiana de saneantes domissanitários no Brasil (teste de diluição de uso), em função da classificação do produto (Portaria nº 15/88, do Ministério da Saúde).....	79
Tabela 8. Teor de cloreto de benzalcônio residual nas membranas após o processo de filtração de 1mL da solução a 10.000 mg/L.....	58
Tabela 9. Verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração de solução de cloreto de benzalcônio utilizando o método de tubos.....	59
Tabela 10. Verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração de solução de cloreto de benzalcônio utilizando o método de placas.....	60

Tabela 11. Resultados dos testes de avaliação da eficiência bactericida de soluções de cloreto de benzalcônio frente a <i>E. coli</i> , utilizando-se os métodos de diluição de uso e o de suspensão adaptado.....	67
Tabela 12. Resultados dos testes de avaliação da eficiência bactericida de soluções de cloreto de benzalcônio frente a <i>S. choleraesuis</i> , utilizando-se os métodos de diluição de uso e o de suspensão adaptado.....	69
Tabela 13. Resultados dos testes de avaliação da eficiência bactericida de soluções de cloreto de benzalcônio frente a <i>S. aureus</i> , utilizando-se os métodos de diluição de uso e o de suspensão adaptado.....	71
Tabela 14. Comparação entre os 2 métodos de avaliação da eficiência de desinfetantes à base de cloreto de benzalcônio.....	62
Tabela 15. Grau de concordância e discordância entre os 2 métodos, em função da faixa de concentração de cloreto de benzalcônio.....	62
Tabela 16. Avaliação da repetibilidade entre os testes em triplicata.....	63
Tabela 17. Avaliação de repetibilidade de cada método, em função da faixa de concentração testada.....	64
Tabela 18. Percentagem de repetibilidade em triplicata de análises, em função do tipo da cepa testada.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema para determinação de coeficiente fenólico através do teste de Riedel Walker.....	19
Figura 2. Esquema simplificado do método de suspensão AOAC 960.09.....	39
Figura 3. Esquema simplificado do método de suspensão adaptado.....	40
Figura 4. Esquema simplificado de preparo da suspensão bacteriana para o método de suspensão AOAC 960.09.....	41
Figura 5. Avaliação da eficiência da filtração através da dosagem da concentração de cloreto de benzalcônio residual nas membranas após a filtração.....	45
Figura 6. Esquema simplificado do teste de verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração - método de tubos.....	47
Figura 7. Esquema simplificado do teste de verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração - método de placas.....	49
Figura 8. Preparo do inóculo - método de diluição de uso.....	55
Figura 9. Esquema do método de diluição de uso.....	56

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Classificação de desinfetantes, segundo a Portaria 15/88 do Ministério da Saúde.....	75
Quadro 2. Princípios ativos autorizados pela Portaria 15/88 do Ministério da Saúde.....	76

RESUMO

OKAZAKI, M. M., KUAYE, A .Y. **ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE SUSPENSÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE DESINFETANTES A BASE DE CLORETO DE BENZALCÔNIO EM CONCENTRAÇÕES ACIMA DE 200 mg/L.** Campinas: FEA, UNICAMP, 2003. Tese (Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

Desinfetantes com ação bactericida podem ser avaliados através de vários métodos. No Brasil, são considerados como oficiais para a determinação da eficácia bactericida desses produtos, o método de diluição de uso e o método de suspensão da Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Embora o método de suspensão (AOAC 960.09) apresente algumas vantagens sobre o método de diluição de uso (Use Dilution Method AOAC 955.14 e 955.15), quanto ao custo e simplicidade, sua aplicação ainda é limitada a testes com compostos de amônio quaternário em concentrações de até 200 mg/L. No Brasil, as concentrações recomendadas pelos fabricantes de desinfetantes a base de compostos de amônio quaternário variam de 200 a 10.000 mg/L, o que inviabiliza a utilização do método de suspensão para a avaliação da eficácia bactericida desses produtos. Para tanto, é necessária uma padronização para concentrações acima de 200 mg/L, permitindo sua adoção pelos laboratórios de controle de qualidade de desinfetantes, no monitoramento da qualidade dos produtos colocados no mercado ou durante o processo de fabricação. Os objetivos deste trabalho foram a) adequar o método de suspensão da AOAC para análise da eficácia bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio, em concentrações acima de 200 mg/L e b) realizar uma avaliação comparativa entre o método de suspensão modificado e o método de diluição de uso da AOAC, na determinação da eficácia bactericida de diversos desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Escherichia coli* ATCC 11229. O método de

suspensão foi modificado pela substituição da etapa de neutralização química pela introdução de uma etapa de neutralização física, ou seja, filtração com membrana (0.45 μm) seguida de lavagem das células com tampão fosfato. Os resultados dos testes confirmaram a eficiência do procedimento de filtração e lavagem das células, não sendo detectado resíduo de desinfetante nas membranas ou efeito bactericida da membrana sobre os microrganismos, validando assim a adaptação proposta neste trabalho. A comparação entre o método de suspensão modificado e o método de diluição de uso mostrou que, de 108 testes realizados em concentrações ≥ 200 mg/L, os dois métodos concordaram em 77,8% dos casos, ambos aprovando ou reprovando o desinfetante, na condição testada. Esse resultado pode ser considerado bom, uma vez que o método modificado apresentou taxa de discordância de apenas 17,3% entre as repetições, valor este bem menor que no método de diluição de uso, com taxa de discordância de 43,1%.

SUMMARY

Adaptation of the suspension test for the evaluation of benzalkonium chloride bactericidal activity in concentration above 200 mg/L.

Bactericidal disinfectants can be evaluated through several methods. In Brazil, the AOAC dilution method and the AOAC suspension method are considered as the official methods to determine bactericidal efficacy of disinfectants. Although the AOAC 960.09 suspension method has some advantages over the AOAC dilution method (Use dilution method AOAC 955.14 and 955.15), such as lower cost and simplicity, its usage is still restricted to ammonium quaternary compounds tests, in concentration lower than 200 mg/L. In Brazil, the recommended concentration of ammonium quaternary disinfectant by the manufacturers varies from 200 to 10,000 mg/L, thus making suspension method impractical to the bactericidal efficacy evaluation of those products. So, it is essential to standardize the suspension method above 200 mg/L concentration, allowing its adoption by disinfectant quality control laboratories, in the quality monitoring of those products in the market or during manufacturing process. The purposes of this research were: a) to adequate AOAC suspension method for the evaluation of benzalkonium chloride bactericidal activity in concentration above 200 mg/L, and b) to make a comparative evaluation between modified suspension method and AOAC use dilution method, determining bactericidal efficacy of several benzalkonium chloride disinfectants against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 and *Escherichia coli* ATCC 11229. The suspension method was modified through the substitution of chemical neutralization by using the filtration process in membrane (0,45 μm) followed by washing the cells with phosphate buffer solution. Results of the tests confirmed the filtration and washing efficacy, since no residual disinfectant on the membranes or bactericidal effect of the membrane over the microorganisms was observed. The comparison between modified suspension method and the use dilution method indicated that, among 108 tests performed in concentrations above 200 mg/L, both methods agreed to 77,8% of the cases, both

of them approving or rejecting the disinfectant, in tested condition. This result can be considered good, since the modified method presented only 17,3% discordance rate among repetitions, this value was smaller than the use dilution method which, in this case, was 43,1%.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a comprovação da eficácia bactericida de desinfetantes é um requisito fundamental para o registro e controle desses produtos por órgãos regulamentadores oficiais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS). A metodologia oficial para comprovação dessa eficácia é regulamentada por lei e, até 1999, através da Portaria 15/88 da DISAD (Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Produtos Saneantes Domissanitários, 1988) do MS, esteve restrita à utilização do método de diluição de uso, preconizado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), e adotado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, 1999). Em 1999, a ANVISA, através da Resolução 336 de 22 de julho, adotou oficialmente os métodos da AOAC como padrão para análise e registro de desinfetantes no Brasil (ANVISA, 1999). Atualmente, um novo regulamento está sendo proposto, através da Portaria 700 de 08 de maio de 2001 (ANVISA, 2001), para harmonização da legislação do MERCOSUL, tratando de produtos saneantes domissanitários com atividade antimicrobiana. Este novo regulamento mantém os métodos da AOAC e inclui os métodos do CEN (Comitê Europeu de Normatização) como mais uma alternativa para avaliar a eficácia de produtos com ação antimicrobiana.

Os dois métodos mais usuais para determinação da atividade bactericida de desinfetantes são: o método de diluição de uso e o método de suspensão, ambos da AOAC. A principal diferença entre os dois métodos é a forma de exposição dos microrganismos à ação do desinfetante: fixados e secos em um suporte sólido (carreador), no caso do método de diluição de uso, e suspensos na própria solução desinfetante, no caso do método de suspensão. Quando a exposição é feita utilizando-se um carreador (método de diluição de uso), o desinfetante é drenado do suporte sólido, antes de se fazer a incubação para detecção de sobreviventes. Nesse caso, a quantidade de desinfetante carregada para o meio de cultura é mínima, podendo ser neutralizada por simples diluição ou adição de pequenas quantidades de neutralizante ao meio de cultura (meio de subcultivo).

No método de suspensão, ao contrário do método de diluição de uso, a solução desinfetante é transferida diretamente para o meio de cultura, tornando a neutralização uma etapa muito mais crítica para o sucesso das determinações. No método de suspensão da AOAC o procedimento de neutralização está padronizado somente para compostos de amônio quaternário em concentrações de até 200 mg/L. No Brasil, os compostos de amônio quaternário, particularmente o cloreto de benzalcônio, encontram-se entre os princípios ativos mais utilizados na formulação de desinfetantes para uso geral e uso na indústria alimentícia, porém, as concentrações bactericidas recomendadas pelos fabricantes variam de 200 a 10.000 mg/L, não se restringindo portanto, aos 200 mg/L.

O método de suspensão é mais simples, menos trabalhoso e muito mais barato do que o método de diluição de uso, o que o torna mais indicado aos laboratórios de controle de qualidade das empresas fabricantes e usuárias, bem como aos laboratórios públicos e privados, que fazem avaliação da qualidade de produtos e prestam serviços para terceiros.

Assim, consideramos plenamente justificado o objetivo do presente trabalho, que foi disponibilizar uma metodologia alternativa mais simples para a avaliação da eficácia antimicrobiana de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio, em substituição ao método de diluição de uso.

2. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Adequar e padronizar o método de suspensão para análise da eficácia bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio, em concentrações variando na faixa de 200 a 10.000 mg/L.
2. Realizar uma avaliação comparativa entre o método de diluição de uso e o método de suspensão alternativo padronizado, na determinação da atividade

bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio disponíveis no mercado brasileiro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Importância da higienização na indústria de alimentos

A globalização da economia mundial, iniciada no final do século XX, trouxe uma mudança de perfil em diversos segmentos da indústria de alimentos. Com a necessidade de competir e garantir a qualidade de seus produtos, muitas empresas passaram a se preocupar com investimentos em controle rigoroso de higienização nos seus processos de produção (Ferraz, 1996).

A higienização em indústria de alimentos consiste em um conjunto de medidas com a finalidade de remover todos os compostos que não fazem parte da estrutura dos equipamentos ou das superfícies das instalações industriais, como resíduos de alimentos, sujidades ou agentes contaminantes, garantindo ao consumidor, um produto de qualidade (Athayde, 1998). Dessa forma, a higienização na indústria alimentícia contribui de forma significativa no controle higiênico-sanitário dos alimentos. A higienização é composta por dois processos fundamentais: limpeza e desinfecção. De acordo com Andrade & Pinto (1999), a limpeza em indústria de alimentos consiste na remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e sais minerais. Eiroa (1980) afirma que o objetivo da limpeza consiste em colocar uma solução de detergente em contato direto com as sujidades, separar essas sujidades das superfícies a serem limpas, dispersar a sujidade no solvente e prevenir a nova deposição da sujidade sobre as superfícies limpas.

A eliminação de microrganismos patogênicos e dos deteriorantes em níveis considerados seguros é feita pela etapa de desinfecção, sempre após a etapa de limpeza (Andrade & Pinto, 1999).

De acordo com Eiroa (1980), a limpeza por si só não elimina todos os tipos de microrganismos, embora uma boa limpeza reduza a concentração inicial da carga microbiana. Além disso, a superfície que não for adequadamente limpa não poderá ser adequadamente desinfetada, pois resíduos remanescentes protegem as bactérias da ação do agente desinfetante. Assim, a desinfecção não resolve problemas quando a limpeza for mal feita.

3.2 Métodos de higienização

Existem atualmente variados métodos de higienização; e de acordo com Andrade & Pinto (1999), a escolha adequada do método depende de vários fatores tais como: tipo, quantidade e condição do resíduo a ser removido, tipo e material do equipamento a ser higienizado, tipo e quantidade (tempo, temperatura e concentração) do produto químico a ser utilizado, padrão ou especificação de higiene a ser requerido e condições da indústria de alimentos. Athayde (1998) acrescenta que outros fatores também devem ser considerados na elaboração de um programa de higienização, que são: o tipo do alimento a ser processado e a forma de seu processamento, a disponibilidade de tempo e mão de obra, necessidades do cliente e recursos disponíveis (água, energia elétrica e vapor). Baseando-se nesses fatores, a higienização poderá ser feita através dos seguintes métodos:

Higienização manual – neste processo, equipamentos, bombas e tubulações são geralmente desmontados e higienizados com aplicação de produtos puros ou diluídos, seguidos de ação mecânica por esfregação com o auxílio de esponjas, vassouras ou escovas. É um método pouco empregado pelas indústrias porque demanda mais tempo e existe o contato do operador com os produtos químicos (Athayde, 1998).

Segundo Andrade & Macêdo (1996), por questão de segurança para os manipuladores, normalmente os detergentes utilizados possuem média ou baixa alcalinidade e são utilizados em temperatura máxima de 45°C. A eficiência do

processo de higienização manual é afetada por fatores como: escolha adequada de escovas, raspadores e esponjas e a eficiência do próprio operador .

Higienização por imersão - consiste na imersão total de toda a superfície de interesse para higienização, na solução detergente desinfetante com concentração adequada. A técnica geralmente é aplicada para materiais como peças de equipamentos, interior de tanques ou tachos, e utensílios utilizados no processamento do alimento. Após o tempo de imersão adequado, recomenda-se uma aplicação de força mecânica para remoção de quaisquer resíduos aderidos à superfície do material.

Os detergentes utilizados na solução de imersão possuem média ou baixa alcalinidade (Andrade & Macêdo, 1996) e são utilizados em temperatura ao redor de 50°C (Gava, 1985). Sendo assim, pode-se presumir que os seguintes fatores podem afetar a eficiência do processo de higienização por imersão: tempo de contato, temperatura da solução de imersão, tipo do produto químico para higienização e a eficiência do próprio operador.

Higienização por meio de lava jato tipo túnel - este processo é muito utilizado por indústrias de laticínios e restaurantes industriais, onde materiais como: latões para transporte de leite, bandejas e talheres são higienizados. Neste método de higienização já é permitido o uso de agentes químicos sob condições mais agressivas, em termos de alcalinidade e temperatura da solução de limpeza mais elevada, pois não ocorre contato direto dos manipuladores com os agentes químicos (Andrade & Macêdo, 1996).

Higienização por meio equipamento spray - o processo consiste na aspersão, sob pressão, tanto da água de pré-lavagem e enxágüe como da solução de higienização. Pressões altas são utilizadas geralmente para higienização do interior de equipamentos e caminhões de transporte; enquanto que pressões

menores são aplicadas sobre superfícies externas como paredes, pisos (Andrade & Macêdo, 1996).

Higienização por nebulização ou atomização - é um processo utilizado principalmente para descontaminação do ar ambiente, através do uso de equipamentos capazes de transformar a solução desinfetante em névoas. (Andrade & Macêdo, 1996).

Higienização no próprio local - é uma técnica conhecida por CIP, abreviatura para o termo *Cleaning In Place*, tipo de limpeza realizada no local. O escoamento de água e produtos químicos através de tubulações e equipamentos estão interligadas por uma central. Essa central controla vários parâmetros (concentração, tempo, temperatura, pressão) através de circuitos eletrônicos e a principal característica dessa técnica é a limpeza sem a desmontagem do sistema de tubulações e equipamentos (Athayde, 1998).

De acordo com Andrade & Pinto (1999), este sistema CIP pode ser usado para linhas completas ou etapas do processamento. Por meio de circulação das soluções, podem ser higienizadas tubulações, válvulas, bombas centrífugas, pasteurizadores, evaporadores, dentre outros. Por meio de aspersores fixos ou rotativos são higienizados silos e tanques. O sistema oferece grande eficiência, desde que a limpeza e a desinfecção sejam realizadas de forma consistente e padronizada.

O alto custo inicial de instalação de uma central CIP não deve ser considerado significativo, pois tal investimento é pago em aproximadamente um ano, uma vez que a indústria ganha no custo operacional com menor consumo de detergente, vapor, mão de obra e água (Ferraz, 1996).

Higienização por sistema COP - O sistema COP, abreviatura para o termo *Cleaning out of Place*, ou seja, limpeza aberta, basicamente consiste numa fusão

entre CIP e o processo manual. Pode-se dizer que o COP funciona como uma “máquina de lavar roupa”. Alguns recipientes são utilizados especialmente para alojar peças que ficam de molho (imersão) em solução química por um determinado tempo, enquanto o restante dos equipamentos é higienizado por circuito fechado (Athayde,1998).

Higienização por espuma - Esta técnica utiliza um agente espumante na formulação detergente, de modo a produzir uma espuma bastante densa e consistente, permitindo assim, o seu contato com as sujidades por um tempo relativamente prolongado. É uma técnica muito utilizada para higienização de pisos, paredes, locais de difícil acesso e partes externas de equipamentos. As superfícies podem ser cobertas a uma velocidade de $25\text{m}^2/\text{s}$ e o tempo de atuação pode variar de 10 a 20 min. O uso de espuma permite visualizar as áreas onde se procedeu a higienização (Andrade & Pinto,1999).

Higienização por gel - baseia-se no mesmo princípio da higienização por espuma, sendo que a diferença está na utilização de um agente formador de gel na formulação, no lugar do agente formador de espuma. A formulação é comercializada na forma líquida, porém, após sua diluição para a concentração recomendada, transforma-se na forma de gel. A higienização por gel apresenta como vantagem um maior tempo de retenção na superfície, o que aumenta a eficiência do processo (Andrade & Pinto,1999).

Higienização a seco - é uma técnica que permite melhor controle microbiano em instalações que processam alimentos e ingredientes secos, porém, geralmente o ambiente não alcança um nível estético desejável. Normalmente, os resíduos secos e soltos são eliminados do ambiente através de sistemas de aspiração. Resíduos secos aderidos aos equipamentos são removidos através de uma pré raspagem com auxílio de uma espátula apropriada. Agentes desinfetantes como cloro, iodo ou compostos de amônio quaternário podem ser utilizados na

higienização a seco, porém, a solução de álcool 70%(v/v) é considerada uma alternativa mais aceitável por apresentar maior facilidade na evaporação, tornando a superfície seca, sem deixar umidade residual (Andrade & Pinto,1999).

3.3. Agentes desinfetantes

A desinfecção é uma etapa considerada imprescindível dentro do procedimento de higienização, sendo que os agentes desinfetantes podem ser físicos ou químicos. Calor e radiação são exemplos de meios físicos para desinfecção, onde água quente e vapor são as formas de calor mais utilizadas, ao passo que a luz ultra violeta e as ondas sonoras em alta frequência consistem na forma de radiação mais freqüentemente utilizada. Pressão, superfiltração e supercentrifugação são outros exemplos de agentes físicos para desinfecção. Na classe de agentes químicos desinfetantes, são incluídas as formulações a base de cloro, iodo, amônio quaternário, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, clorhexidina, irgasan, extrato de semente de grape fruit e outros (Andrade & Pinto,1999).

No Brasil, a ANVISA, que está vinculada ao Ministério da Saúde, é o órgão que controla e autoriza o uso de princípios ativos na formulação de agentes desinfetantes. A Portaria nº 15, de 23/08/1988 do Ministério da Saúde, autoriza o uso de vários princípios ativos na composição de agentes desinfetantes, tais como: compostos clorados, iodados e amônio quaternário.

O emprego de outros compostos químicos foram aprovados posteriormente, como é o caso do cloridrato de polihexametileno biguanida, que através da Portaria nº 05, de 13/11/89, do Ministério da Saúde, foi autorizado para compor juntamente com a clorhexidina, a classe das biguanidas em formulações de alguns agentes desinfetantes. Já o uso de ácido peracético em formulação de alguns agentes desinfetantes somente foi autorizado através da Portaria nº 122, de 29 de novembro de 1993, do Ministério da Saúde.

3.3.1. Compostos clorados

O cloro e seus compostos são agentes desinfetantes muito utilizados em processo de higienização, incluindo as seguintes formas: cloro líquido, hipocloritos e cloraminas. As vantagens oferecidas pelo uso desses compostos clorados são: baixo custo, ação rápida e não afetada pela dureza da água, espectro de ação contra uma grande variedade de microrganismos, efetivo em baixas concentrações, facilidade tanto no preparo quanto na sua aplicação e simplicidade na determinação da concentração (Andrade & Macêdo, 1996).

Por outro lado, o uso desses compostos apresentam as seguintes inconveniências: corrosividade sobre muitas superfícies metálicas (especialmente em altas temperaturas), baixo efeito residual, efetividade afetada por fatores como o pH, a temperatura, a presença de matéria orgânica e a presença de luz, além de possibilitar alteração de sabor ou odor ao alimento (Andrade & Pinto, 1999).

Uma outra desvantagem do uso de compostos de cloro está relacionada com o impacto ambiental, onde a oxidação de compostos orgânicos forma resíduos de difícil degradação e potencialmente tóxicos para as bactérias degradadoras utilizadas nas estações de tratamento de efluentes (Véras, 1997).

O espectro de ação germicida dos compostos clorados é amplo, devido à ação sobre a membrana celular, à inibição das enzimas celulares envolvidas no metabolismo da glicose, à oxidação das proteínas celulares e ao efeito danoso sobre o DNA (Andrade & Pinto, 1999).

3.3.2. Compostos iodóforos

O iodo elementar não é solúvel em água; para que possa agir como agente desinfetante, é necessário que o iodo seja combinado com agentes tensoativos apropriados, formando os compostos iodóforos. O iodo possui uma atividade desinfetante sobre diversos grupos de microrganismos, com ação efetiva maior sobre as células bacterianas mas, com efetividade moderada sobre fungos, leveduras e vírus. A ação germicida do iodo deve-se à destruição da célula

microbiana devido à penetração da molécula de I_2 através da parede celular. Também o sistema enzimático celular é inibido pelo iodo em decorrência da oxidação do aminoácido tirosina resultando em diiodotirosina (Andrade & Macêdo, 1996).

Podem ser considerados os seguintes pontos como vantagens do uso do iodo como agente desinfetante: menos irritante e corrosivo que o cloro, não é muito afetado pela matéria orgânica e a sua cor marron, que facilita a sua presença. Por outro lado, o iodo apresenta as seguintes desvantagens: sua atividade bactericida decresce com o aumento de pH, não deve ser empregado em temperaturas maiores que 47°C e são menos eficientes que o cloro contra esporos bacterianos (Gava, 1985). O iodo ainda pode causar sabores estranhos em produtos de laticínios, geralmente possui um custo maior que os compostos clorados e é inconveniente em áreas de processamento de produtos amiláceos.

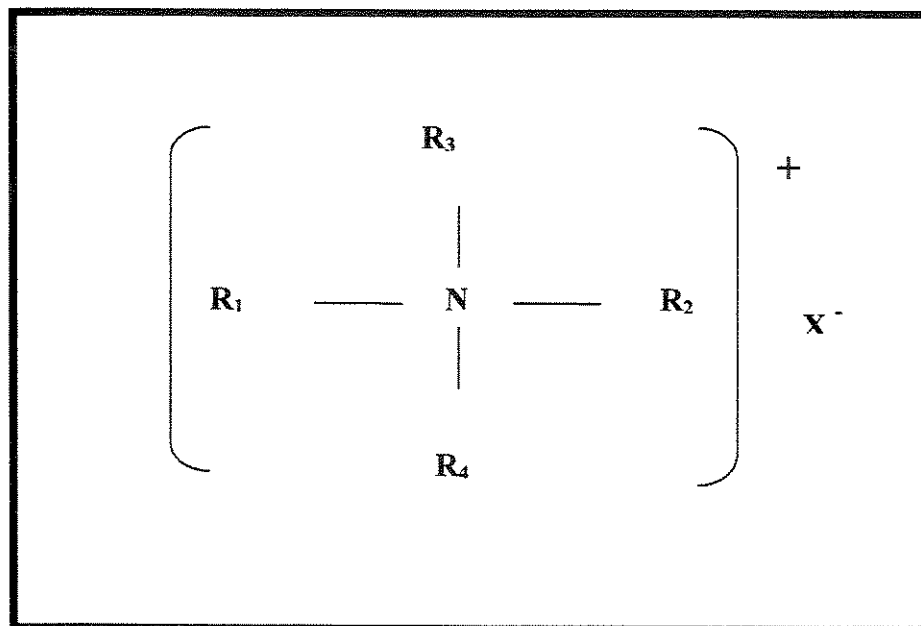
3.3.3. Compostos de amônio quaternário

Os compostos de amônio quaternário formam um grupo de composto amplamente utilizado em formulação de agentes desinfetantes e são produtos resultantes de reação de substituição nucleofílica de sais de alquil haletos com aminas terciárias (Block, 1991).

Quimicamente, os compostos de amônio quaternário possuem em sua estrutura, um átomo de nitrogênio ligado covalentemente a 4 grupos alquil ou aril, resultando em formação de carga positiva no átomo de nitrogênio (Andrade & Macêdo, 1996).

A atividade antimicrobiana dos compostos de amônio quaternário foi descrita desde 1915 por Jacob et al. e a partir de 1935, Domagk estabeleceu a utilidade destes agentes em hospitais e em outras áreas (Russell et al., 1994). De acordo com Andrade & Macêdo (1996), a ação germicida dos compostos de amônio quaternário está relacionada a vários mecanismos, dentre eles podem ser destacados: inibição enzimática, desnaturação protéica e alteração da permeabilidade celular.

A fórmula química estrutural geral dos compostos de amônio quaternário pode ser representada por:



onde:

R₁ = cadeias carbônicas longas de alquil , alquilaril ou seus derivados;

R₂, R₃ e R₄ = átomos de hidrogênio, alquil, aril ou radicais heterocíclicos;

X = ânion inorgânico, geralmente cloreto ou brometo

As diversas substituições ao nitrogênio quaternário resultam numa variedade de compostos catiônicos, com um grau variado de atividade antimicrobiana, dependente do tamanho e tipo dos radicais substituintes (Bawdon & Bartley, citado por Romão, 1985).

A natureza catiônica dos compostos quaternário de amônio concede aos mesmos propriedades tais como: adsorção sobre superfície que possuem carga elétrica negativa como vidro, lã e bactérias. Eles tendem à formação de agregados iônicos, ocasionando mudanças na condutividade elétrica, na tensão superficial e

na solubilidade, permitindo dessa forma, a sua ação à nível de membrana citoplasmática das células bacterianas (Romão,1985).

Dentre os inúmeros compostos, o cloreto de benzalcônio é um dos principais representantes dos compostos de amônio quaternário, e é formado pela alquilação entre alquildimetilaminas com cloreto de benzila. É um tensoativo catiônico com poder de detergência relativamente baixo, porém, amplamente utilizado como agente de desinfecção com propriedades bactericidas, fungicidas e algicidas (Andrade & Macêdo, 1996), possui alta solubilidade em água, cujo valor é de 4000 g/L à 20°C (Merck, 1999/2000).

O cloreto de benzalcônio é constituído por substâncias contendo cadeias alquilas numa faixa de 8 a 18 átomos de carbono, sendo que a atividade germicida é mais intensa quando contiver em torno de 12 a 16 átomos de carbono (Block, 1991), conforme os dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Influência do comprimento da cadeia carbônica sobre a atividade bactericida de cloreto de benzalcônio.

Concentração inibitória mínima (mg/L) - 10 min de contato, em função do R*												
R*	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
A	3000	800	450	160	45	25	15	25	30	170	450	330
B	4500	1400	300	130	40	20	12	20	25	15	60	90
C	6000	2500	1200	400	120	50	40	70	200	360	1000	1300

Fonte: BLOCK (1991)

R* = número de átomo de carbono dentro da cadeia da estrutura do cloreto de benzalcônio.

A = *S. aureus* ATCC 6538; B = *S. typhosa* ATCC 6539; C = *P. aeruginosa* ATCC 15442

A fórmula molecular do cloreto de benzalcônio é : $[RN(CH_3)_2CH_2C_6H_5]Cl$, onde R representa cadeia carbônica; sua efetividade germicida é maior sobre as bactérias Gram positivas (espécies como: *Staphylococcus* e *Streptococcus*) do que para as Gram negativas. Também possuem boa efetividade contra bolores e leveduras (Andrade & Macêdo, 1996).

Dentre as inúmeras vantagens oferecidas pelo cloreto de benzalcônio, e que provavelmente, levaram a torná-lo como um dos compostos mais amplamente utilizados em formulações de agentes desinfetantes, são: fácil manuseio, alta estabilidade durante o armazenamento, vida de prateleira longa, não é afetado por fatores ambientais (luz, calor), boa efetividade tanto em condições alcalinas como na presença de matéria orgânica, não corrosivo, inodoro, altamente solúvel em água, baixa toxicidade e irritabilidade, boa ação de penetração, compatível com outros catiônicos, não iônicos e anfóteros (Andrade & Macêdo, 1996).

Além do uso em formulações de agentes desinfetantes em indústria alimentícia, o cloreto de benzalcônio possui aplicação na área cosmética, veterinária, farmacêutica e produtos domissanitários.

3.4. Métodos de avaliação da atividade bactericida de desinfetantes

Leitão (1984), numa revisão, afirma que o processo de desinfecção raramente elimina totalmente os microrganismos presentes, e que a sua finalidade principal é a de controlar os tipos específicos de microrganismos, durante um intervalo de tempo e condições de uso prefixadas. Pode se dizer portanto, que os desinfetantes desempenham um papel fundamental num processo de desinfecção, onde Reber (citado por Russell et al., 1994) definiu esses compostos químicos como sendo um agente eliminador de certos microrganismos indesejáveis para prevenção de sua transmissão.

Num processo de desinfecção utilizando-se desinfetantes, inúmeros fatores podem afetar a eficiência do desinfetante; dentre os quais podem ser citados: a natureza e tipo das superfícies tratadas, concentração e natureza dos resíduos a

elas aderidos, o tipo de microflora contaminante na superfície, a concentração e o período de contato do desinfetante com a superfície (Leitão, 1984).

A utilização de desinfetante apropriado é um dos fatores mais importantes numa operação de higienização para se atingir uma desinfecção eficiente. Portanto, é fundamental que os responsáveis pelo controle higiênico sanitário ou pelo programa de controle de qualidade tenham o conhecimento das condições de desempenho do desinfetante utilizado. Dessa forma, tornam-se necessários alguns testes que comprovem a eficiência desinfetante dos produtos utilizados, sob determinadas condições de higienização.

Existem vários testes disponíveis para avaliar a eficiência antimicrobiana dos desinfetantes, dentre os quais incluem-se: o teste do coeficiente fenólico, o teste da diluição de uso, o teste de suspensão e teste de capacidade (Andrade & Macêdo, 1996).

Russell et al. (1994) classificaram esses diferentes testes incluindo-os em três subgrupos: (a) testes laboratoriais visando a avaliação de partidas formuladas de desinfetantes: teste de suspensão e teste de coeficiente fenólico; (b) testes laboratoriais para avaliação de desinfetantes sob condições práticas de uso: teste de capacidade e teste de diluição de uso; (c) testes realizados *in loco* ou avaliação em campo.

Segundo Romão (1985), a avaliação em campo é descrita como a mais válida por ser realizada em condições reais, porém, na prática, ela é de difícil execução. A finalidade dessa análise é detectar a ineficiência do processo de desinfecção e, em alguns métodos, se baseia no princípio de que a solução de uso do desinfetante não deve conter microrganismos vivos após sua utilização. Leitão (1984) afirma, numa revisão, que os testes de campo não são muito conhecidos e nem aplicados devido à impossibilidade de sua completa padronização.

O teste de diluição de uso e o teste de suspensão são os métodos mais conhecidos e utilizados para a avaliação da atividade bactericida de desinfetantes e aplicados à avaliação de produtos com princípios ativos consagrados, enquanto que o teste do coeficiente fenólico é aplicado à análise de novos princípios ativos,

como método padrão de comparação com o fenol. Esses métodos foram sumariados e amplamente discutidos por Leitão (1984), Cremieux & Fleurette (1991) e Andrade & Macêdo (1996).

3.4.1. Teste do coeficiente fenólico

Segundo Russell et al.(1994), o teste do coeficiente fenólico foi um dos primeiros testes a serem desenvolvidos; é um teste de suspensão qualitativo, onde a eficácia do desinfetante é comparada em relação à eficiência do fenol, que foi, durante muitos anos, um bactericida tradicionalmente empregado como desinfetante e antisséptico. Seu uso como desinfetante foi abandonado devido à sua alta toxicidade.

Atualmente, várias modificações do método são conhecidas, dentre elas o teste de Riedel-Walker e o preconizado pela AOAC (Leitão, 1984).

Conforme Russell et al.(1994), no teste de Riedel Walker, alíquotas de 0,2 mL de suspensão de *Salmonella typhi* são colocadas em contato com cada um dos 5,0 mL das várias concentrações da solução desinfetante em estudo. O mesmo procedimento é aplicado para uma solução de fenol padronizado em diluição apropriada, por exemplo: 1/100. Para ambos os casos, após o contato entre a cepa padrão e as soluções testadas, é feita, com uma alça de inoculação, a transferência de uma alíquota de cada solução em caldos neutralizantes, os quais são incubados para verificar as concentrações em que houve a sobrevivência das células. Os tempos de contatos da suspensão bacteriana com as várias diluições de desinfetantes e fenol padrão são: 2,5 min, 5 min, 7,5 min e 10 min (Figura 1).

O coeficiente fenólico através do teste de Riedel Walker é determinado dividindo-se o valor da maior diluição do desinfetante que apresentar ausência de crescimento de células após contato de 7,5 min pela concentração do fenol que apresentar crescimento de células após 5 min de contato (Russell et al.,1994).

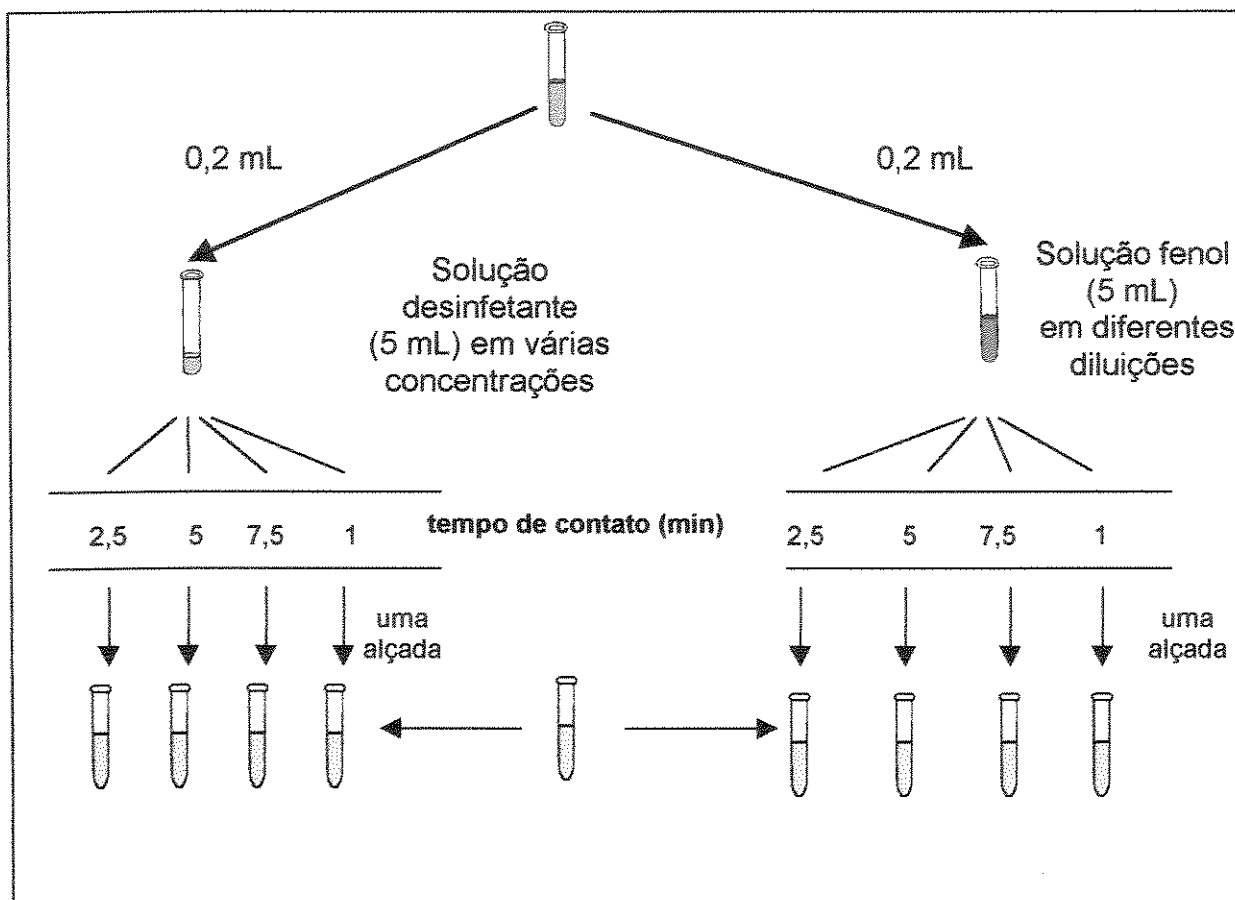


Figura 1. Esquema para determinação de coeficiente fenólico através do teste de Riedel Walker

O procedimento do teste do coeficiente fenólico preconizado pela AOAC é quase que semelhante ao do teste de Riedel Walker, porém, alíquotas de 0,5 mL da suspensão bacteriana padrão são utilizadas ao invés de 0,2 mL. As cepas padrão utilizadas pelo método AOAC são: *S. typhi* ATCC 6539, *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15442, conforme as metodologias AOAC 955.11, 955.12 e 955.13, respectivamente (Beloian, 1995). Os tempos de contato da suspensão bacteriana com as várias diluições de desinfetantes e fenol padrão são: 5 min, 10 min e 15 min (Leitão, 1984). O coeficiente fenólico pelo método da AOAC é determinado dividindo-se o inverso da maior diluição do desinfetante que destrói o organismo teste em 10 min mas não em 5 min, pelo inverso da maior diluição do fenol que oferece os mesmos resultados (Andrade & Macêdo, 1996).

É um critério aceito que os desinfetantes testados poderão ser empregados numa concentração 20 vezes superior ao coeficiente fenólico obtido com *Salmonella typhi*. Por exemplo, se o coeficiente fenólico obtido for 3,89 ($3,89 \times 20 = 78$), pode-se diluir 1 parte do desinfetante em 77 partes de água, para se obter uma solução do desinfetante equivalente ao do fenol em termos de atividade germicida (Leitão, 1984).

Quanto ao grau de eficiência, o teste do coeficiente fenólico apresenta algumas deficiências: sua precisão é discutível quando avalia desinfetantes a base de outros princípios ativos que não sejam fenóis, a metodologia não permite simular situações de uma condição real e possui baixa reprodutibilidade. Portanto, é um teste que deve ser considerado como presuntivo e as concentrações obtidas devem ser confirmadas por outros testes (Andrade & Macêdo, 1996).

3.4.2. Teste de diluição de uso

O teste de diluição, preconizado pela AOAC, utiliza como microrganismos padrão: *Salmonella choleraesuis* ATCC10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442 (Beloian, 1984). Em cada teste, cilindros de aço inox padronizados são contaminados e imersos por um tempo determinado em solução desinfetante na concentração de uso, e depois, transferidos em caldos de subcultivo (Russell et al., 1994).

Os cilindros são feitos de aço inoxidável 304, com dimensões de 8 ± 1 mm de diâmetro externo, 6 ± 1 mm de diâmetro interno e 10 ± 1 mm de comprimento. Antes de seu uso nos testes, os cilindros passam por etapas de condicionamento da seguinte forma: após a sua rigorosa limpeza com NaOH 1N seguida de enxágüe em água destilada, são mergulhados em solução 0,1% de asparagina e submetidos à ação de esterilização, em autoclave. Somente após a esterilização, os cilindros poderão ser contaminados pela suspensão bacteriana teste durante 15 min e em seguida, serem transferidos em placas de Petri (forradas com papel de filtro) estéreis para secagem, em posição vertical, durante 40 min/ $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (Leitão, 1984).

Após a secagem, cada cilindro é mergulhado em tubo contendo 10mL da solução desinfetante durante o tempo de contato padrão. Decorrido o tempo necessário para o teste, iniciam-se as transferências dos cilindros de transporte para os meios de subcultivo, usando-se agulhas de níquel-cromo. Cada cilindro permanece, durante 20 min, mergulhado no primeiro caldo de subcultivo e em seguida, transferido para o segundo caldo de subcultivo. Terminada a segunda etapa da subtransferência, todos os tubos contendo o meio de subcultivo são incubados a $36\pm 1^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. O resultado do teste é expresso como + (crescimento de células sobreviventes) ou – (ausência de crescimento) no total de 60 cilindros. O desinfetante, para ser considerado eficaz pelo método de diluição de uso, deverá ser capaz de destruir o microrganismo teste em 59 dos 60 cilindros utilizados (INCQS, 1999).

3.4.3. Teste de suspensão

O teste de suspensão avalia a eficiência de desinfetantes na redução de uma população microbiana em suspensão, sob condições práticas de uso. Por permitir simular situações rotineiras de indústrias (avaliação da alteração de concentração e pH do desinfetante; dureza e qualidade da água industrial), é um teste que pode ser indicado para avaliação dos desinfetantes para uso em indústria de alimentos (Leitão, 1984).

Neste teste, uma suspensão de microrganismos é adicionada em solução desinfetante com concentração conhecida do princípio ativo, sendo o número de células sobreviventes determinado após o tempo de exposição. Após o período de exposição da suspensão bacteriana ao desinfetante, é feita uma inativação completa do princípio ativo deste. A inativação é efetuada pela transferência de 1 mL da solução de desinfetante mais microrganismos a um tubo contendo 9 mL de solução estéril da solução neutralizante, seguida de agitação. A seguir, procede-se à contagem do número de sobreviventes, utilizando-se condições ótimas de meio de cultura e incubação para o microrganismo em teste. Os microrganismos para o teste de suspensão devem ser selecionados de acordo com o problema específico

em estudo. O desinfetante, para ser considerado eficaz através do teste de suspensão, deverá promover pelo menos 5 reduções logarítmicas, ou seja, reduzir pelo menos 99,999% da população bacteriana (Leitão, 1984).

3.5. Comparação entre o teste de diluição de uso e o teste de suspensão

Tanto o teste de diluição de uso quanto o teste de suspensão são aplicáveis a desinfetantes miscíveis em água, cujo efeito bacteriostático possa ser neutralizado por diluição, substâncias específicas ou técnicas de subtransferência, depois do tempo de contato recomendado (Beloian, 1984; Beloian, 1995; Russell et al., 1994). A principal diferença entre os dois métodos está relacionada à forma como os microrganismos são expostos à ação do desinfetante; fixados e secados em um suporte sólido (carreador), no caso do método de diluição de uso, ou suspensos na própria solução desinfetante, no caso do método de suspensão (Russell et al., 1994).

As duas situações oferecem vantagens e desvantagens: no método de diluição de uso, a fixação dos microrganismos ao carreador pode ser considerada uma vantagem, porque simula melhor as condições de desinfecção de superfícies, nas quais ocorre a formação de películas protetoras contra a ação dos desinfetantes, produzidas por algumas bactérias. Sob esse aspecto, o método de diluição de uso é considerado mais rigoroso do que o método de suspensão (Robinson et al., 1988). Porém, os mesmos autores relatam que, na etapa de secagem dos carreadores, a maioria dos Gram positivos sobrevivem muito mais do que os Gram negativos. Este fato pode favorecer a variabilidade nos resultados, contribuindo portanto, como uma desvantagem do método de diluição de uso. Outro fator que influi na variabilidade do método de diluição de uso é o grau diferenciado de adesão de diferentes microrganismos sobre os carreadores, ou seja, a quantidade de microrganismos aderidos nos cilindros carreadores é altamente dependente da espécie do microrganismo utilizado (Robinson et al., 1988).

O método de diluição de uso é um método estritamente qualitativo, isto é, não objetiva, nem permite quantificar os microrganismos antes e depois do tratamento

desinfetante, sendo que o seu resultado é expresso como + (crescimento de células sobreviventes) ou – (ausência de crescimento) no total de 60 cilindros (INCQS, 1999).

Cole et al. (1987b) relatam que não é possível de se estabelecer um controle rigoroso sobre o número de microrganismos fixados no carreador, visto que, esse parâmetro é influenciado por uma série de fatores como o material (aço, vidro, porcelana, alça de sutura), a marca, o tempo de uso e a presença de defeitos invisíveis, resultando numa variação significativa de um carreador para outro. Com auxílio de microscópio eletrônico, Cole et al. (1987b) observaram diferenças no polimento em superfícies de diferentes marcas de carreadores. Também avaliaram o grau de aderência de diferentes microrganismos sobre cilindros de diferentes marcas e materiais. Os resultados obtidos estão resumidos nas Tabelas 2 e 3.

Mesmo controlando-se todas essas variáveis (tipo de material, marca, tempo de uso e presença de defeitos invisíveis nos cilindros carreadores), um estudo colaborativo executado pela AOAC com cilindros padrão de aço inoxidável, novos, do mesmo fabricante e submetidos ao teste prévio de validação, demonstrou variação de 51% na contagem de *S. choleraesuis*, com média de $1,6 \times 10^6$ /cilindro, variação de 37% na contagem de *S. aureus*, média de $3,5 \times 10^6$ /cilindro e variação de 25% na contagem de *P. aeruginosa*, média de $8,2 \times 10^6$ /cilindro (Cole et al., 1987a).

Outros fatores que interferem nos resultados do teste de diluição de uso são: a) o efeito de desidratação da cultura durante a secagem no carreador, que pode provocar uma certa redução no número de células viáveis (Cremieux & Fleurette, 1991); b) a formação de polissacarídeos por algumas bactérias (incluindo a cepa padrão de *P. aeruginosa* utilizada pela AOAC), que protegem as células da ação do sanificante (Andrade & Macêdo, 1996); c) a incorporação do meio de cultura ao carreador que, às vezes, pode formar filmes de matéria orgânica, protegendo as células e, outras vezes, reter quantidades mínimas do desinfetante com efeito bacteriostático sobre a cultura; d) a dificuldade em diferenciar o efeito desinfetante

do efeito de detergência, que simplesmente remove os microrganismos do carreador (Andrade & Macêdo, 1996).

Tabela 2. Diferenças encontradas nas superfícies de cilindros em função do tipo e marca do material.

aço inox		porcelana	vidro
Fabricante A*	Fabricante B*	Fabricante B*	Fabricante C*
Lisa externamente;	Rugosa tanto interna	Extremamente	Extremamente lisa
Rugosa internamente.	como externamente	irregular	

Fonte: Cole et al. (1987b)

*A = "S&L"; B = "Fisher Scientific"; C = "University Research Glassware"

Tabela 3. Quantidade de microrganismos fixados sobre cilindros de diferentes marcas e materiais.

Microrganismo	A*	B*	C*	D*
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5,98x10 ⁶	5,38x10 ⁶	7,04x10 ⁶	7,94x10 ⁶
<i>P. aeruginosa</i> ATCC15442	13,70x10 ⁶	18,92x10 ⁶	0,97x10 ⁶	13,22x10 ⁶
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	0,82x10 ⁶	0,99x10 ⁶	0,01x10 ⁶	1,70x10 ⁶

Fonte: Cole et al.(1987b)

*A = aço inox "S&L"; B = aço inox "Fisher"; C = porcelana; D = vidro

**Testes feitos em 5 replicatas; exceção no caso da *P. aeruginosa* sobre os cilindros de porcelana, que foi feito em 4 replicatas.

Alfano et al. (1988) avaliaram o efeito da lavagem sobre células viáveis aderidas aos cilindros carreadores, utilizando solução tampão fosfato. O tempo de contato entre o cilindro contaminado e a solução de lavagem foi 10 min e os microrganismos testados foram: *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. As

médias das quantidades de células removidas e remanescentes estão mostradas na Tabela 4, onde pode-se verificar um grau diferenciado de remoção de um microrganismo a outro, contribuindo, dessa forma, na variabilidade do método de diluição de uso.

Myers (1988) relata que um estudo colaborativo realizado pela Universidade da Carolina do Norte, nos Estados Unidos, com o apoio da Environmental Protection Agency (EPA), verificou que um desinfetante ineficaz, submetido repetidamente ao teste de diluição de uso da AOAC, pode ser aprovado em 27% dos testes, enquanto um desinfetante eficaz pode ser reprovado em 39% dos testes.

Tabela 4. Valores médios de células (UFC) remanescentes e removidas pelo efeito da lavagem dos cilindros carreadores com solução tampão fosfato (10min/20°C).

células	<i>S. choleraesuis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Removidas	2,23x10 ⁶	5,21x10 ⁶	2,20x10 ⁶
Remanescentes	0,25x10 ⁶	5,47x10 ⁶	3,47x10 ⁶
Total	2,48x10 ⁶	10,68x10 ⁶	5,67x10 ⁶
% células lavadas	89,9	48,8	38,8
% adesão no cilindro	10,1	51,2	61,2

Fonte: Alfano et al.(1988)

No teste de suspensão, a dispersão das células na solução facilita sua exposição ao desinfetante, razão pela qual tem sido considerado menos rigoroso do que o teste de diluição de uso. Por outro lado, diversos estudos realizados nas décadas de 70 e 80 demonstraram uma adequada avaliação da eficácia dos desinfetantes por esse método (Reybrouck, 1975 ; van Klingeret et al., 1977), inclusive quando comparado com o método de diluição de uso da AOAC (Robinson, 1988).

A padronização de um método de avaliação da eficácia antimicrobiana de desinfetantes envolve vários parâmetros críticos que interferem no resultado, particularmente a seleção das cepas padrão para teste, o tamanho e estado fisiológico do inóculo, o tempo e temperatura de contato, a forma de neutralização da ação do desinfetante após o tempo de contato e a interpretação dos resultados quanto à eficácia (Russell et al., 1994).

3.6. Agentes neutralizantes

Segundo Reybrouck (1978), um dos problemas encontrados na avaliação da atividade bactericida de desinfetantes está no fato de resíduos de desinfetantes serem carregados para o meio de subcultivo, após a exposição da suspensão bacteriana à solução desinfetante. Portanto, a ação desses resíduos deve ser inativada através de uso de agentes neutralizantes no final da exposição da suspensão bacteriana à solução desinfetante.

Existem vários tipos de agentes neutralizantes, cuja aplicação é dependente do tipo de princípio ativo a ser neutralizado, sendo que no Brasil, as recomendações do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, 1999) estão descritas na Tabela 5.

As recomendações de uso de neutralizantes do INCQS, assim como as da AOAC, estão totalmente padronizadas para o método de diluição de uso, no qual os neutralizantes são incorporados aos meios de cultura, objetivando neutralizar quantidades mínimas do desinfetantes, aderidas aos carregadores depois do tratamento de desinfecção (Beloian, 1984; Beloian, 1995 ; INCQS, 1999).

Essas recomendações, de maneira geral, não são aplicáveis ao método de suspensão, no qual a quantidade de desinfetante incorporada ao meio de cultura é muito maior. Neste caso, o método 960.09 da AOAC só está padronizado para desinfetantes a base de compostos de amônio quaternário, utilizados em concentrações de até 200 mg/L do ativo (Beloian, 1995).

Tabela 5. Agentes neutralizantes recomendados pelo INCQS para diferentes compostos químicos.

Princípio ativo de desinfetantes	Agentes neutralizantes
Quaternário de amônio	Lecitina + Tween 80
Composto clorado	Tiossulfato de sódio
Composto iodado	Tiossulfato de sódio
Composto fenólico	Tween 80
Aldeído	Sulfito de sódio
Tensoativo anfótero	Tween 80
Biguanidina	Lecitina + Tween 80
Peróxido	Catalase

Fonte: INCQS(1999)

Nos países onde os métodos têm âmbito de aplicação extensivo a desinfetantes em geral, a utilização do neutralizante também não é padronizada, o que se apresenta são recomendações de como determinar, em análises prévias, a sua eficácia sobre o princípio ativo a ser analisado, na concentração de uso, bem como comprovar a ausência de efeito tóxico sobre as culturas padrão. Essa padronização é relativamente simples no caso de princípios ativos como os compostos de cloro ou iodo, por exemplo, cuja neutralização se dá por interações puramente químicas, com estequiometria conhecida. Em outros casos, ao contrário, pode ser bastante complicada e totalmente empírica, porque o fenômeno de neutralização envolve interações complexas entre moléculas, cujo mecanismo não se encontra totalmente elucidado. Esse é o caso dos compostos de amônio quaternário, cujos radicais não polares interagem com as estruturas lipofílicas dos neutralizantes de uma forma, até o momento, não relatada na literatura.

3.7. Formas de neutralização do efeito residual dos desinfetantes no método de diluição de uso

Conforme descritas nas metodologias da AOAC e do INCQS, no método de diluição de uso, o efeito residual dos desinfetantes sobre os carreadores após a desinfecção é neutralizado através da adição de agentes químicos apropriados aos meios de subcultivo (Beloian, 1984; INCQS, 1999).

O INCQS recomenda as seguintes proporções de agentes neutralizantes em relação aos meios de subcultivo: 0,6% (p/v) de tiosulfato de sódio para neutralizar compostos clorados ou compostos iodados; 0,5% (p/v) de tween 80 para compostos iodados, fenólicos ou tensoativos anfóteros; 0,1% de sulfito de sódio para aldeídos. Para neutralização de quaternário de amônio ou biguanida, é recomendado o uso de caldo Letheen. A catalase é recomendada para a neutralização de peróxidos (INCQS, 1999).

3.8. Formas de neutralização do efeito residual dos desinfetantes no método de suspensão

No teste de eficácia antimicrobiana pelo método de suspensão, o procedimento básico, após decorrido o tempo de contato dos microrganismos com o desinfetante, é inocular uma alíquota da solução desinfetante (na qual os microrganismos estão suspensos) em um meio de cultura, para verificar a presença de sobreviventes. Nessa etapa, é essencial a adoção de um procedimento que impeça a continuidade da ação antimicrobiana do desinfetante, porque esse efeito, durante todo o período de incubação das culturas, implicaria numa completa alteração dos resultados do teste. Para tanto podem ser utilizados três procedimentos básicos, que são a diluição, a lavagem das células e o uso de neutralizantes, normalmente utilizados em combinação (Russell et al., 1994).

A diluição é o procedimento mais simples, que implica em diluir a solução desinfetante antes da inoculação no meio de cultura. É um procedimento de aplicação restrita, porque esbarra no limite de detecção do método, uma vez que o número de sobreviventes após o tratamento é muito baixo. Além disso, alguns

princípios ativos como os compostos a base de amônio quaternário e os metais pesados, por exemplo, mantêm efeito bacteriostático sobre alguns microrganismos mesmo quando altamente diluídos. Por esse motivo, a diluição geralmente é feita em uma solução contendo agentes neutralizantes, exceto no caso de substâncias como o álcool, por exemplo, para o qual não se dispõe de um neutralizante eficaz (Cremieux & Fleurette, 1991). Entretanto, Reybrouck (1978, 1979) relata que o uso de neutralizantes pode levar a dois tipos de problemas: em quantidade desproporcional, poderá superestimar o efeito biocida do desinfetante (ausência ou baixo grau de neutralização); outro problema que poderá ocorrer é o efeito tóxico que alguns neutralizantes possuem sobre certos tipos de microrganismos.

Langsrud & Sundheim (1998) afirmam que os neutralizantes universais podem afetar o crescimento de algumas bactérias; o metabolismo de algumas cepas de *S. aureus*, por exemplo, é prejudicado pelo tiosulfato de sódio.

A lavagem das células implica em remover, mecanicamente, as células da suspensão, o que pode ser feito por centrifugação ou por filtração em membrana. Segundo Russell et al. (1994), a filtração, adotada pela Association Française de Normalization (AFNOR) em 1987, é mais simples e rápida, porém, é essencial a aplicação de várias etapas de enxágüe, para garantir que não haja retenção de resíduos da solução desinfetante na membrana. Os mesmos autores relatam que a incorporação de neutralizantes à solução de enxágüe pode aumentar muito a eficiência do procedimento.

Langsrud & Sundheim (1998) constataram que tanto o método de filtração como o uso de neutralizantes contendo lecitina apresentavam a mesma eficiência de neutralização após tratar cepas de *E. coli* em solução de cloreto de benzalcônio (8 mg/L durante 5 min).

Russell et al. (1994) relatam que o uso de filtração com posterior enxágüe da cultura é recomendado para testes onde não são utilizados neutralizantes.

Quanto à forma de plaqueamento, Langsrud & Sundheim (1998) recomendam evitar o plaqueamento "pour plate", pois as células injuriadas podem tornar-se sensíveis ao calor. Este fato torna como ponto favorável, o uso da filtração.

O uso de neutralizantes é comum nos métodos de suspensão utilizados pela maioria dos países, havendo um certo consenso sobre os agentes que podem ser utilizados para neutralizar os princípios ativos mais comuns. A neutralização ocorre através de interações químicas entre o princípio ativo do desinfetante e o agente neutralizante, porém, em muitos casos, essa interação ocorre de forma complexa, dificultando a padronização do procedimento de neutralização de algumas substâncias químicas (Reybrouck, 1978, 1979)

3.9. Neutralização de compostos de amônio quaternário

Dados empíricos de eficácia e toxicidade de neutralizantes para diferentes princípios ativos, em diferentes concentrações, podem ser encontrados nos trabalhos de Bergan & Lystad (Block, 1991) e Reybrouck (1978, 1979), que avaliaram mais de 40 substâncias ou misturas potencialmente neutralizantes. Os resultados da avaliação dos 5 neutralizantes com melhor desempenho para compostos de amônio quaternário (cloreto de benzalcônio), aplicados contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, encontram-se sumarizados na Tabela 6.

Block (1991) relata que os resultados obtidos por Bergan & Lystad demonstraram que, a neutralização ocorre nos primeiros minutos de contato do neutralizante com o desinfetante, não havendo vantagem em prolongar o contato por mais de 30 min. Também se observou que o efeito tóxico e a eficácia dos neutralizantes varia em função da cepa testada (Reybrouck, 1978, 1979), um resultado esperado, do ponto de vista de toxicidade, mas inesperado do ponto de vista de neutralização. Esse resultado não só corrobora a complexidade do fenômeno de neutralização, como também deixa clara a necessidade de incluir as várias cepas padrão nos testes de padronização de neutralizantes para o teste de suspensão.

No teste de neutralização de concentrações de até 1.000 mg/L de cloreto de benzalcônio, aplicado contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, várias substâncias ou combinações de substâncias se mostraram eficazes, incluindo a lecitina, o sulfito de sódio e a mistura 0,3% de lecitina + 3% de Tween 80 (LP). No teste de toxicidade, a lecitina, aplicada isoladamente, apresentou efeito inibitório contra *S.*

aureus e *P. aeruginosa*, porém, em mistura com o Tween 80, esse efeito não foi observado, provavelmente devido à solubilização nesse surfactante não iônico (Reybrouck, 1978).

No teste de neutralização de 10.000mg/L de cloreto de benzalcônio, aplicado contra *P. aeruginosa*, nenhuma combinação só de lecitina e Tween 80 se mostrou eficaz, mas várias outras misturas apresentaram um bom efeito de neutralização, incluindo a combinação 2% de lecitina + 2% de Tween 80 + 0,5% de tiosulfato de sódio (LPT). No caso de *S. aureus*, nenhuma das misturas testadas se mostrou eficaz, parecendo indicar que, para utilização do método de suspensão na análise de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio, nessa faixa de concentração, será mais seguro combinar a aplicação de neutralizantes e o método de filtração, para se impedir a continuidade da ação antimicrobiana do desinfetante contra todas as cepas testadas.

3.10. Classificação dos desinfetantes no Brasil

A classificação dos desinfetantes no Brasil foi feita com base na finalidade de uso, conforme o Quadro 1 do Anexo IV, e estabelecida pela Portaria Nº 15/88 da DISAD (1988).

O uso de princípios ativos em formulação de desinfetantes no Brasil deve ser aprovado pela ANVISA, órgão fiscalizador subordinado ao Ministério da Saúde. São vários os princípios ativos autorizados para formulação de desinfetantes e o Quadro 2 do Anexo V apresenta os compostos autorizados pela Portaria 15, de 23 de agosto de 1988, do Ministério da Saúde.

Alguns compostos químicos foram aprovados somente mais tarde, como é o caso do cloridrato de polihexametileno biguanida que, através da Portaria 05/89 (DISAD,1989), foi autorizado para compor, juntamente com a clorhexidina, a classe das biguanidas em formulações de desinfetantes.

Já o ácido peracético foi autorizado através da Portaria 122/93 (DISAD,1993) somente para uso em esterilizantes, desinfetantes hospitalares para artigos semi críticos e em desinfetantes para indústria alimentícia.

3.11. Métodos oficiais para avaliar a eficácia antimicrobiana de desinfetantes no Brasil

A avaliação da eficácia pode ser feita por vários métodos, porém, no Brasil, a Portaria 700 de 08 de maio de 2001, da ANVISA, propôs um Regulamento Técnico que inclui os métodos da AOAC, última edição (Beloian, 1995), como padrão de análise para registro.

A seleção dos microrganismos a serem usados na avaliação é função tanto do aspecto avaliado (atividade bactericida, esporicida ou fungicida), como também da classificação dos desinfetantes quanto à finalidade de uso.

Na Tabela 7 do Anexo VI encontram-se sumariados os microrganismos padrão recomendados pela Portaria 15/88 (DISAD, 1988) para a avaliação da eficácia antimicrobiana dos desinfetantes registrados no Brasil; para a maioria dos usos, é exigida apenas a avaliação da atividade bactericida contra uma cepa Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma cepa Gram negativa (*Salmonella choleraesuis* e/ou *Escherichia coli*), incluindo-se *Pseudomonas aeruginosa* e duas cepas de *Mycobacterium* quando se tratam de produtos destinados ao uso hospitalar, o que aumenta o número e o grau de resistência das cepas avaliadas.

Tabela 6. Resultados da avaliação do efeito tóxico e eficácia de neutralização de 5 neutralizantes para compostos de amônio quaternário, aplicados contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, em diferentes concentrações do ativo (Reybrouck 1978, 1979).

Neutralizante	Cloreto benzalcônio (mg/L)	Neutralização* (0 = mínima 1 = máxima)		Efeito tóxico** (reduções decimais)	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
L	500	1	-	0,8	>2
	1.000	-	0,9	-	-
	10.000	-	0	-	-
P	500	0,9		0	0
	1.000	-	0,4-0,9	-	-
	10.000	-	0	-	-
T	500	0		0	0
	10.000	-	0	-	-
LP	500	0,9	-	0	0
	1.000	-	1	-	-
	10.000	-	0	-	-
LPT	500	1	-	0	0
	1.000	-	-	-	-
	10.000	-	1	-	-

L= 0,3%(p/v) Lecitina; P= 1%(v/v) Tween 80; T= 0,5%(p/v) Tiosulfato de sódio; LP= 0,3%(p/v) Lecitina+ 3%(v/v)Tween 80; LPT= 2%(p/v) Lecitina + 2%(v/v) Tween + 0,5%(p/v) Tiosulfato de sódio

* A capacidade de neutralização foi determinada através da fórmula: $IE = 1 - (\log N_c - \log N_0)$, onde IE = eficiência da neutralização, Log N_c = logaritmo da população inicial, Log N_0 = logaritmo

da população final, máximo efeito neutralizante = 1, ausência de efeito neutralizante = 0, limite aceitável para ser considerado eficaz = 0,8.

** O efeito tóxico foi determinado avaliando-se o número de reduções decimais numa população de 10^9 UFC/mL de suspensão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1. Adaptação do método de suspensão AOAC 960.09 para análise de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio

4.1.1. MATERIAIS

4.1.1.1. Soluções de desinfetante

Foram preparadas soluções de cloreto de benzalcônio p.a. nas concentrações de 200, 500, 1.000, 6.000 e 10.000 mg/L, utilizando-se água destilada estéril.

4.1.1.2. Microrganismos teste

Três culturas de microrganismos padrão foram utilizadas nos testes: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Escherichia coli* ATCC 11229.

4.1.1.3. Reagentes e meios de cultura

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ágar triptona glicose extrato de carne (TGE) - DIFCO
- Ácido sulfúrico concentrado p.a. - SYNTH
- Álcool etílico hidratado 92,8° GL
- Álcool etílico p.a. - SYNTH

- Azul de dissulfina VN 150 - MERCK
- Brometo de dimídium - VETEC
- Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) - DIFCO
- Clorofórmio p.a. - MERCK
- Cloreto de benzalcônio p.a. - VETEC
- Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a. - MALLINCKRODT
- Lauril sulfato de sódio 0,001M - DINAMICA
- Lecitina de soja purex - INLAB
- Trypticase de soja (TSB) - DIFCO
- Tween 80 - SYNTH

4.1.1.4. Materiais diversos

- Agitador de tubos tipo vortex mod. G560 - SCIENTIFIC INDUSTRIES
- Agitador tipo shaker modelo G25 - NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC COMPANY
- Alça de Drigalsky
- Bagueta de vidro
- Balança analítica modelo AG104, capacidade: 0 a 100g, resolução 0,0001g METTLER
- Balança semi analítica modelo PB3002, capacidade: 0 a 3.100 g, resolução 0,01g METTLER
- Balões volumétricos de 100 mL, 1.000 mL e 2.000 mL - BRAND
- Béquer de vidro de 15 mL, 100 mL - SCHOTT
- Bico de Bunsen - BIOMATIC
- Bomba de vácuo modelo XX5500000 - MILLIPORE

- Bureta com torneira de teflon, capacidade 10 mL - BRAND
- Capela de fluxo unidirecional classe 100 modelo VLFS-12 - VECO
- Cronômetro digital ref. 696/8 - TECHNOS
- Densímetro modelo Densimat - BIO-MÉRIEUX
- Destilador de água modelo TE178 - TECNAL
- Estantes para tubos de ensaio 25x150 mm
- Estantes para tubos de ensaio 38x150 mm
- Espátula com colher de aço inox 17 cm - RICCI
- Estufa incubadora para BOD mod. 347CD - FANEM
- Filtro descartável microfil com funil de 100 mL - MILLIPORE
- Funil de vidro diâmetro 80 mm - PYREX
- Manifold microfil 3 posições - MILLIPORE
- Membrana mist. esteres 0,45 μm - 47 mm para filtração à vácuo estéril - MILLIPORE
- Pinça de aço inox para membrana - MILLIPORE
- Pipetador macrocontrolador - BRAND
- Pipetas graduadas estéreis 1, 5 e 10 mL
- Pipeta volumétrica 1mL - BRAND
- Placas de petri descartáveis e estéreis, lisa 90x15 mm - INLAB
- Potenciômetro modelo pH 1400, capacidade de 0 a 14 pH, resolução 0,01 pH - INCIBRÁS
- Proveta graduada com tampa de polietileno, capacidade 100 mL - PYREX
- Termômetro de mercúrio, faixa de -10°C a +62°C, resolução 1°C - INCOTERM
- Tubo de ensaio autoclavável 25 mm x 150 mm ref. 9820 - PYREX, com tampa de aço inoxidável

- Tubo de ensaio autoclavável 38 mm x 150 mm sem marca, com tampa de aço inoxidável

4.1.2. Métodos

O procedimento para realização das análises pelo método de suspensão (Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants AOAC 960.09) encontra-se descrito no AOAC Official Methods of Analysis 16^a Ed. (Beloian, 1995) e esquematizado na Figura 2.

Neste trabalho, o método foi adaptado definindo-se um procedimento de neutralização capaz de impedir o efeito residual do ativo utilizado em concentrações de 200 a 10.000 mg/L. Para isso, o método de suspensão AOAC 960.09 (Figura 2) foi modificado substituindo-se a etapa de neutralização por uma etapa de filtração em membrana de éster de celulose com poro de 0,45µm de diâmetro (Figura 3).

O preparo da suspensão bacteriana teste foi realizado de acordo com o método de suspensão (Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants AOAC 960.09), através de 3 repiques sucessivos do microrganismo em ágar nutriente (NA, sigla em inglês), partindo-se de uma cultura estoque. Antes de sua utilização, a suspensão bacteriana foi ajustada de modo a conter uma população em torno de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL. A Figura 4 mostra o esquema simplificado do procedimento utilizado para preparo do inóculo.

Para a padronização do procedimento de neutralização, foram realizados testes preliminares utilizando-se soluções de cloreto de benzalcônio p.a. em várias concentrações (200, 500, 1.000, 6.000 e 10.000 mg/L) e microrganismos testes *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *E. coli* ATCC 11229. Uma vez padronizada a etapa de neutralização, a eficácia da modificação foi confirmada com desinfetantes comerciais de marcas que apresentavam formulações com cloreto de benzalcônio.

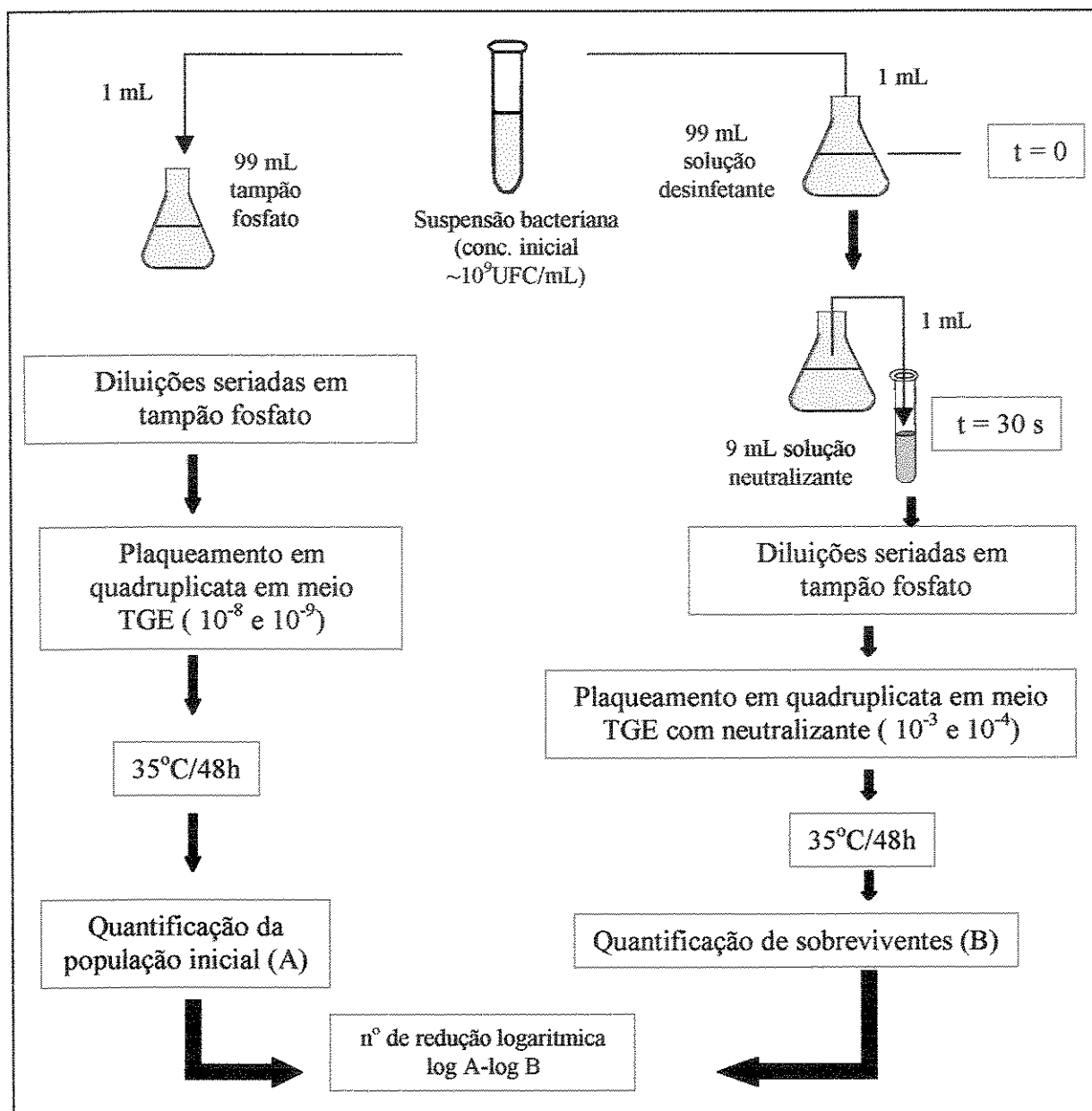


Figura 2. Esquema simplificado do método de suspensão AOAC 960.09

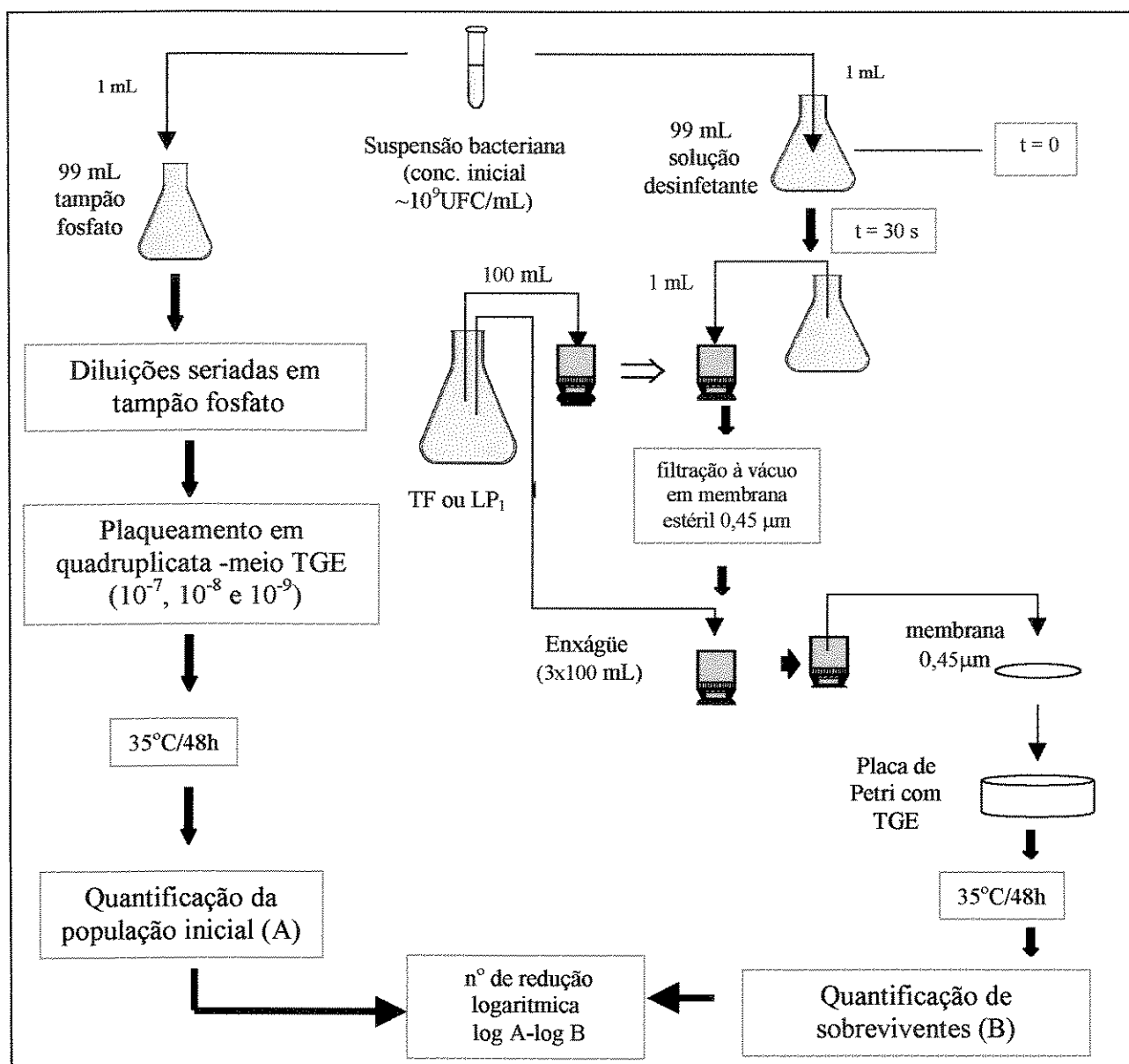


Figura 3. Esquema simplificado do método de suspensão adaptado

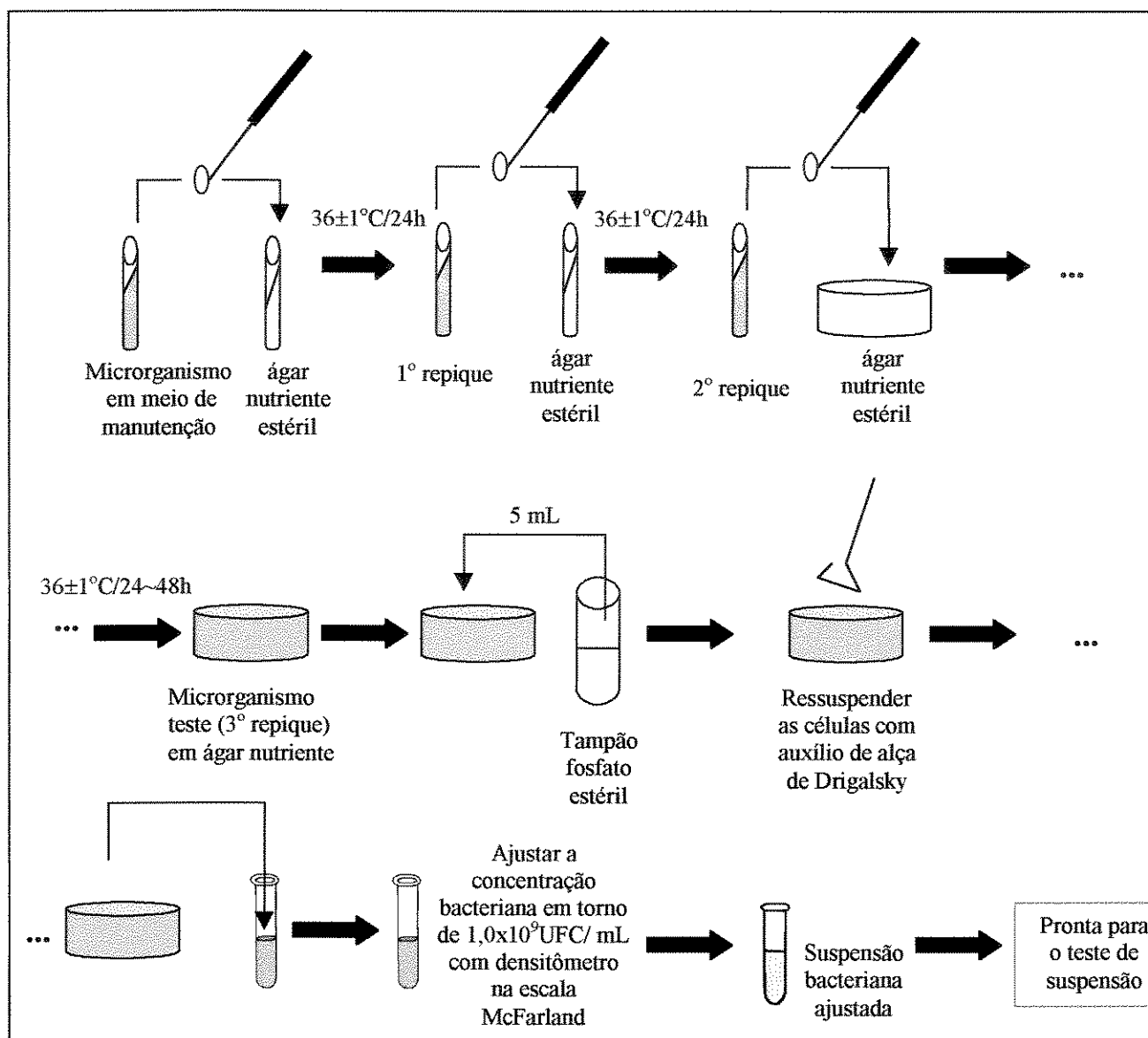


Figura 4. Esquema simplificado de preparo da suspensão bacteriana para o método de suspensão AOAC

4.1.2.1. Avaliação da eficácia dos procedimentos de filtração

Foram avaliados dois procedimentos de filtração para neutralização do efeito residual do desinfetante; um enxagüando-se as membranas por três vezes consecutivas com tampão fosfato e outro, substituindo o tampão fosfato pelo neutralizante LP1, que consiste na mistura de 0,2% de lecitina + 1,5% de Tween 80.

A avaliação da eficiência dos procedimentos de filtração foi realizada de duas formas:

- 1) dosagem do cloreto de benzalcônio residual nas membranas após a filtração e o enxágüe;
- 2) verificação do efeito inibidor residual sobre microrganismos nas membranas após a filtração - método de tubos e método de placas.

4.1.2.1.1. Dosagem do cloreto de benzalcônio residual nas membranas após o processo de filtração

Esses testes, resumidos na Figura 5, foram realizados com cloreto de benzalcônio, comparando-se o residual nas membranas enxagüadas com tampão fosfato ou neutralizante LP1 e o residual nas membranas sem enxágüe (controle positivo).

4.1.2.1.1.a. Enxágüe com tampão fosfato

Inicialmente, foi adicionado um volume de 20 mL de tampão fosfato ao copo do porta-filtro. Em seguida, 1 mL de uma solução de cloreto de benzalcônio na concentração de 10.000 mg/L foi adicionado ao copo e procedeu-se a filtração. Após a filtração, a membrana foi enxagüada por três vezes sucessivas, 100 mL por vez, com tampão fosfato.

A membrana foi transferida para um recipiente com 10 mL de água destilada e submetida à agitação no agitador tipo shaker por 15 min.

Após a agitação, foi feita a dosagem do cloreto de benzalcônio residual recolhido no líquido, através da titulação do tensoativo catiônico com um tensoativo

aniônico, utilizando como indicador, uma solução mista de brometo de dimídio (catiônico vermelho) e azul de dissulfina (aniônico azul), conforme a metodologia descrita em LONGMAN (1977).

4.1.2.1.1.b. Enxágüe com LP1

Inicialmente, foi adicionado um volume de 20 mL de LP1 ao copo do porta-filtro. Em seguida, 1 mL de uma solução de cloreto de benzalcônio, na mesma concentração utilizada no procedimento anterior, foi adicionado ao copo e procedeu-se a filtração. Após a filtração, a membrana foi enxaguada por três vezes sucessivas, 100 mL por vez, com LP1. A membrana foi transferida para um recipiente com 10 mL de água destilada e submetida à agitação no agitador tipo shaker por 15 min. Após a agitação, foi feita a dosagem do cloreto de benzalcônio residual recolhido no líquido, utilizando-se a metodologia, segundo LONGMAN (1977).

4.1.2.1.1.c. Controle positivo (sem enxágüe)

Inicialmente, foi adicionado um volume de 20 mL de tampão fosfato ao copo do porta-filtro. Em seguida, 1 mL de uma solução de cloreto de benzalcônio, na mesma concentração utilizada no procedimento anterior, foi adicionado ao copo e procedeu-se a filtração. Após a filtração e sem enxágüe posterior, a membrana foi transferida para um recipiente com 10 mL de água destilada e submetida à agitação por 15 min.

Foi feita a dosagem do cloreto de benzalcônio residual recolhido no líquido, utilizando-se a mesma metodologia citada anteriormente.

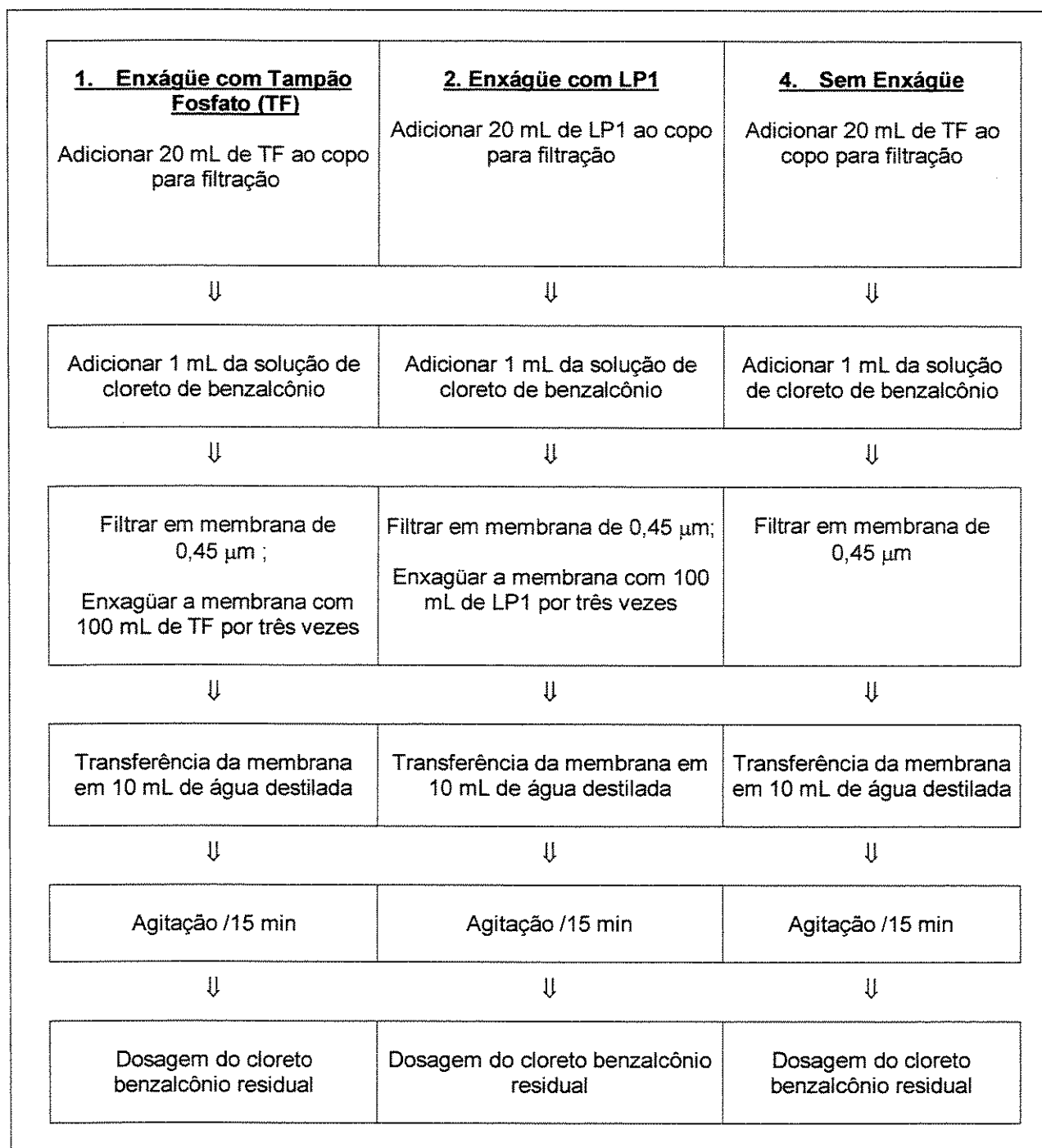


Figura 5 . Avaliação da eficiência da filtração através da dosagem da concentração de cloreto de benzalcônio residual nas membranas após a filtração.

4.1.2.1.2. Avaliação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração

4.1.2.1.2.a. Método de tubos

Esses testes foram realizados com cloreto de benzalcônio em concentrações conhecidas, comparando-se o efeito inibidor residual do desinfetante nas membranas enxaguadas com TF ou LP1 e o residual na membrana sem desinfetante (controle negativo). Cada um desses procedimentos foi feito com 5 repetições, para análise de variância. As concentrações, em mg/L, da solução de cloreto de benzalcônio testada foram: 500, 1.000, 6.000 e 10.000.

Após a filtração da solução desinfetante com enxágües subseqüentes com TF ou LP1, a membrana foi transferida para tubo contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, sigla em inglês) ou Caldo Trypticase de Soja (TSB, sigla em inglês), seguida de agitação vigorosa dos tubos.

Cada tubo foi inoculado com uma suspensão do microrganismo teste (*Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Escherichia coli* ATCC 11229 para o tubo contendo TSB e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 para o tubo contendo BHI), na faixa de 10^3 UFC/mL e incubado a 35°C/48h. Foi realizada a contagem de sobreviventes (UFC / mL) no caldo após a incubação, através de plaqueamento “pour plate” utilizando-se o meio TGE (35°C/48h), e finalmente, observada a ocorrência ou não de diferença significativa entre as contagens obtidas. A Figura 6 apresenta o esquema simplificado dos testes .

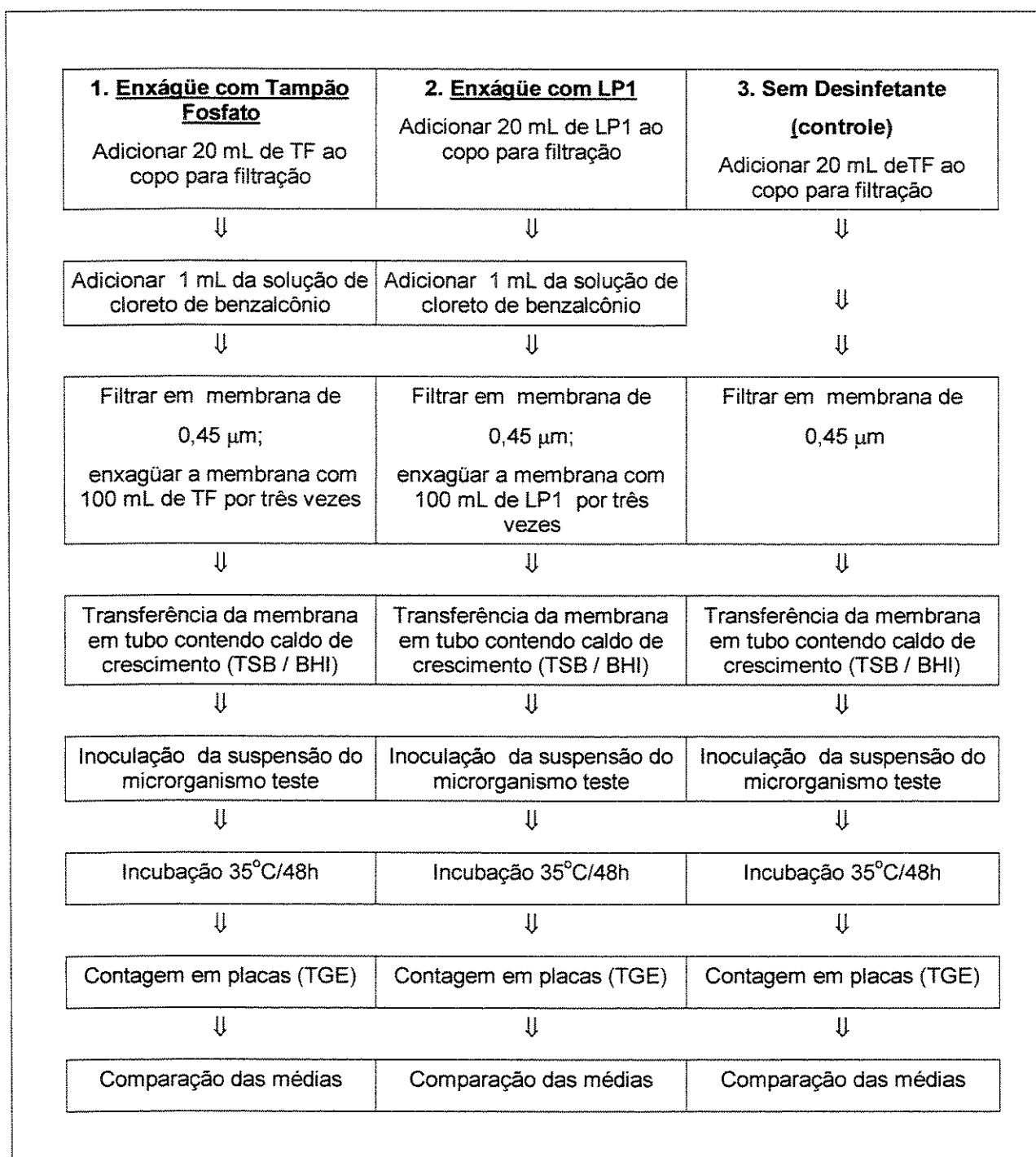


Figura 6. Esquema simplificado do teste de verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração – método de tubos

4.1.2.1.2.b. Método de placas

Esses testes foram realizados com cloreto de benzalcônio numa concentração de 10.000 mg/L, comparando-se a atividade bacteriostática do desinfetante residual nas membranas enxaguadas com o residual nas membranas sem enxágüe (controle positivo).

Inicialmente, foram preparadas placas de Petri contendo Ágar Triptona Glicose Extrato de Carne (TGE) e 0,1 mL de uma suspensão do microrganismo alvo foi espalhado na superfície das placas de TGE com auxílio de alça de Drigalsky.

Cada uma das membranas utilizadas para filtração de 1 mL da solução de cloreto de benzalcônio foi colocada no interior da placa contendo o meio TGE previamente inoculado com o microrganismo alvo.

As placas foram incubadas a 35°C / 48h e foi observada a ocorrência ou não de halo de inibição ao redor da membrana. A Figura 7 apresenta o esquema simplificado dos testes .

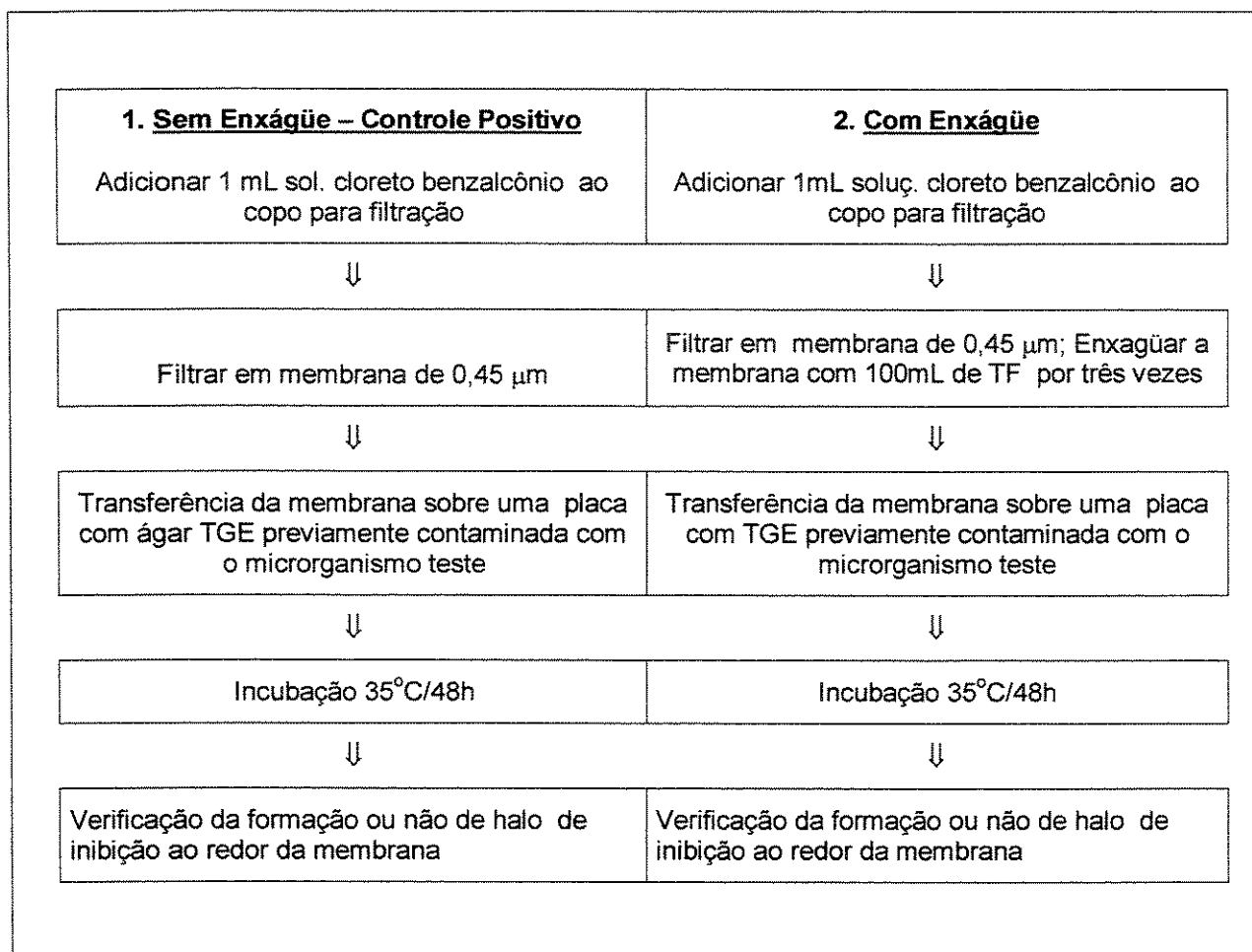


Figura 7. Esquema simplificado do teste de verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração – método de placas.

4.2. Estudo comparativo do método de diluição de uso e método de suspensão adaptado

4.2.1. MATERIAIS

4.2.1.1. Soluções de agentes desinfetantes

Foram utilizados desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio, disponíveis no mercado brasileiro para uso geral e uso na indústria alimentícia. Os desinfetantes foram testados nas concentrações e tempos de contato recomendados pelos fabricantes e também em concentrações menores, utilizando-se neste caso, água destilada estéril para diluição. Todas as concentrações testadas foram obtidas a partir da informação contida no rótulo do produto. Foram analisadas 8 marcas de desinfetantes em variadas concentrações, onde cada teste foi realizado em triplicata para cada um dos métodos

4.2.1.2. Microrganismos teste

Na análise dos desinfetantes de uso geral foram utilizadas as cepas padrão adotadas no Brasil pelo INCQS, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. Na análise dos desinfetantes para uso na indústria alimentícia foram utilizadas as cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 11229.

4.2.1.3. Reagentes e meios de cultura

- Ágar bacteriológico - DIFCO
- Ágar triptona glicose extrato de carne (TGE) - DIFCO
- Álcool etílico hidratado 92,8°GL
- Asparagina p.a. - SYNTH
- Caldo Letheen - DIFCO

- Caldo nutriente nº 2 – DIFCO
- Cloreto de benzalcônio p.a. - VETEC
- Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a. - MALLINCKRODT
- Hidróxido de sódio p.a. - SYNTH

4.2.1.4. Materiais diversos

- Agitador de tubos tipo vortex, modelo G560 - SCIENTIFIC INDUSTRIES
- Agitador tipo shaker modelo G25 - NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC COMPANY
- Alça de Drigalsky
- Alça de inoculação
- Bagueta de vidro
- Balança analítica modelo AG104, capacidade: 0 a 100 g, resolução 0,0001 g METTLER
- Balança semi analítica modelo PB3002, capacidade: 0 a 3.100 g, resolução 0,01 g METTLER
- Balões volumétricos de 1.000 mL e 2.000 mL - BRAND
- Béquer de vidro de 100 mL - SCHOTT
- Bico de bunsen - BIOMATIC
- Bomba de vácuo modelo XX5500000 - MILLIPORE
- Capela de fluxo unidirecional classe 100 modelo VLFS-12 - VECCO
- Cilindros de aço inoxidável tipo 304, SS18-8, polido com 8 ± 1 mm (diâmetro externo) x 6 ± 1 mm (diâmetro interno) x 10 ± 1 mm (comprimento) - FISHER SCIENTIFIC
- Cronômetro digital ref. 696/8 - TECHNOS

- Densímetro modelo Densimat - BIO-MÉRIEUX
- Destilador de água modelo TE178 - TECNAL
- Erlenmeyers de 250 mL e 1.000 mL
- Espátula com colher de aço inoxidável 17 cm - RICCI
- Estantes para tubos de ensaio 25x150 mm
- Estantes para tubos de ensaio 38x150 mm
- Estufa incubadora para BOD mod. 347CD - FANEM
- Filtro descartável microfil com funil de 100 mL - MILLIPORE
- Funil de vidro diâmetro 80 mm - PYREX
- Gancho de transferência com 50-70 mm, de fio Nichrome BS nº 18
- Manifold microfil 3 posições - MILLIPORE
- Membrana mist. esteréis 0,45 µm- 47 mm para filtração à vácuo estéril MILLIPORE
- Papel de filtro Whatman nº 2
- Pinça de aço inox para membrana - MILLIPORE
- Pipetador macrocontrolador - BRAND
- Pipetador portátil - DRUMMOND SCIENTIFIC COMPANY
- Pipetas graduadas estéreis 1, 5 e 10 mL
- Placas de petri descartáveis e estéreis, lisa 90 x 15 mm - INLAB
- Potenciômetro modelo pH 1400, capacidade de 0 a 14 pH, resolução 0,01 pH - INCIBRÁS
- Termômetro de mercúrio, faixa de -10°C a +62°C , resolução 1°C – INCOTERM
- Tubo de ensaio autoclavável 25 mm x 150 mm ref. 9820 - PYREX, com tampa de aço inoxidável

- Tubo de ensaio autoclavável 38 mm x 150 mm sem marca, com tampa de aço inoxidável

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Método de suspensão adaptado

O método de suspensão adaptado, conforme esquema da Figura 3, foi uma modificação do método de suspensão da AOAC 960.09, na qual a neutralização por processo químico foi substituída por processo mecânico, através de filtração com filtro de membrana de 0,45µm de porosidade.

O preparo da suspensão bacteriana teste e a quantificação do inóculo inicial foram realizados conforme a metodologia da AOAC 960.09.

A neutralização da ação da solução desinfetante foi realizada após 30 segundos de contato entre esta e o microrganismo teste, pela filtração de 1 mL da solução de desinfetante mais microrganismos, diluída em 100 mL de tampão fosfato, e seguida por 3 enxágües sucessivas com a solução tampão. A seguir, a membrana foi posicionada sobre uma placa contendo meio TGE, incubada à $36\pm 1^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ e procedeu-se à contagem do número de sobreviventes.

O desinfetante, para ser considerado eficaz através do teste de suspensão adaptado, teve que promover pelo menos 5 reduções logarítmicas, ou seja, reduzir pelo menos 99,999% da população bacteriana.

4.2.2.2. Método de diluição de uso da AOAC

O teste de diluição de uso da AOAC avalia, qualitativamente, a eficiência bactericida de desinfetantes através da utilização de cilindros carreadores de dimensões padronizados. O preparo da suspensão bacteriana teste foi realizado através de 4 repiques sucessivos do microrganismo (os primeiros três repiques de $24\text{h}/36\pm 1^{\circ}\text{C}$ e o quarto de $48\text{h}/36\pm 1^{\circ}\text{C}$) em caldo nutriente, partindo-se de uma

cultura estoque. O repique foi feito através de transferência de uma alçada da massa celular em 10 mL de caldo nutriente, com auxílio de uma alça de inoculação. A Figura 8 mostra um esquema simplificado do procedimento de preparo do inóculo, segundo o método de diluição de uso da AOAC.

Os cilindros de aço inoxidável foram previamente preparados para o teste, mergulhando-os em solução de NaOH 1N durante uma noite. Após a remoção total de NaOH através da passagem dos cilindros em água corrente e em água destilada, os cilindros foram imergidos em solução de asparagina a 0,1% (p/v) e autoclavados a $121^{\circ}\text{C}/20\text{min}$.

A etapa de contaminação dos cilindros carreadores foi feita através da sua imersão na suspensão bacteriana por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, os cilindros foram colocados em posição vertical, dentro de uma placa de Petri estéril previamente forrada com 2 folhas de papel de filtro. A placa com os cilindros foi incubada a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 40 min para a secagem.

Após a secagem, cada um dos cilindros contaminados foi colocado em contato com a solução desinfetante durante 10 min e em seguida foi feita a neutralização da ação desinfetante residual no cilindro. A etapa de neutralização foi realizada mergulhando-se cada cilindro nos primeiros 10 mL de caldo Letheen durante 20 min e depois, a transferência final num outro tubo contendo 10 mL do mesmo caldo de subcultivo. Todos os tubos contendo caldo Letheen foram incubados a $36\pm 1^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. O desinfetante, para ser considerado eficaz através do teste de diluição de uso, deverá ser capaz de destruir os microrganismos teste em 59 dos 60 cilindros utilizados, conforme descrito no AOAC Official Methods of Analysis 15^a Edição (Beloian, 1984). A Figura 9 mostra o fluxograma simplificado de análise pelo método de diluição de uso da AOAC.

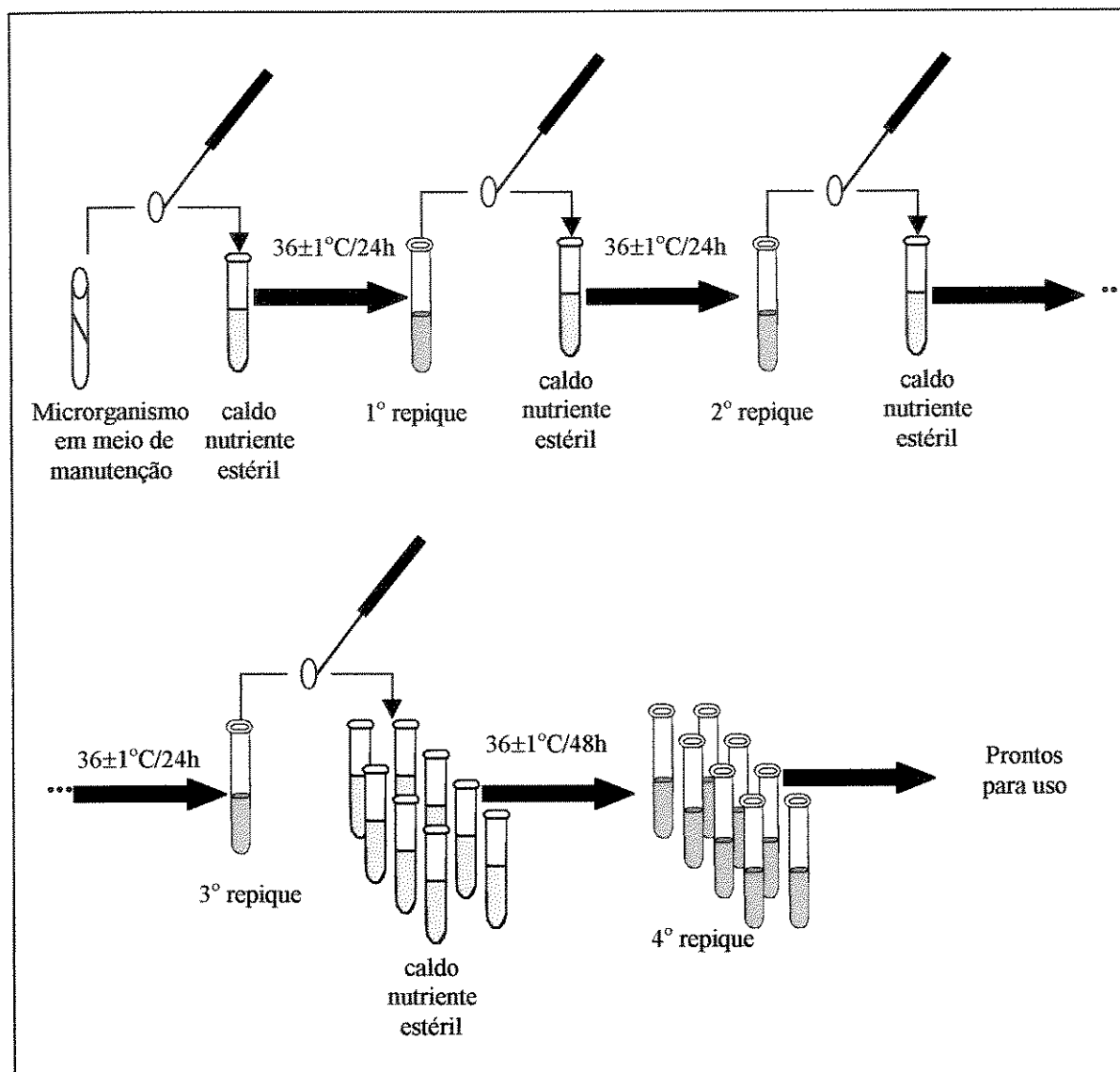


Figura 8. Preparo do inóculo - Método de Diluição de Uso

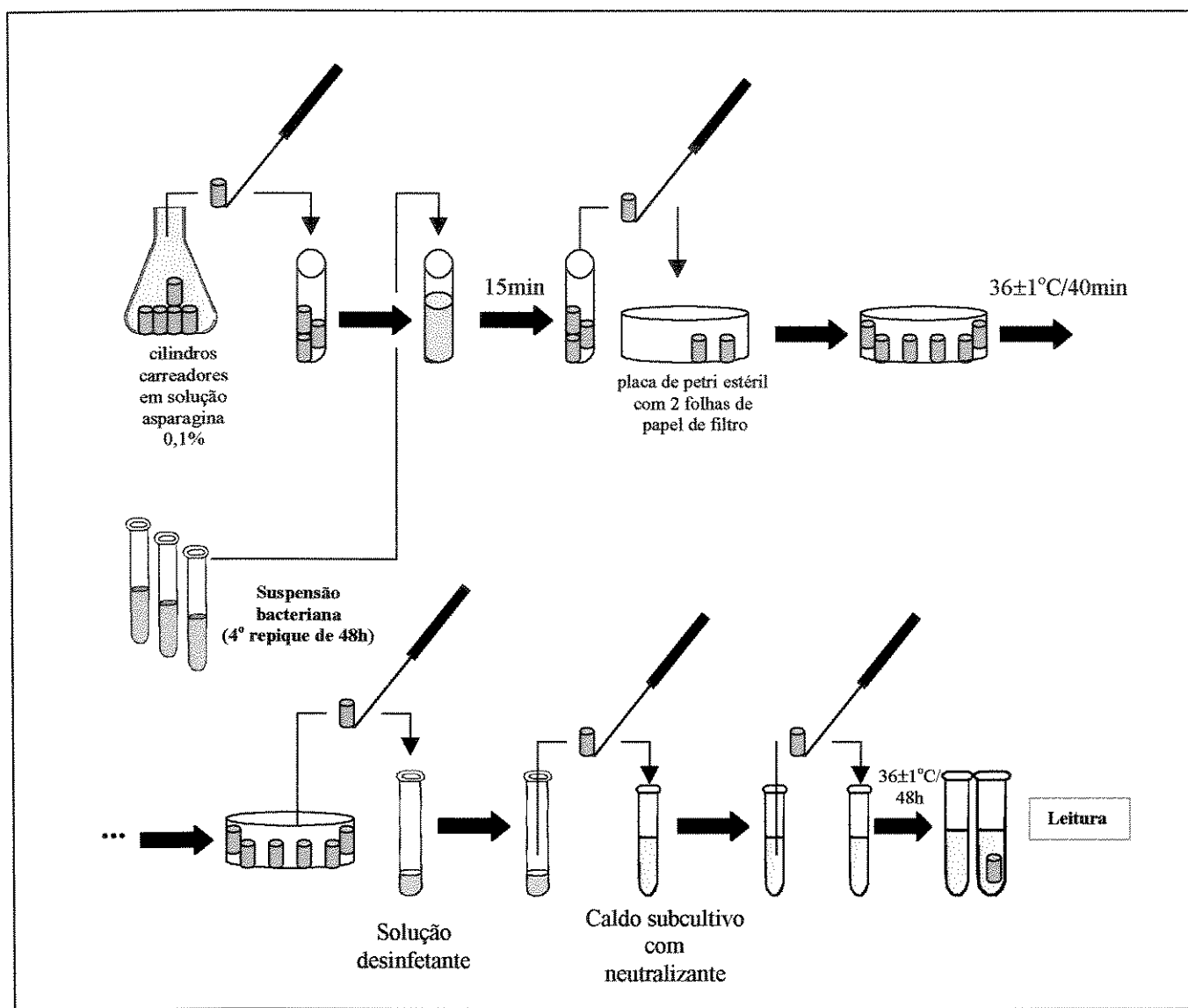


Figura 9. Esquema do método de diluição de uso

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Adaptação do método de suspensão AOAC 960.09 para análise de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio

5.1.1. Dosagem do teor de cloreto de benzalcônio residual nas membranas após o processo de filtração

Os resultados da dosagem do teor de cloreto de benzalcônio residual nas membranas após o processo de filtração encontram-se apresentados na Tabela 8.

Pode-se observar que, após a filtração da solução a 10.000 mg/L, mesmo sem enxágüe apenas 0,31% do princípio ativo permaneceu retido na membrana (10mg filtrados, 0,031 mg retidos, em média). Tanto o enxágüe com LP1 quanto o enxágüe com tampão fosfato mostraram-se igualmente eficientes para eliminar esse resíduo, não sendo detectada a presença do princípio ativo nas membranas após a aplicação desses dois procedimentos.

5.1.2. Verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração utilizando o método de tubos.

Os resultados da avaliação do efeito inibidor residual nas membranas utilizando o método de tubos encontram-se apresentados na Tabela 9.

Em cada uma das situações testadas (enxágüe com TF, enxágüe com LP1 e sem desinfetante), foram determinados parâmetros estatísticos para análise de variância.

Na interpretação através da análise de variância, verificou-se que na maioria dos casos, não houve diferença significativa entre as 3 situações, com nível de significância de 99%.

Os resultados demonstraram que a presença da membrana não interferiu no crescimento da cultura em caldo, tanto enxaguada com tampão fosfato como enxaguada com LP1, confirmando, mais uma vez a eficiência da filtração.

Tabela 8. Teor de cloreto de benzalcônio residual nas membranas após o processo de filtração de 1 mL da solução a 10.000 mg/L.

Repetição	Quantidade inicial adicionada (mg)	Quantidade residual na membrana (mg)		
		Sem enxágüe	Enxágüe com tampão fosfato	Enxágüe com LP1
1	10,021	0,025	ND	ND
2	10,003	0,033	ND	ND
3	10,017	0,033	ND	ND
Média	10,013	0,031	-	-

ND = Não Detectado

Tabela 9. Verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração de soluções de cloreto de benzalcônio utilizando o método de tubos.

Cloreto benzalcônio (mg/L)	Cepa	Indicador estatístico	Contagem final de microrganismos (Log UFC/mL)			Análise de variância
			1. Enxág. com TF	2. Enxág. com LP1	3. Sem desinfetante	
10.000	<i>S. aureus</i>	μ	9,36	9,10	9,53	Não houve diferença significativa
		σ	0,43	0,11	0,10	
		CV	4,59	1,25	1,09	
	<i>E. coli</i>	μ	7,56	8,11	8,35	Não houve diferença significativa
		σ	0,69	0,32	1,46	
		CV	9,17	4,01	17,43	
	<i>Salmonella</i>	μ	9,85	9,90	9,93	Não houve diferença significativa
		σ	0,15	0,14	0,06	
		CV	1,50	1,39	0,56	
6.000	<i>E. coli</i>	μ	8,55	8,67	8,99	Não houve diferença significativa
		σ	0,49	0,47	0,28	
		CV	5,77	5,47	3,13	
	<i>S. aureus</i>	μ	8,18	8,24	8,39	Não houve diferença significativa
		σ	1,01	0,82	0,64	
		CV	12,33	9,94	7,64	
1.000	<i>Salmonella</i>	μ	9,43	10,13	9,71	Não houve diferença significativa
		σ	0,39	0,48	0,08	
		CV	4,09	4,76	0,81	
	<i>S. aureus</i>	μ	9,23	8,52	9,01	Não houve diferença significativa
		σ	0,26	0,53	0,14	
		CV	2,83	6,24	1,55	
	<i>E. coli</i>	μ	9,54	9,84	10,06	Não houve diferença significativa
		σ	0,48	0,15	0,13	
		CV	5,05	1,48	1,30	
500	<i>S. aureus</i>	μ	9,33	8,60	9,12	Não houve diferença significativa
		σ	0,08	0,33	0,78	
		CV	0,81	3,82	8,60	
	<i>Salmonella</i>	μ	9,49	8,96	10,05	Houve diferença entre 2 e 3
		σ	0,17	0,72	0,31	
		CV	1,77	8,09	3,09	
	<i>E. coli</i>	μ	8,51	8,98	8,48	Não houve diferença significativa
		σ	1,11	0,70	1,42	
		CV	12,99	7,77	16,76	

* μ = média; σ = desvio padrão ; CV = coeficiente de variação

5.1.3. Verificação do efeito inibidor residual nas membranas após a filtração utilizando o método de placas

Os resultados do efeito inibidor residual nas membranas após o processo de filtração encontram-se apresentados na Tabela 10.

Pode-se observar que, mesmo depois do simples processo de filtração, sem enxágüe, nenhuma formação de halo de inibição foi encontrado ao redor das membranas, confirmando a eficiência da filtração.

Tabela 10. Avaliação do efeito inibidor residual nas membranas após o processo de filtração de 1 mL da solução de cloreto de benzalcônio a 10.000 mg/L utilizando o método de placas.

Microrganismo	Repetição	Efeito inibidor residual		
		Sem enxágüe (controle +)	Enxágüe com TF	Enxágüe con LP1
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 1070	1	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> ATCC 11229	1	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND

ND = Não Detectado

5.2. COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE DILUIÇÃO DE USO E O MÉTODO DE SUSPENSÃO ADAPTADO

A etapa de filtração mostrou-se um eficiente substituto da etapa de neutralização química no método de suspensão, conforme os resultados anteriores. Entretanto, para verificar a eficácia do método de suspensão adaptado, foi necessária uma avaliação comparativa em relação ao método de diluição de uso.

Os resultados globais da comparação entre os dois métodos encontram-se sumariados nas tabelas 11, 12 e 13 (Anexos I, II e III, respectivamente) .

Foram realizados 174 testes utilizando os métodos de diluição de uso e suspensão adaptado em paralelo, nas análises de 13 amostras de desinfetantes, variando-se a concentração e a cepa testada. Na interpretação dos resultados foram utilizados os critérios recomendados pela AOAC, para considerar o desinfetante eficaz ou não contra a cepa testada, ou seja:

- ◆ Teste de diluição de uso – eficaz quando não mais do que 1 cilindro apresentou sobreviventes, dentre os 60 testados naquela concentração.
- ◆ Teste de suspensão – eficaz quando o número de reduções decimais foi maior ou igual a 5,0 Log UFC/mL naquela concentração.

Dos 174 testes realizados, 123 (70,7%) apresentaram concordância entre os resultados, isto é, os dois métodos aprovaram ou reprovaram o desinfetante. Em 51 testes (29,3%) foi observada discordância, com 46 (26,4%) reprovados no teste de diluição de uso e aprovados no teste de suspensão adaptado, e 5 (2,9%) aprovados no teste de diluição de uso e reprovados no teste de suspensão adaptado (Tabela 14).

Dos 174 testes, 66 foram efetuados em concentração até 200 mg/L e 108 testes com concentrações acima de 200 mg/L. O grau de concordância entre os 2 métodos foi maior que a discordância em toda faixa de concentração testada (Tabela 15).

Tabela 14. Comparação entre os dois métodos de avaliação da eficiência de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio

Concordância entre os métodos		Discordância entre os métodos	
Aprovação pelos 2 métodos	Reprovação pelos 2 métodos	Aprovado pelo método diluição de uso e reprovado pelo método de suspensão adaptado	Reprovado pelo método diluição de uso e aprovado pelo método de suspensão adaptado
117 testes (67,2%)	06 testes (3,5%)	5 testes (2,9%)	46 testes (26,4%)

Tabela 15. Grau de concordância e discordância entre os 2 métodos, em função da faixa de concentração de cloreto de benzalcônio.

<200 mg/L (total 66 testes)				≥200 mg/L (total 108 testes)			
Concordância		Discordância		Concordância		Discordância	
59,1% (39/66)		40,9% (27/66)		77,8% (84/108)		22,2% (24/108)	
Aprovação pelos 2 métodos	Reprovação pelos 2 métodos	Aprovado pelo método diluição de uso e reprovado pelo método de suspensão adaptado	Reprovado pelo método diluição de uso e aprovado pelo método de suspensão adaptado	Aprovação pelos 2 métodos	Reprovação pelos 2 métodos	Aprovado pelo método diluição de uso e reprovado pelo método de suspensão adaptado	Reprovado pelo método diluição de uso e aprovado pelo método de suspensão adaptado
33	06	03	23	84	0	02	22

Nas concentrações menores que 200 mg/L, o índice de reprovação dos testes pelo método de diluição de uso foi maior do que pelo método de suspensão adaptado; estes resultados corroboraram com a hipótese de que a fixação dos microrganismos no carreador, com a conseqüente formação de biofilmes, pode

oferecer proteção às células contra a ação do princípio ativo, tornando o método de diluição de uso mais rigoroso do que o método de suspensão, na aprovação de um desinfetante. Porém, mesmo em concentrações muito superiores, o método de diluição de uso continuou reprovando mais em relação ao método de suspensão adaptado, isto ocorre devido à sua baixa repetibilidade (baixo grau de concordância dentro do método), e que poderá ser observada nas avaliações subsequentes.

Foi estudada a possibilidade de se padronizar o método de suspensão para toda faixa de concentração. Entretanto, nas concentrações menores (até 200 mg/L), o método aprovou um número muito maior de amostras do que o método padrão oficial (diluição de uso), ou seja, a discordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi maior.

Para avaliação do grau de concordância dentro de cada método, foram efetuadas análises em triplicata. Do total de 58 triplicatas, 48 (82,7%) apresentaram concordância entre si dentro do método de suspensão adaptado, contra 33 (56,9%) no método de diluição de uso (Tabela 16).

TABELA 16. Avaliação da repetibilidade entre os testes em triplicata

Método de suspensão		Método de diluição de uso	
Concordância	Discordância	Concordância	Discordância
.....82,7%..... .(48/58)	17,3% (10/58)	56,9% (33/58)	43,1% (25/58)

Do total de 58 triplicatas, metade foram testadas em concentrações menores ou iguais a 200 mg/L e as outras 29 triplicatas, em concentrações maiores que 200

mg/L. Tanto em concentrações até 200 mg/L quanto em valores maiores, o método de suspensão adaptado mostrou maior concordância dentro das análises em triplicata:

- Em concentrações até 200 mg/L, observou-se 72,4% (21/29) de concordância pelo método de suspensão contra 44,8% (13/29) pelo método de diluição de uso.
- Em concentrações maiores que 200 mg/L, o método de suspensão adaptado mostrou um grau de concordância de 93,1% (27/29), enquanto que o método de diluição de uso apresentou grau de concordância de 69% (20/29).

Fato importante que deve ser observado é que, em concentrações acima de 200 mg/L, a discordância entre os resultados das análises em triplicata foi maior no método de diluição de uso (31%) do que no método de suspensão adaptado (6,9%) (Tabela 17). Esse baixo grau de repetibilidade obtido confirmou os relatos de Robinson et al. (1988), Cole et al. (1987a,1987b), Cremieux & Fleurette (1991), Andrade & Macêdo (1996), Alfano et al. (1988) e Myers (1988), que se referiram aos fatores que influem na variabilidade do método de diluição de uso.

Tabela 17. Avaliação de repetibilidade de cada método, em função da faixa de concentração testada.

Método de suspensão adaptado				Método de diluição de uso			
Concordância		Discordância		Concordância		Discordância	
Até 200 mg/L	Acima de 200 mg/L	Até 200 mg/L	Acima de 200 mg/L	Até 200 mg/L	Acima de 200 mg/L	Até 200 mg/L	Acima de 200 mg/L
72,4% (21/29)	93,1% (27/29)	27,6% (8/29)	6,9% (2/29)	44,8% (13/29)	69% (20/29)	55,2% (16/29)	31% (9/29)

Em relação ao microrganismo teste (Tabela 18), do total de 19 triplicatas de análises com *E. coli*, o grau de concordância no método de suspensão (84,2%) foi superior ao método de diluição de uso (57,9%). Observou-se também que, para o *S. aureus*, o grau de concordância dentro do método de suspensão foi superior (85,7%) ao método de diluição de uso (66,7%). O mesmo ocorreu para a *S. choleraesuis*, onde 77,8% das triplicatas apresentaram concordância dentro do método de suspensão, contra 44,5 % no método de diluição de uso.

Dessa forma, verificou-se que o método de suspensão adaptado apresentou uma repetibilidade maior que o método de diluição de uso, independentemente do microrganismo teste. Quanto ao método de diluição de uso, a baixa repetibilidade ocorrida veio a confirmar o relato de Robinson et al. (1988), no que diz respeito ao grau diferenciado de adesão de diferentes microrganismos sobre os cilindros carreadores.

Tabela 18. Percentagem de repetibilidade em triplicata de análises, em função do tipo da cepa testada.

<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. choleraesuis</i>	
método de suspensão adaptado	método de diluição de uso	método de suspensão adaptado	método de diluição de uso	método de suspensão adaptado	método de diluição de uso
84,2%	57,9%	85,7%	66,7%	77,8%	44,5 %

A vantagem do método de suspensão adaptado em relação ao método de diluição de uso reside na repetibilidade maior apresentada, além de economia de tempo e de materiais requeridos.

Sob esses aspectos, o método de suspensão adaptado mostrou-se eficiente para determinar a atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio, sendo uma boa alternativa para substituir o método de diluição de uso para concentrações acima de 200 mg/L do mesmo princípio ativo.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se:

6.1. O processo de filtração, com subsequente enxágüe das membranas com neutralizante LP1 ou com TF, é eficiente para eliminação da atividade residual do cloreto de benzalcônio sobre os microrganismos testados, viabilizando sua utilização dentro do método de suspensão adaptado.

6.2. Na comparação entre os 2 métodos, evidenciou-se um grau de concordância maior (70,7%) do que de discordância (29,3%), ou seja, mais da metade do total de testes comparativos apresentaram concordância entre os 2 métodos.

6.3. Nas avaliações dentro de um mesmo método, o teste de diluição de uso apresentou um menor grau de repetibilidade que o de suspensão adaptado, independentemente da concentração da solução desinfetante e tipo de microrganismo testado.

6.4. O método de suspensão adaptado apresenta-se como um bom método alternativo quantitativo para avaliar a atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio, na faixa de concentração bactericida recomendada pelos fabricantes, ou seja, acima de 200 mg/L.

7. ANEXOS

ANEXO I

Tabela 11. Resultados dos testes de avaliação da eficiência bactericida de soluções de cloreto de benzalcônio frente à *E. coli*, utilizando-se os métodos de diluição de uso e o de suspensão adaptado.

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
10.000	<i>E. coli</i>	10	0/60	>7,17
10.000	<i>E. coli</i>	10	0/60	5,61
10.000	<i>E. coli</i>	10	0/60	5,01
7.900	<i>E. coli</i>	2	0/60	>7,09
7.900	<i>E. coli</i>	2	0/60	>7,56
7.900	<i>E. coli</i>	2	0/60	>6,12
7.500	<i>E. coli</i>	4	0/60	>7,09
7.500	<i>E. coli</i>	4	1/60	>6,12
7.500	<i>E. coli</i>	4	0/60	>7,59
7.400	<i>E. coli</i>	3	1/60	>7,09
7.400	<i>E. coli</i>	3	1/60	>7,09
7.400	<i>E. coli</i>	3	1/60	>7,09
7.100	<i>E. coli</i>	1	0/60	>7,09
7.100	<i>E. coli</i>	1	0/60	>6,12
7.100	<i>E. coli</i>	1	0/60	>7,17
5.000	<i>E. coli</i>	9	2/60	>6,98
5.000	<i>E. coli</i>	9	2/60	>6,12
5.000	<i>E. coli</i>	9	0/60	>7,59
5.000	<i>E. coli</i>	11	0/60	>6,60
5.000	<i>E. coli</i>	11	0/60	>6,60
5.000	<i>E. coli</i>	11	3/60	>6,60
1.805	<i>E. coli</i>	6	1/60	7,56
1.805	<i>E. coli</i>	6	0/60	>6,12
1.805	<i>E. coli</i>	6	2/60	>7,17
1.000	<i>E. coli</i>	0	0/60	>6,46

Tabela 11. Continuação

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
1.000	<i>E. coli</i>	0	0/60	>6,80
1.000	<i>E. coli</i>	0	0/60	7,56
500	<i>E. coli</i>	0	0/60	>6,75
500	<i>E. coli</i>	0	2/60	>6,80
500	<i>E. coli</i>	0	8/60	>7,56
500	<i>E. coli</i>	10	0/60	>7,17
500	<i>E. coli</i>	10	0/60	>7,17
500	<i>E. coli</i>	10	0/60	6,38
390	<i>E. coli</i>	5	0/60	6,38
390	<i>E. coli</i>	5	0/60	6,12
390	<i>E. coli</i>	5	3/60	>7,59
200	<i>E. coli</i>	0	0/60	5,94
200	<i>E. coli</i>	0	0/60	6,80
200	<i>E. coli</i>	0	1/60	>7,56
200	<i>E. coli</i>	10	1/60	>7,17
200	<i>E. coli</i>	10	1/60	>7,17
200	<i>E. coli</i>	10	0/60	6,38
200	<i>E. coli</i>	11	1/60	>7,99
200	<i>E. coli</i>	11	2/60	>7,99
200	<i>E. coli</i>	11	3/60	>7,99
150	<i>E. coli</i>	7	2/60	>7,56
150	<i>E. coli</i>	7	0/60	4,04
150	<i>E. coli</i>	7	0/60	>6,12
150	<i>E. coli</i>	8	2/60	4,10
150	<i>E. coli</i>	8	0/60	>7,56
150	<i>E. coli</i>	8	0/60	>6,12
100	<i>E. coli</i>	7	1/60	>6,98
100	<i>E. coli</i>	7	1/60	>7,56
100	<i>E. coli</i>	7	0/60	>6,12

Tabela 11. Continuação

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
20	<i>E. coli</i>	9	15/60	5,4
20	<i>E. coli</i>	9	4/60	3,93
20	<i>E. coli</i>	9	4/60	<4,77

ANEXO II

Tabela 12. Resultados dos testes de avaliação da eficiência bactericida de soluções de cloreto de benzalcônio frente à *S. choleraesuis*, utilizando-se os métodos de diluição de uso e o de suspensão adaptado.

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
10.000	<i>S. choleraesuis</i>	12	0/60	>7,22
10.000	<i>S. choleraesuis</i>	12	0/60	>7,22
10.000	<i>S. choleraesuis</i>	12	0/60	>7,22
7.400	<i>S. choleraesuis</i>	3	0/60	>7,50
7.400	<i>S. choleraesuis</i>	3	0/60	>7,64
7.400	<i>S. choleraesuis</i>	3	0/60	>7,63
6.700	<i>S. choleraesuis</i>	2	0/60	>7,65
6.700	<i>S. choleraesuis</i>	2	0/60	>5,51
6.700	<i>S. choleraesuis</i>	2	0/60	>7,63
1.000	<i>S. choleraesuis</i>	0	0/60	>7,30
1.000	<i>S. choleraesuis</i>	0	2/60	7,13
1.000	<i>S. choleraesuis</i>	0	1/60	>7,76
500	<i>S. choleraesuis</i>	0	0/60	>7,27
500	<i>S. choleraesuis</i>	0	0/60	>7,61
500	<i>S. choleraesuis</i>	0	3/60	>7,76
390	<i>S. choleraesuis</i>	5	0/60	5,38
390	<i>S. choleraesuis</i>	5	0/60	>5,51
390	<i>S. choleraesuis</i>	5	0/60	>7,63
375	<i>S. choleraesuis</i>	4	1/60	4,50
375	<i>S. choleraesuis</i>	4	0/60	>7,64
375	<i>S. choleraesuis</i>	4	1/60	7,63
200	<i>S. choleraesuis</i>	0	2/60	>7,30
200	<i>S. choleraesuis</i>	0	1/60	>7,45
200	<i>S. choleraesuis</i>	0	1/60	>7,61
200	<i>S. choleraesuis</i>	12	36/60	>6,74

Tabela 12 Continuação

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
200	<i>S. choleraesuis</i>	12	15/60	>6,74
200	<i>S. choleraesuis</i>	12	0/60	>6,74
150	<i>S. choleraesuis</i>	7	0/60	>7,66
150	<i>S. choleraesuis</i>	7	3/60	>7,63
150	<i>S. choleraesuis</i>	7	0/60	>5,51
150	<i>S. choleraesuis</i>	2	1/60	7,51
150	<i>S. choleraesuis</i>	2	0/60	7,64
150	<i>S. choleraesuis</i>	2	0/60	>7,63
150	<i>S. choleraesuis</i>	1	1/60	>7,57
150	<i>S. choleraesuis</i>	1	0/60	>7,64
150	<i>S. choleraesuis</i>	1	2/60	>7,42
150	<i>S. choleraesuis</i>	4	4/60	>7,45
150	<i>S. choleraesuis</i>	4	1/60	>7,64
150	<i>S. choleraesuis</i>	4	1/60	6,82
100	<i>S. choleraesuis</i>	2	0/60	7,47
100	<i>S. choleraesuis</i>	2	2/60	>7,64
100	<i>S. choleraesuis</i>	2	0/60	7,33
100	<i>S. choleraesuis</i>	1	2/60	6,88
100	<i>S. choleraesuis</i>	1	0/60	7,64
100	<i>S. choleraesuis</i>	1	1/60	7,42
100	<i>S. choleraesuis</i>	4	2/60	>7,61
100	<i>S. choleraesuis</i>	4	0/60	6,94
100	<i>S. choleraesuis</i>	4	0/60	4,91
50	<i>S. choleraesuis</i>	2	4/60	>7,57
50	<i>S. choleraesuis</i>	2	2/60	<5,24
50	<i>S. choleraesuis</i>	2	3/60	<5,02
50	<i>S. choleraesuis</i>	1	4/60	<5,05

Tabela 12 Continuação

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
50	<i>S. choleraesuis</i>	1	5/60	6,46
50	<i>S. choleraesuis</i>	1	3/60	5,52

ANEXO III

Tabela 13. Resultados dos testes de avaliação da eficiência bactericida de soluções de cloreto de benzalcônio frente à *S. aureus*, utilizando-se os métodos de diluição de uso e o de suspensão adaptado.

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
10.000	<i>S. aureus</i>	12	0/60	>6,95
10.000	<i>S. aureus</i>	12	1/60	>6,95
10.000	<i>S. aureus</i>	12	1/60	>6,95
7.900	<i>S. aureus</i>	2	0/60	>7,03
7900	<i>S. aureus</i>	2	0/60	>7,46
7.900	<i>S. aureus</i>	2	1/60	>6,03
7.800	<i>S. aureus</i>	5	0/60	>8,00
7.800	<i>S. aureus</i>	5	0/60	>6,03
7.800	<i>S. aureus</i>	5	0/60	>7,17
7.500	<i>S. aureus</i>	4	0/60	>8,00
7.500	<i>S. aureus</i>	4	1/60	>6,03
7.500	<i>S. aureus</i>	4	0/60	>7,17
7.400	<i>S. aureus</i>	3	0/60	>7,03
7.400	<i>S. aureus</i>	3	0/60	>7,17
7.400	<i>S. aureus</i>	3	0/60	>6,13
7.400	<i>S. aureus</i>	1	0/60	>7,13
7.400	<i>S. aureus</i>	1	0/60	>6,03
7.400	<i>S. aureus</i>	1	2/60	>7,17
7.100	<i>S. aureus</i>	1	0/60	>7,23
7.100	<i>S. aureus</i>	1	0/60	>7,03
7.100	<i>S. aureus</i>	1	0/60	>6,03
5.000	<i>S. aureus</i>	11	29/60	>7,48
5.000	<i>S. aureus</i>	11	38/60	>7,48
5.000	<i>S. aureus</i>	11	31/60	>7,48
1.000	<i>S. aureus</i>	0	0/60	<4,35

Tabela 13. Continuação

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
1.000	<i>S. aureus</i>	0	0/60	>7,52
1.000	<i>S. aureus</i>	0	3/60	>7,14
500	<i>S. aureus</i>	0	1/60	>6,95
500	<i>S. aureus</i>	0	1/60	>7,03
500	<i>S. aureus</i>	0	1/60	>7,46
200	<i>S. aureus</i>	11	60/60	6,95
200	<i>S. aureus</i>	11	59/60	>6,95
200	<i>S. aureus</i>	11	59/60	>6,95
200	<i>S. aureus</i>	12	0/60	6,95
200	<i>S. aureus</i>	12	0/60	6,47
200	<i>S. aureus</i>	12	1/60	6,95
150	<i>S. aureus</i>	7	5/60	>5,95
150	<i>S. aureus</i>	7	3/60	>7,52
150	<i>S. aureus</i>	7	1/60	6,54
150	<i>S. aureus</i>	8	1/60	>5,95
150	<i>S. aureus</i>	8	1/60	>7,46
150	<i>S. aureus</i>	8	2/60	6,69
150	<i>S. aureus</i>	2	0/60	>5,97
150	<i>S. aureus</i>	2	1/60	>7,56
150	<i>S. aureus</i>	2	0/60	>6,03
150	<i>S. aureus</i>	1	3/60	>7,46
150	<i>S. aureus</i>	1	0/60	6,39
150	<i>S. aureus</i>	1	3/60	>7,15
100	<i>S. aureus</i>	2	1/60	>6,46
100	<i>S. aureus</i>	2	1/60	>7,46
100	<i>S. aureus</i>	2	1/60	>7,17
100	<i>S. aureus</i>	1	4/60	6,68
100	<i>S. aureus</i>	1	2/60	>7,46

Tabela 13. Continuação

Conc. (mg/L)	Cepa	Código da amostra*	Teste de diluição de uso **	Teste de suspensão adaptado Redução decimal em (log UFC/mL)***
100	<i>S. aureus</i>	1	0/60	>6,03
100	<i>S. aureus</i>	9	2/60	>7,52
100	<i>S. aureus</i>	9	0/60	3,93
100	<i>S. aureus</i>	9	1/60	5,99
50	<i>S. aureus</i>	2	2/60	>7,18
50	<i>S. aureus</i>	2	4/60	>7,52
50	<i>S. aureus</i>	2	36/60	<4,74
50	<i>S. aureus</i>	1	60/60	>7,12
50	<i>S. aureus</i>	1	4/60	7,46
50	<i>S. aureus</i>	1	4/60	6,57

* Amostras analisadas:

0. Cloreto de benzalcônio p.a. "Vetec" - Vetec Química Fina Fab 01/2000 Valid. 01/2003
1. Desinfetante "Pinho Jet Plus" Búfalo Fab 05/06/00 – Princípio ativo=cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 50%
2. Desinfetante "Pinho Jet Green" Búfalo Fab 05/06/00 - Princípio ativo = 1,2% de cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 50%
3. Desinfetante "Eucalipto" Búfalo Fab 14/06/00 - Princípio ativo = 1,2% de cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 50%
4. Desinfetante "Jasmin" Búfalo Fab 10/06/00 - Princípio ativo = 1,2% de cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 50%
5. Desinfetante "Lavanda" Búfalo Fab 15/06/00 - Princípio ativo = 1,2% de cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 50%
6. Desinfetante "Pinho Jet Marine" Búfalo - Princípio ativo = 1,2% de cloreto de benzalcônio a 50%
7. Desinfetante "San Pic Lavanda" Reckitt & Colman Fab 17/09/00 - Princípio ativo = 2,5% de mistura de cloreto de alquil dimetil benzil amônio e cloreto de alquil dimetil etil benzil amônio a 50%

8. Desinfetante "Pinho Thor " Bom Bril - Princípio ativo = 1,5% de quaternário de amônio a 50%
 9. Desinfetante "Kalipto Eucalipto" Bom Bril - Valid. 05/2004 - Princípio ativo = 0,5% de mistura de cloreto de alquil dimetil amônio e cloreto de alquil dimetil amônio a 100%
 10. Desinfetante "Batuta " Cera Inglesa Valid. 17/04/04 - Princípio ativo = 2% de cloreto de n-alquil dimetil benzil amônio a 50%
 11. Desinfetante "Nitex-GF-40 Lemon Fresh" Nippon Chemical Fab. 18/02/02 - Princípio ativo = 5% de cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 50%
 12. Desinfetante "Sani-T-10" Spartan do Brasil Produtos Químicos Fab. Fevereiro/2002 - Princípio ativo = 10% de cloreto de n-alquil dimetil benzil amônio
- ** N° de cilindros positivos /n° de cilindros testados.
- *** O número de reduções decimais (RD) é definido como o logaritmo da contagem antes da desinfecção menos o logaritmo da contagem após a desinfecção.

ANEXO IV

Quadro 1. Classificação de desinfetantes, segundo a Portaria 15/88 do Ministério da Saúde.

Classe	Aplicação
Uso Geral	Produtos para uso doméstico, em ambientes públicos ou privados; sobre superfícies; em aparelhos sanitários, ralos, fossas..
Uso para ind. Alimentícia	Produtos para uso em indústrias, cozinhas profissionais, frigoríficos, armazéns, laticínios e demais estabelecimentos produtores e manipuladores de alimentos; em superfícies onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios.
Uso para piscinas	Produtos para uso em águas para piscinas, particulares ou coletivas.
Uso para lactários	Produtos para uso doméstico, em creches, maternidades e hospitais.
Uso hospitalar para superfícies fixas	Produtos para uso exclusivo em hospitais e estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde; em pisos, paredes, mobiliário.
Uso hospitalar para artigos semi críticos	Produtos para uso exclusivo em hospitais e estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde; objetos e equipamentos que entram em contato com mucosas.

Fonte: Portaria 15 de 23 de agosto de 1988- Min. da Saúde

ANEXO V

Quadro 2. Princípios ativos autorizados pela Portaria 15/88 – Ministério da Saúde

- **Para Uso Geral:**
 - Classe dos aldeídos : formaldeído, glioxal, glutaraldeído e paraformaldeído;
 - Classe dos fenólicos: 4-terc-amilfenol, 2 benzil 4 clorofenol, 4 terc-butilfenol, cresóis, 2 fenilfenol, 2 hidroxidifenileter, e 2 hidroxí 2'4, 4'triloclorodifenileter;
 - Quaternários de amônio: cloreto de alquil dimetil benzil amônio, cloreto de alquil dimetil etilbenzil amônio, cloreto de alquil dimetil etiltoluil amônio, cloreto de lauril piridínio, cloreto e brometo de cetil trimetil amônio, cloreto de alquil trimetil amônio, dicloreto de polioxietileno etileno etileno e dicloreto de polioxietileno metileno etileno.
 - Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo: hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio.
 - Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo: ácido dicloroisocianúrico e os sais sódico e potássio , ácido tricloroisocianúrico, n,n, dicloroazodicarbonamida, n,n dicloro 4 carboxi benzenosulfonamida, n,n dicloro 4 metil benzenosulfonamida, n-cloro benzenosulfonamida sódica, n-cloro 4 metil benzenosulfonamida sódica, n-cloro succinimida e 5,5 dimetilhidantoína.
 - Iodo e derivados: iodo, iodo-povidina e iodóforos.
 - Álcoois e glicóis : álcool etílico, álcool feniletílico, trietilenoglicol e propilenoglicol.
 - Biquanidas: clorhexidina.
- Outros: ácido benzóico, ácido undecilênico, benzoato de sódio, dodecil di(aminoetil) glicina, dodecil aminoetil glicina, 4 hidroxibenzoato de metila, 4 hidroxibenzoato de propila, terpeno e terpinenos.
- **Para Uso Ind. alimentos:**
 - Quaternários de amônio: cloreto de alquil dimetil benzil amônio, cloreto de alquil dimetil etilbenzil amônio, cloreto de alquil dimetil etiltoluil amônio, cloreto de lauril piridínio, cloreto e brometo de cetil trimetil amônio, cloreto de alquil trimetil amônio, dicloreto de polioxietileno etileno etileno e dicloreto de polioxietileno metileno etileno.
 - Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo: hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio
 - Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo: ácido dicloroisocianúrico e os sais sódico e potássio , ácido tricloroisocianúrico, n,n, dicloroazodicarbonamida, n,n dicloro 4 carboxi benzenosulfonamida, n,n dicloro 4 metil benzenosulfonamida, n-cloro benzenosulfonamida sódica, n-cloro 4 metil benzenosulfonamida sódica, n-cloro succinimida e 5,5 dimetilhidantoína.

Fonte: Portaria 15 de 23 de agosto de 1988- Min. da Saúde

Quadro 2. Continuação.

Princípios ativos autorizados
- <u>Iodo e derivados</u>: iodo, iodo-povidina e iodóforos. - Para uso em piscinas: - <u>Quaternários de amônio</u>: cloreto de alquil dimetil benzil amônio, cloreto de alquil dimetil etilbenzil amônio, cloreto de alquil dimetil etiltoluil amônio, cloreto de lauril piridínio, cloreto e brometo de cetil trimetil amônio, cloreto de alquil trimetil amônio, dicloreto de polioxietileno etileno etileno e dicloreto de polioxietileno metileno etileno. - <u>Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo</u>: hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio. - <u>Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo</u>: ácido dicloroisocianúrico e os sais sódico e potássio, ácido tricloroisocianúrico, n,n, dicloroazodicarbonamidina, n,n dicloro 4 carboxi benzenosulfonamida, n,n dicloro 4 metil benzenosulfonamida, n-cloro benzenosulfonamida sódica, n-cloro 4 metil benzenosulfonamida sódica, n-cloro succinimida e 5,5 dimetilhidantoína. - Uso para lactários: - <u>Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo</u>: hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio. - Uso hospitalar- superfícies fixas: - <u>Classe dos fenólicos</u>: 4-terc-amilfenol, 2 benzil 4 clorofenol, 4 terc-butilfenol, cresóis, 2 fenilfenol, 2 hidroxidifenileter, e 2 hidroxí 2'4, 4'triclorodifenileter; - <u>Quaternários de amônio</u>: cloreto de alquil dimetil benzil amônio, cloreto de alquil dimetil etilbenzil amônio, cloreto de alquil dimetil etiltoluil amônio, cloreto de lauril piridínio, cloreto e brometo de cetil trimetil amônio, cloreto de alquil trimetil amônio, dicloreto de polioxietileno etileno etileno e dicloreto de polioxietileno metileno etileno. <u>Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo</u>: hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio. <u>Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo</u>: ácido dicloroisocianúrico e os sais sódico e potássio, ácido tricloroisocianúrico, n,n, dicloroazodicarbonamidina, n,n dicloro 4 carboxi benzenosulfonamida, n,n dicloro 4 metil benzenosulfonamida, n-cloro benzenosulfonamida sódica, n-cloro 4 metil benzenosulfonamida sódica, n-cloro succinimida e 5,5 dimetilhidantoína

Fonte: Portaria 15 de 23 de agosto de 1988- Min. da Saúde

Quadro 2. Continuação.

Princípios ativos autorizados
- Uso hospitalar- superfícies fixas: - <u>Iodo e derivados</u>: iodo, iodo-povidina e iodóforos. - <u>Álcoois e glicóis</u> : álcool etílico, álcool feniletílico, trietilenoglicol e propilenoglicol. - <u>Biguanidas</u>: clorhexidina. - <u>Outros</u>: ácido benzóico, ácido undecilênico, benzoato de sódio, dodecil di(aminoetil) glicina, dodecil aminoetil glicina, 4 hidroxibenzoato de metila, 4 hidroxibenzoato de propila, terpeno e terpinenos. - Uso hospitalar- artigos semi críticos: - <u>Classe dos aldeídos</u> : formaldeído, glioxal, glutaraldeído e paraformaldeído; - <u>Classe dos fenólicos</u>: 4-terc-amilfenol, 2 benzil 4 clorofenol, 4 terc-butilfenol, cresóis, 2 fenilfenol, 2 hidroxidifenileter, e 2 hidroxi 2'4, 4'triclorodifenileter; - <u>Quaternários de amônio</u>: cloreto de alquil dimetil benzil amônio, cloreto de alquil dimetil etilbenzil amônio, cloreto de alquil dimetil etiltoluil amônio, cloreto de lauril piridínio, cloreto e brometo de cetil trimetil amônio, cloreto de alquil trimetil amônio, dicloreto de polioxietileno etileno etileno e dicloreto de polioxietileno metileno etileno. - <u>Compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo</u>: hipoclorito de sódio, de lítio e de cálcio. - <u>Compostos orgânicos liberadores de cloro ativo</u>: ácido dicloroisocianúrico e os sais sódico e potássio, ácido tricloroisocianúrico, n,n, dicloroazodicarbonamidina, n,n dicloro 4 carboxi benzenosulfonamida, n,n dicloro 4 metil benzenosulfonamida, n-cloro benzenosulfonamida sódica, n-cloro 4 metil benzenosulfonamida sódica, n-cloro succinimida e 5,5 dimetilhidantoína. - <u>Iodo e derivados</u>: iodo, iodo-povidina e iodóforos. - <u>Álcoois e glicóis</u> : álcool etílico, álcool feniletílico, trietilenoglicol e propilenoglicol. - <u>Biguanidas</u>: clorhexidina. <u>Outros</u>: ác. benzóico, ác. undecilênico, benzoato de sódio, dodecil di(aminoetil) glicina, dodecil aminoetil glicina, 4 hidroxi-benzoato de metila, 4 hidroxibenzoato de propila, terpeno e terpinenos.

Fonte: Portaria 15 de 23 de agosto de 1988- Min. da Saúde

ANEXO VI

Tabela 7. Microrganismos padrão e tempo de contato utilizados na avaliação da eficácia antimicrobiana de saneantes domissanitários no Brasil (teste de diluição de uso), em função da classificação do produto (Portaria Nº 15/88, do Ministério da Saúde).

Classe de desinfetantes	Microrganismos para avaliação da atividade antimicrobiana	Tempo de contato (min.)
Uso geral	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ;	10
	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	
Ind. de alimentos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ;	10
	<i>Escherichia coli</i> ATCC11229	
Lactários	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ;	60
	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	
Uso hospitalar para superfícies fixas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ;	10
	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 ;	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	
Uso hospitalar para artigos semi críticos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ;	30
	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 ;	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442;	
	<i>Mycobacterium smegmatis</i> INCQS 00061;	
	<i>Mycobacterium bovis</i> INCQS 00062 .	

Fonte: Portaria 15 de 23 de agosto de 1988- Min. da Saúde

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamentação para o registro de produtos saneantes domissanitários e afins, de uso domiciliar, institucional e profissional. **Resolução nº 336, de 22 de julho de 1999**. In: Diário Oficial da União, seção 1. Brasília, 30 jul. 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Proposta de regulamento técnico para harmonização dos países do MERCOSUL com relação aos produtos saneantes domissanitários com atividade antimicrobiana. **Portaria nº 700, de 08 de maio de 2001**. In: Diário Oficial da União, seção 1. Brasília, 04 jun. 2001.

ALFANO, E.M.; COLE, E.C.; RUTALA, W.A. Quantitative evaluation of bacteria washed from stainless steel penicylinders during AOAC Use Dilution Method. **Journal of the Association Of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 71, n. 5, p. 868-871, 1988.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na Indústria de Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 181p.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O. **Higienização na Indústria de Alimentos**. Viçosa:CPT, 1999. 96p.

ATHAYDE, A. Higienização em indústrias de laticínios colabora no controle total da qualidade. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, n. 18, p. 24-29, mar./abr. 1998. Entrevista.

BELOIAN, A. Disinfectants. In: **AOAC Official Methods of Analysis**. 15th ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists. 1984.

BELOIAN, A. Disinfectants. In: **AOAC Official Methods of Analysis**. 16th ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists. 1995.

BLOCK, S.S. **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 1121p.

COLE, E.C.; RUTALA, W.A.; SAMSA, G.P. Standardization of bacterial numbers on penicylinders used in disinfectant testing: interlaboratory study. **Journal of the Association Of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v.70, n. 4, p. 635-637, 1987a.

COLE, E.C.; RUTALA, W.A.; CARSON, J.L. Evaluation of penicylinders used in disinfectant testing: bacterial attachment and surface texture. **Journal of the Association Of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 70, n. 5, p. 903-906, 1987b.

CREMIEUX, A.; FLEURETTE, J. Methods of testing disinfectants. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1991. p. 1009-1027.

DIVISÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE PRODUTOS SANEANTES DOMISSANITÁRIOS. Normas para o Registro dos Saneantes Domissanitários com Ação Antimicrobiana. **Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988**. In: Diário Oficial da União, seção 1. Brasília, 05 set. 1988.

DIVISÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE PRODUTOS SANEANTES DOMISSANITÁRIOS. Inclusão na Portaria Nº 15/88 DISAD o princípio ativo cloridrato de polihexametileno biguanida para uso em formulações de desinfetantes. **Portaria nº 05, de 13 de novembro de 1989.** In: Diário Oficial da União. Brasília, 14 nov. 1989.

DIVISÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE PRODUTOS SANEANTES DOMISSANITÁRIOS. Inclusão na Portaria Nº 15/88 DISAD o princípio ativo ácido peracético para uso em formulações de desinfetantes. **Portaria nº 122, de 29 de novembro de 1993.** In: Diário Oficial da União. Brasília, 01 dez. 1993.

EIROA, M. N. U. Limpeza e sanificação na indústria de laticínios. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 53, p. 38-57, 1980.

FERRAZ, P. Qualidade exige controle rigoroso de higiene. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, n. 2, p. 12-15, jan./fev. 1996. Entrevista.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7.ed. São Paulo: Nobel, 1985. 284p.

INCQS. **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde , 1999.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G. Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 6, p. 1006-1012, 1998.

LEITÃO, M. F. F. Avaliação da atividade germicida e desempenho de desinfetantes usados na indústria de alimentos. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 1-16, 1984.

LONGMAN, G.F. **Analysis of detergents and detergent products**. London: Wiley Interscience Publishers, 1977.

MERCK-CHEMICALS REAGENTS. Darmstadt, p. 251, 1999-2000.

MYERS, T. Failing the test: Germicides or Use Dilution Methodology? **ASM News**, Ann Arbor, v. 54, n. 1, p. 19-21, 1988.

REYBROUCK, G. A theoretical approach of disinfectant testing. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, Stuttgart, I. Abt. Orig. B 160, p. 342-367, 1975

REYBROUCK, G. Bactericidal activity of 40 potential disinfectants inactivators. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, Stuttgart, I. Abt. Orig. B 167, p. 528-534, 1978.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectants substances. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, Stuttgart, I. Abt. Orig. B 168, p. 480-492, 1979.

ROBINSON, R. A.; BODILY, H. L.; ROBINSON, D. F.; CHRISTENSEN, R. P. A suspension method to determine reuse life of chemical disinfectants during clinical

use. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 158-164, 1988.

ROMÃO, C. M. P. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana em três estágios de dois produtos comerciais utilizados em desinfecção hospitalar no Brasil.** Rio de Janeiro, 1985. 63 p. Tese (Mestre em Ciências Biológicas) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE, G. A. J. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1994. 639 p.

van KLINGEREN, B.; LEUSSINK, A.B.; van WIJNGAARDEN, L.J. A collaborative study on the repeatability and the reproducibility of the Dutch Standard-Suspension-Test for the evaluation of disinfectants. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, Stuttgart, I. Abt. Orig. B 164, p. 521-548, 1977.

VÉRAS, A. L. S. Higienização na indústria de alimentos: estudo do impacto ambiental. **Leite e Derivados**, São Paulo, n. 34, p. 18-34, maio/jun. 1997. Entrevista.