

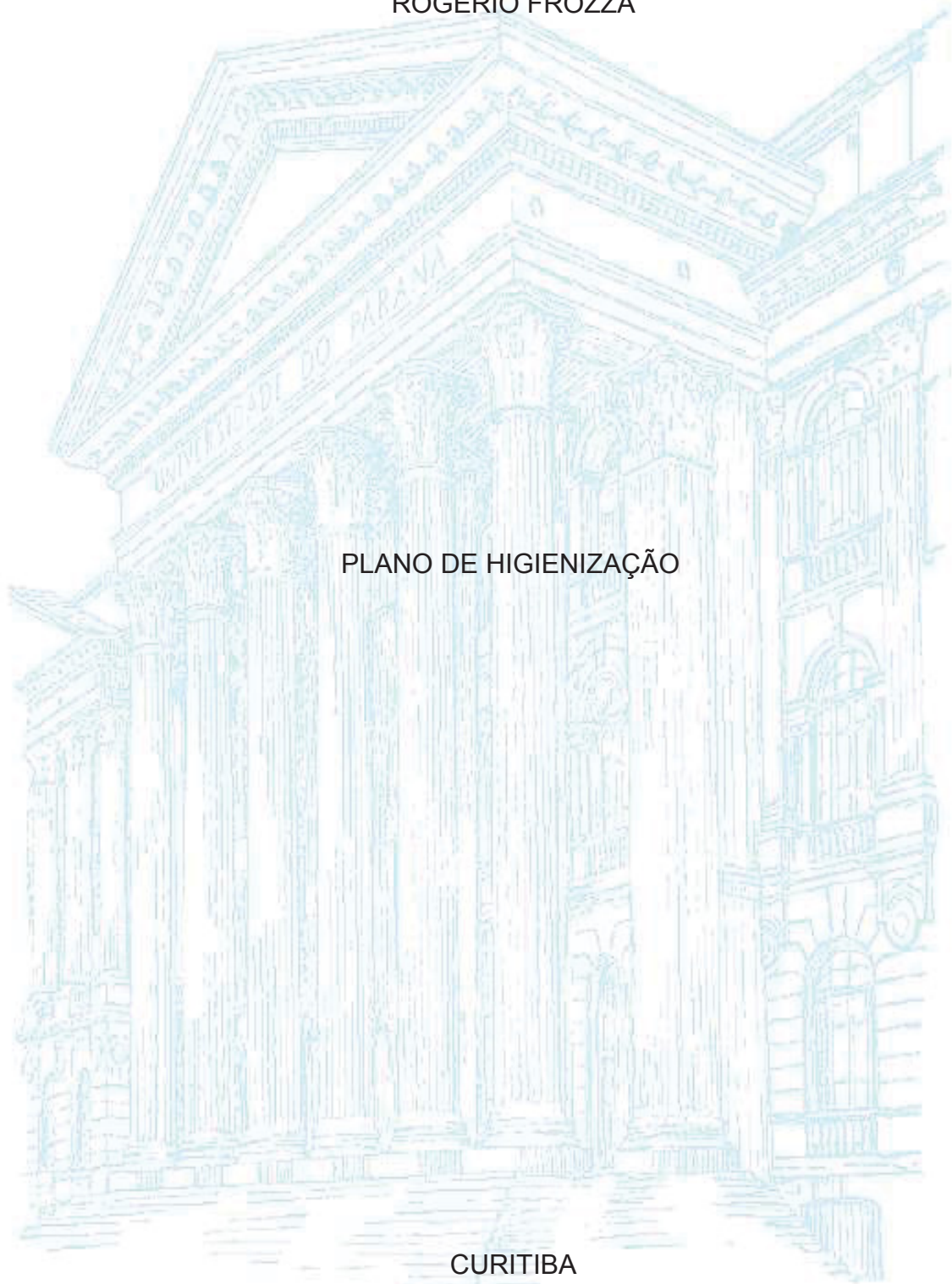
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROGÉRIO FROZZA

PLANO DE HIGIENIZAÇÃO

CURITIBA

2018



ROGÉRIO FROZZA

## PLANO DE HIGIENIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área Biologia Integrada, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Juliana Sperotto Brum

CURITIBA

2018

F943p Frozza, Rogério  
Plano de higienização / Rogério Frozza. - Curitiba, 2018.  
56 f.: il., tabelas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Juliana Sperotto Brum

1. Salmonela - Desinfecção e desinfetantes. 2. Desinfetantes - efeito - avaliação. 3. Higienização veterinária. I. Brum, Juliana Sperotto. II. Título. III. Universidade federal do Paraná.

CDU 636.083



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de ROGÉRIO FROZZA intitulada:

**PLANO DE HIGIENIZAÇÃO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Março de 2018.

JULIANA SPEROTTO BRUM  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

EVERSON ZOTTI  
Avaliador Externo (PUC/PR)

JULIA ARANTES GALVÃO  
Avaliador Interno (UFPR)

*Jader Silva Correia Junior;*  
*In memoriam*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, pelo apoio e compreensão da importância pessoal e profissional de fazer mestrado.

Aos bons amigos que cruzaram meu caminho nesta jornada, em especial o Leopoldo Malcorra de Almeida, companheiro de mate e boas “prosas” que me ajudou do início ao fim da materialização deste sonho.

Ao amigo Marcelo Blumer por ter intercedido por mim a favor da realização do mestrado junto a Sanphar.

Ao amigo e mestre Erverson Zotti pela parceria e conhecimento compartilhado ao longo dos anos em que nos conhecemos.

Ao amigo Ricardo Pereira por aceitar e possibilitar eu dividir minha rotina de trabalho com os estudos.

Aos amigos e amigas do Labmor que me apoiaram e ajudaram desde o início.

A Professora Elizabeth Santim por abrir as portas do Labmor para rodar o experimento. Sem sua ajuda não seria possível concluir o trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Juliana, por aceitar a me orientar no mestrado e por ter me ensinar com paciência e sapiência a cumprir cada etapa durante estes 2 anos de aprendizado. Sem sua ajuda esta jornada não teria fim.

## RESUMO

Uma das formas de manter os rebanhos comerciais livres e ou controlados de agentes causadores de enfermidades potencialmente capazes de causar impacto econômico e ou em saúde pública, é executar rigorosos Planos de Higienização das instalações ao final dos ciclos de produção. Eles podem reduzir a pressão de infecção, conseqüentemente diminuir a ocorrência de surtos de doenças na cadeia produtiva e melhorar os indicadores zootécnicos. Entretanto a adoção do Plano de Higienização correto vai desde as etapas de limpeza que antecedem a desinfecção, até a escolha do desinfetante adequado. Assim neste estudo o objetivo foi determinar a concentração de ativos por meio de prova analítica em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de dois desinfetantes disponíveis no mercado, compostos de glutaraldeído (42,5%) e cloreto de benzalcônio (7,5%) e também a atividade *in vitro* frente a *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium, na presença de 3% de leite em pó desnatado para simular ação da matéria orgânica em 15 minutos de contato. A prova analítica feita por HPLC revelou que num dos desinfetantes estudados as concentrações de ativos diferiam daquelas constantes descritas em rótulo em 33,52% para a associação. Este mesmo desinfetante não inativou as bactérias avaliadas no estudo, na diluição 1:3000. Na segunda etapa do estudo foi avaliada a atividade *in vitro* de um composto de quaternário de amônia a 50% disponível no mercado, frente a *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis na presença de três diferentes simuladores de matéria orgânica - soro fetal bovino, leite desnatado e leite integral - nas concentrações de 1%, 3%, 5% e 7% em pH 6 e 9 nas diluições de 1:000 e 1:2000 em 15 minutos de contato. Os resultados revelarem que a ação do desinfetante foi melhor em pH 6 na diluição 1:1000. O soro fetal bovino não interferiu na ação do desinfetante, enquanto que leite desnatado e integral, comprometeram a ação do desinfetante. E na terceira etapa foi avaliada a atividade *in vitro* de associação de desinfetante composto de glutaraldeído (42,5%) e cloreto de benzalcônio (7,5%) frente a *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium, na presença de 3% de matéria orgânica, representada pelo leite desnatado, em 15 minutos de contato. Em seguida a mesma associação foi avaliada *in vivo* através da redução de mesófilos totais nas diferentes etapas de execução do plano de higienização. O estudo *in vivo* mostrou que o desinfetante não teve atividade em instalações sem limpeza prévia, ou seja, a matéria orgânica inativou a ação do desinfetante. O melhor resultado foi obtido no protocolo de limpeza a seco seguido de lavagem das instalações, antes da desinfecção, ou seja, com melhor nível de limpeza previa. O protocolo onde houve somente limpeza a seco, o resultado foi superior ao protocolo onde não ocorreu a limpeza. Ao comparar os protocolos onde houve limpeza a seco e lavagem, e somente limpeza a seco constatamos que a limpeza a seco seguida de lavagem reduziu 99,92% de mesófilos totais, enquanto que a somente a limpeza a seco reduziu 79,85%.

Palavras chave: Desinfecção. Saúde única. Higienização de instalações.

## ABSTRACT

In order to control or even to keep flocks free of disease-causing agents that can induce economic and sanitary impact, it is required to perform rigorous Hygiene Plans of the facilities at the end of the production cycle. The Hygiene Plans can reduce the rate of infection, thereby reducing dependence on products in the production chain and improving zootechnical indicators. However, an adoption of the Sanitation Plan goes as cleaning steps preceding the disinfection, until the choice of the appropriate disinfectant. In that sense, the objective of this study was to verify the concentration of glutaraldehyde (42.5%) and benzalkonium chloride (7.5%) of two different commercial products using high performance liquid chromatography (HPLC) and evaluate the in vitro activity against *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium, in the presence of 3% skimmed milk powder for a simulated action of the organic matter in 15 minutes of contact. The analytical trial of HPLC of one of the disinfectants tested showed that the concentration was 33.52% for the association of the active compounds. This same disinfectant did not inactivate the bacteria evaluated in the study at the dilution 1:3000. In the second stage of the study the in vitro activity of a commercially available 50% ammonium quaternary compound against *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis was evaluated in the presence of three different organic matter simulators - fetal bovine serum, skimmed milk and milk concentration at 1, 3, 5 and 7% concentrations at pH 6 and 9 at the dilutions of 1:1000 and 1:2000 in 15 minutes of contact. The results showed that the action of the disinfectant was better at pH 6 at the 1:1000 dilution. The fetal bovine serum did not interfere in the action of the disinfectant, whereas skimmed milk and whole milk, compromised the action of the disinfectant. In the third step, the in vitro activity of the combination of disinfectant composed of glutaraldehyde (42.5%) and benzalkonium chloride (7.5%) was evaluated against *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium, in the presence of 3% organic matter, represented by the skimmed milk, in 15 minutes of contact. The same association was then evaluated in vivo by the reduction of total mesophiles in the different stages of the hygiene plan execution. The in vivo study showed that the disinfectant had no activity in the premises without previous cleaning, that is, the organic matter inactivated the action of the disinfectant. The best result was obtained in the protocol of dry cleaning followed by washing of the premises, before disinfection, that is, with a better level of previous cleaning. The protocol where there was only dry cleaning, the result was superior to the protocol where cleaning did not occur. When comparing the protocols where there was dry cleaning and washing, and only dry cleaning, we found that dry cleaning followed by washing reduced 99.92% of total mesophiles, whereas dry cleaning alone reduced 79.85%.

Key words: Disinfection. One health. Hygienization of facilities.



## LISTA DE TABELAS

### **2 CAPITULO 1. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVOS DE DOIS DESINFETANTES A BASE DE GLUTARALDEÍDO E CLORETO DE BENZALCÔNIO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* FRENTE A *SALMONELLA* HEIDELBERG E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM.**

TABELA 1: PORCENTAGENS DO TEOR DE GLUTARALDEÍDO, DE CLORETO DE BENZALCÔNIO E VARIAÇÃO CONTIDAS NO RÓTULO E RESULTADO EM HPLC DE DOIS PRODUTOS COMERCIAIS.  
.....21

TABELA 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DESINFETANTES “A” E “B” FRENTE A *SALMONELLA* HEIDELBERG E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM DIFERENTES DILUIÇÕES, COM 3% DE MATÉRIA ORGÂNICA EM 15 MINUTOS DE CONTATO.....22

### **3 CAPITULO 2. AÇÃO DO CLORETO DE BENZALCÔNIO EM DIFERENTES pH.**

TABELA 1: ATIVIDADE DO DESINFETANTE À BASE DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIA FRENTE A *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM DUAS DIFERENTES DILUIÇÕES, PH6 E PH9 E COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIFERENTES MATÉRIAS ORGÂNICAS, APÓS 15 MINUTOS DE CONTATO  
.....31

TABELA 2: ATIVIDADE DO DESINFETANTE À BASE DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIA FRENTE A *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM DUAS DIFERENTES DILUIÇÕES, PH6 E PH9 E COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIFERENTES MATÉRIAS ORGÂNICAS, APÓS 15 MINUTOS DE CONTATO EM DIFERENTES DILUIÇÕES.....32

TABELA 3: COMPONENTES DO SORO FETAL BOVINO E SUA VARIAÇÃO DE ACORDO COM O CERTIFICADO E ANÁLISE DO FABRICANTE.....34

TABELA 4: COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE.....34

### **4 CAPITULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE PLANOS DE HIGIENIZAÇÃO.**

TABELA 1: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO DESINFETANTE FRENTE A *SALMONELLA* HEIDELBERG E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM DIFERENTES DILUIÇÕES, COM 3% DE MATÉRIA ORGÂNICA EM 15 MINUTOS DE CONTATO.....43

TABELA 2: REDUÇÃO DE MESÓFILOS TOTAIS ANTES E APÓS A EXECUÇÃO DOS PROTOCOLOS DE HIGIENIZAÇÃO.....	44
TABELA 3: REDUÇÃO DE MESÓFILOS TOTAIS ANTES E APÓS OS PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA. ....	45

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

%		Percentual
°C	-	Graus Celsius
µg/kg	-	Micrograma por quilograma
µL	-	Microlitro
µm	-	Micrometro
ANVISA – RE 899/03	-	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução 899 de 2003
AOAC	-	Associação de Comunidades Analíticas
Br	-	Bromo
C12	-	Carbono doze
C16	-	Carbono 16
C18	-	Carbono 18
C8	-	Carbono oito
CEDISA	-	Centro de Diagnósticos de Saúde Animal
Cl <sup>-</sup>	-	Cloro
CQA	-	Composto de quaternário de amônia
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
<i>E.coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
Gr	-	Gramma
HPLC	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IN	-	Instrução Normativa
L	-	Litro
Labmor	-	Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia
LD	-	Leite desnatado
LI	-	Leite integral
MIC	-	Concentração Inibitória Mínima
mL	-	Mililitros
mL/m <sup>2</sup>	-	Mililitro por metro quadrado
MO	-	Matéria orgânica
OIE	-	Organização Mundial de Sanidade Animal
P1	-	Protocolo 1
P2	-	Protocolo 2

P3	-	Protocolo 3
PAβN	-	Fenil Arginina Beta-Naftilamida
PB	-	Programa de biosseguridade
PBS	-	Tampão Fosfato Salina
PCA	-	Ágar padrão para contagem
PH	-	Plano de Higienização
pH	-	Potencial Hidrogeniônico
PH	-	Plano de higienização
SE	-	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SFB	-	Soro fetal bovino
SH	-	<i>Salmonella</i> Heidelberg
SINDAN	-	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SNG	-	Sólidos não gordurosos
SNT	-	Salmonela não tifoide
ST	-	<i>Salmonella</i> Typhimurium
ST	-	Sólidos totais
TSA	-	Ágar Tríplico Soja
UFC	-	Unidade Formadora de Colonia
UFC/mL	-	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
v/v	-	Volume/volume

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2	CAPITULO 1. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVOS DE DOIS DESINFETANTES A BASE DE GLUTARALDEÍDO E CLORETO DE BENZALCÔNIO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO FRENTE A <i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG E <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM.....	15
	INTRODUÇÃO.....	16
	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25
3	CAPITULO 2. AÇÃO DO CLORETO DE BENZALCÔNIO EM DIFERENTES pH .....	28
	INTRODUÇÃO.....	29
	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
	RESULTADOS.....	31
	DISCUSSÃO.....	33
	CONCLUSÃO.....	35
4	CAPITULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE PLANOS DE HIGIENIZAÇÃO.....	38
	INTRODUÇÃO.....	39
	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
	CONCLUSÃO.....	45
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	52

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Na abordagem de Saúde Única, a saúde humana e animal são reciprocamente dependentes entre si e vinculada a saúde do ecossistema em que habitam(OIE, 2018; SLEEMAN; DELIBERTO; NGUYEN, 2017; XIE et al., 2017). E embora essa abordagem tenha ganhado destaque no início dos anos 2000, o conceito surgiu por volta do século XIX, (OIE, 2018; XIE et al., 2017).

O surgimento de doenças infecciosas emergentes ou reemergentes demonstram claramente a relação entre agentes patogênicos, hospedeiro e ambiente que representam muitas vezes um risco à saúde pública (MORENS; FAUCI, 2013; SLEEMAN; DELIBERTO; NGUYEN, 2017). A exemplo, as salmonelas têm uma variedade de reservatórios animais e várias rotas de transmissão e ainda, considerando condições ambientais e estado sanitário dos animais, podem sobreviver mais de seis anos, podendo resultar em infecção em humanos (GONZALEZ et al., 2015; PIRES et al., 2014).

Anualmente, são registrados 80,3 milhões de casos de salmonela não tifoide (SNT) transmitidos por alimento e destes, cerca de 155.000 pessoas vão a óbito. Em alguns casos os indivíduos acometidos podem desenvolver sequelas crônicas como artrite reativa e síndrome do intestino irritável (KEITHLIN et al., 2015; MAJOWICZ et al., 2010).

Desta forma, controlar patógenos zoonóticos na sua origem é mais eficaz e economicamente viável (OIE, 2018). Assim, a adoção de plano de higienização das instalações adequado, ao final de cada ciclo produtivo, é possível reduzir a pressão de infecção, prevenir a introdução e persistência de zoonoses e de doenças endêmicas, além de ser indispensável para a manutenção da alta produtividade (BURBARELLI, FERNANDA et al., 2017; WHITE et al., 2017; JANG et al., 2017; LUYCKX et al., 2016, 2015; SESTI; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 1998).

Com isso o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de ativos em desinfetantes comerciais disponíveis no mercado, bem como sua atividade *in vitro* frente a bactérias de interesse em saúde pública, e posteriormente sua atividade *in vivo* avaliada pela redução na contagem de micro-organismos utilizando diferentes protocolos de higienização das instalações.

## 2 CAPITULO 1. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVOS DE DOIS DESINFETANTES A BASE DE GLUTARALDEÍDO E CLORETO DE BENZALCÔNIO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO FRENTE A *SALMONELLA* HEIDELBERG E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM.

### RESUMO

Estima-se que mundialmente as gastroenterites causadas por salmonela são responsáveis por cerca de 155.000 óbitos ao ano. Biossegurança, limpeza e desinfecção das instalações de aves e suínos são fundamentais para a redução de micro-organismos patogênicos de importância para saúde pública e animal. Com base nesta informação, o objetivo deste trabalho foi confrontar o teor de ativos registrado em rótulo com o teor quantificado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de duas associações comerciais utilizadas em grande escala pelo setor de produção de aves e suínos do Brasil. Em seguida avaliou a atividade antimicrobiana dos desinfetantes de acordo com a Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants (AOAC Official Method 960.09) em quatro diluições distintas com presença de 3% de matéria orgânica durante 15 minutos de contato, frente a *Salmonella* Heidelberg e a *Salmonella* Typhimurium. Os resultados encontrados para o produto "A" estavam de acordo com o teor declarado em rótulo. Para o produto "B", os teores de ativos quantificados foram menores que o registrado em rótulo. Da mesma forma, o desinfetante "A" foi eficaz na avaliação microbiológica proposta no ensaio enquanto o desinfetante "B" teve atividade microbicida comprometida pelo déficit de ativos, o que pode comprometer o resultado da desinfecção e ainda expor micro-organismos a doses subletais.

**Palavras-chave:** Desinfetantes. Teor de ativos. Eficácia. Resistência cruzada.

### ABSTRACT

It is estimated that as gastroenteritis caused by salmonella are responsible for about 155,000 deaths a year. Biosecurity, cleaning and disinfection of swine and poultry facilities are fundamental for the reduction of pathogenic microorganisms of importance for public and animal health. Based on this information, the objective of this study was to compare the concentration of active compound in the label with the quantified content by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of the two large industries in which it is found on a large scale in the poultry and swine production sector from Brazil. An antimicrobial activity of the disinfectants according to a Disinfectant Action Germicide and Disinfectant of Disinfectants (Official Method AOAC 960.09) was then evaluated in four dilutions with the presence of 3% of organic matter during 15 minutes of contact, against *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium. The results found for product "A" were classified according to the declared on the label. in

the microbiological evaluation proposed the assay while the disinfectant "B" had a microbicide compromised by the deficit of assets, which can compromise the result of the disinfection and still expose microorganisms to sublethal doses.

**Keywords:** Disinfectants. Active concentration. Efficacy. Cross-resistance

## INTRODUÇÃO

A infecção por salmonela na produção de aves e suínos pode resultar da transmissão vertical, a partir das reprodutoras, ou da transmissão horizontal. Levando em consideração as condições ambientais e o estado sanitário do lote, a bactéria pode sobreviver por mais de seis anos no ambiente (GONZALEZ et al., 2015).

De acordo com Da Silva et al. (2012) em estudo conduzido em três abatedouros de suínos no Brasil, a soroprevalência de salmonela nos animais enviados para abate chegou a média de 80,6%. Entretanto, ao avaliar o conteúdo fecal a positividade foi de 23,8% das amostras. Complementando, Cardoso & Da Silva (2015) mostram que a exposição prévia dos lotes ao agente é alta, entretanto a excreção da bactéria é menor.

Já quando nos referimos a produtos finais do sistema de produção de frangos, em avaliação de três diferentes marcas comerciais resfriadas, coletados de fevereiro a novembro de 2004 na região Noroeste do Rio Grande do Sul, o percentual de isolamento de salmonela foi de 12,2% em média para as três marcas. Os sorovares da bactéria encontrados nas amostras foram: *S. Enteritidis* (31,8%), *S. Agona* (31,8%), *S. Rissen* (22,7%), *S. Heidelberg* (9,0%) e *S. Livingsgtone* (4,5%) (PINHEIRO, 2010).

Segundo Sesti (2005) a única maneira de manter os rebanhos comerciais livres e controlados de agentes causadores de enfermidades de impacto econômico e ou em saúde pública é a utilização de programas de biossegurança direcionados a cada sistema de produção. Além de possibilitar a diminuição de surtos de doenças na cadeia produtiva, gera benefícios ao bem-estar animal, uma maior produtividade e a valorização do produto final (LUYCKX et al., 2015).

Na Medicina Veterinária moderna, biossegurança pode ser definida como todos os procedimentos implementados para reduzir o risco e consequência da ocor-



rência de algum agente causador de enfermidades e deve abranger três níveis hierárquicos: a) conceitual; b) estrutural; e c) operacional (COLLETT, 2016). O terceiro nível hierárquico compreende procedimentos operacionais de rotina e inclui dentre eles a execução periódica de planos de higienização (GEHAN et al., 2009; SESTI, 2005).

Em geral, um plano de higienização (PH) deve incluir procedimentos seguros, de fácil execução, descrever a forma correta de aplicação de detergentes e desinfetantes, uso adequado de equipamentos de aplicação e um sistema de monitoramento eficiente (GEHAN et al., 2009).

Os desinfetantes constituem uma ampla variedade de produtos químicos, princípios ativos, especialmente elaborados para prevenir, inativar, destruir ou inibir o crescimento de micro-organismos (DI FABIO & MARTINS, 2013). Portanto, eleger um desinfetante eficaz, é fundamental para controle de doenças (SCUR et al., 2014).

Segundo Wickstrom (2015), o desinfetante ideal deve ter amplo espectro, não ser corrosivo, tóxico ou irritante, funcional em qualquer ambiente, atender as exigências ambientais (biodegradável) e, preferencialmente, ter poder tensoativo e custo acessível. Contudo, vale mencionar que não há um desinfetante ideal para todas as situações e estudos mostram variações na eficiência de formulações comerciais utilizadas em instalações (COLDEBELLA et al., 2004; GEHAN et al., 2009).

Outro alerta preocupante é sobre o crescente uso de produtos veterinários falsificados, cada vez mais acessíveis ao produtor e com preços atrativos, que podem custar até 50% a menos que produtos genuínos (CORREIO DO POVO, 2015). Segundo Salomão (2014), o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindan) calcula que 15% dos produtos do segmento de saúde animal são fraudados e estima-se que a bovinocultura de corte é o setor mais atingido.

Assim o presente trabalho tem por objetivos quantificar o teor de ativos de dois desinfetantes e avaliar a suas atividades antimicrobianas em diferentes diluições frente à *salmonella* Heidelberg e à *Salmonella* Typhimurium.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi avaliado e quantificado a concentração de ativos de dois desinfetantes comerciais, A e B, em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Ambos desinfetantes testados eram associações de princípios ativos a base de glutaraldeído a 42,5% e cloreto de benzalcônio

a 7,5 e os valores encontrados foram expressos em percentual. A técnica usada para encontrar os valores para cada ativo foi adaptada da Resolução - RE 899/03, validada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Na segunda etapa foi avaliada a ação dos mesmos desinfetantes A e B frente a *Salmonella* Heidelberg (SH) e *Salmonella* Typhimurium (ST) na presença de 3% de leite em pó desnatado para simular ação da matéria orgânica, em 15 minutos de contato, de acordo com a Portaria 101 (BRASIL, 1993). Ambos são constituídos de 42,5% de glutaraldeído e 7,5% de cloreto de benzalcônio.

## **PRIMEIRA ETAPA**

### **a) Determinação do teor de cloreto de benzalcônio:**

Preparo da solução tampão: Foram dissolvidos 90mg de hidróxido de sódio em 100mL de água ultrapura. Em seguida o pH foi ajustado para 7,0 com ácido perclórico 70% e adicionado água ultrapura até atingir o volume de 1000mL de solução.

Preparo da solução padrão de cloreto de benzalcônio: Foram adicionados 40mg do cloreto de benzalcônio em balão volumétrico de 25mL, em seguida adicionado metanol (v/v), homogeneizado e levado ao ultrassom por 10 minutos. Então foi transferido 1mL da solução padrão para balão volumétrico de 10mL e o volume restante completado com metanol. Em seguida retirou-se e filtrou-se 1,5mL da solução com filtro de seringa (0,45 $\mu$ m), acondicionando-se em um vial, devidamente identificado.

Preparo da amostra de solução comercial a ser analisada: Foram adicionados 500 mg do desinfetante comercial em balão volumétrico de 25mL, logo após foi adicionado metanol (v/v), homogeneizado e levado ao ultrassom por 10 minutos. Em seguida pipetado 1mL desta solução de desinfetante para um balão volumétrico de 10mL e completado com metanol. Retirou-se e filtrou-se 1,5mL da solução com filtro de seringa (0,45 $\mu$ m), acondicionando-se em um vial, devidamente identificado.

Procedimento: Foi injetado no HPLC a solução padrão para fazer a verificação do sistema (System Suitability). Então foi injetada a amostra comercial para análise. Os cromatogramas gerados foram calculados seguindo a fórmula abaixo:

**Teor de cloreto de benzalcônio em %=**

Resposta da amostra x peso padrão (mg) x teor do padrão

-----

Resposta do padrão x peso da amostra (mg)

**Determinação do teor de glutaraldeído**

Preparo solução derivante: Foram adicionados 375mg de 2,4 di-nitrophenylhidrazina em balão volumétrico de 250mL, solubilizado com de ácido fosfórico 85%, em seguida o volume completado com acetonitrila.

Preparo da solução tampão: Foi dissolvido 0,68gr de fosfato de potássio monobásico, em 600mL de água ultrapura, o pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico 85% e adicionado água ultrapura para completar 1000mL.

Preparo da solução padrão de glutaraldeído: Em balão volumétrico de 25mL foram adicionados 50mg de glutaraldeído padrão, em seguida adicionada água purificada (v/v) para completar o volume, homogeneizado e levado ao ultrassom por 5 minutos. Posteriormente, 0,1mL desta solução padrão foi transferida para um balão volumétrico de 25mL e completado com água purificada.

Derivatização: O volume de 1mL da solução padrão diluída foi pipetada para o balão volumétrico de 5mL, em seguida foi completado com solução derivatizante, solubilizado e deixado em repouso por 10 minutos para ocorrer a reação. Após, 1,5mL foram filtrados com filtro de seringa (0,45 µm) e colocado em um vial, devidamente identificado.

Preparo da amostra de solução comercial a ser analisada: 250 mg de glutaraldeído (comercial) foram colocados em balão volumétrico de 100mL e o volume completado com água purificada (v/v), homogeneizado e levado ao ultrassom por 5 minutos. Em seguida, 0,1mL desta solução comercial foi pipetado para um balão volumétrico de 25 mL e completado com água purificada.

Derivatização: Pipetado 1mL da solução comercial diluída para o balão volumétrico de 5mL, e o volume completado com solução derivatizante, solubilizado e deixado em repouso por 10 minutos para ocorrer a reação. Em seguida foi retirado e

filtrado 1,5mL utilizando filtro de seringa (0,45 $\mu$ m) e acondicionado em um vial, devidamente identificado.

Procedimento: A solução padrão foi injetada no HPLC para fazer a verificação do sistema (System Suitability). Após, injetou-se a amostra comercial para análise, e os cromatogramas gerados foram calculados seguindo a mesma fórmula descrita anteriormente.

## **SEGUNDA ETAPA**

### **Avaliação da ação dos desinfetantes:**

#### **Micro-organismos:**

As bactérias utilizadas para o ensaio foram isoladas de campo, provenientes da bacterioteca do Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA), Concórdia, Santa Catarina, sendo:

- a) SH isolado de suabe de arrasto de aviário no ano de 2016;
- b) ST isolado de caso clínico de diarreia em leitões de 72 dias no ano de 2014.

Preparo do inoculo: As cepas foram semeadas em ágar nutriente e incubadas a 37°C em condições de aerobiose, durante 18 a 24 horas. Em seguida as culturas foram diluídas em solução salina e o inoculo foi padronizado para SH e ST, obtendo-se 6,3 x 10<sup>9</sup> e 1,1 x 10<sup>10</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, respectivamente.

Protocolo do teste: A metodologia utilizada foi adaptada do método de suspensão da AOAC 960.09 (PRINCIPLE, 1998). Após padronização do inoculo, 1mL da suspensão bacteriana foi colocado em tubos, posteriormente adicionado 1mL de tampão fosfato salina (PBS) a pH 7,4 e foi acrescentado 1mL de leite desnatado 30% para simular a ação da matéria orgânica. Em seguida adicionou-se 8mL do desinfetante nas diluições de 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:3000 durante 15 minutos. Posteriormente, transferiu-se 1mL do desinfetante contendo a suspensão do micro-organismo para um tubo contendo 9mL de solução neutralizante (caldo nutriente + 0,5% de tween 80 + 5% de soro de coelho). Então foi transferido 1mL da solução para 9mL de PBS a pH 7,4, repetindo-se esse procedimento mais uma vez. Das duas últimas diluições foram semeados 100 $\mu$ L para ágar trípico de soja (TSA) e incubados a 37°C por 24 horas.

A eficácia do desinfetante foi expressa em número de redução logarítmica de

quatro e cinco ciclos logarítmicos das UFC entre a população inicial e a população sobrevivente. Foram apresentados os resultados considerando-se eficiente quando o desinfetante eliminou 99,999% (5 logs), ou seja, quando não houve crescimento de colônias nas placas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados obtidos no HPLC dos teores de ativos dos desinfetantes em questão, foi constatado que “produto A” apresentou pequena variação do teor de ativos, mas estava de acordo com o descrito em rótulo, enquanto que o “produto B” apresentou divergência entre os teores quantificados no HPLC e os descritos em rótulo, conforme resultados descritos na tabela 1.

TABELA 1: PORCENTAGENS DO TEOR DE GLUTARALDEÍDO, DE CLORETO DE BENZALCÔNIO, VARIAÇÃO CONTIDAS NO RÓTULO E RESULTADO EM HPLC DE DOIS PRODUTOS COMERCIAIS.

Produto	Teor de Glutaraldeído			Teor de Cloreto de Benzalcônio		
	Rótulo	HPLC	Variação	Rótulo	HPLC	Variação
A	42,50%	45,70%	+ 3,20%	7,50%	7,20%	-0,3%
B	42,50%	30,44%	- 12,06%	7,50%	2,80%	- 4,70%

+ = Valor acima da especificação

- = Valor abaixo da especificação

Não existe legislação específica para desinfetantes e os valores aceitos para variação de ativos estão referenciados no Regulamento Técnico para Testes de Estabilidade de Produto Farmacêutico de uso Veterinário, da Instrução Normativa (IN) 15 (BRASIL, 2005). Segundo a IN 15 a variação de ativos pode chegar até  $\pm 5\%$ . Desta forma o “produto A” está de acordo com o declarado em rótulo para os dois princípios ativos. A concentração de ativos do “produto B” foi de 33,52% a menos dos valores indicados em rótulo, descumprindo a determinação da IN 15, caracterizando erro de dosagem na fabricação, e/ou baixa estabilidade da formulação e/ou fraude

Na segunda etapa do estudo, o desinfetante “A” foi eficiente em todas as diluições propostas no ensaio com 3% de matéria orgânica para SH e ST. O desinfetante “B” mostrou-se ineficiente na diluição 1/3000 com 3% de matéria orgânica para as bactérias em questão. Os resultados da segunda etapa estão descritos na tabela 2.

TABELA 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DESINFETANTES “A” E “B” FRENTE A SH E ST EM DIFERENTES DILUIÇÕES, COM 3% DE MATÉRIA ORGÂNICA EM 15 MINUTOS DE CONTATO.

Diluição	Redução logarítmica (log)	SH		ST	
		Produto A	Produto B	Produto A	Produto B
<b>1:500</b>	4 log	S	S	S	S
	5 log	S	S	S	S
<b>1:1000</b>	4 log	S	S	S	S
	5 log	S	S	S	S
<b>1:2000</b>	4 log	S	S	S	S
	5 log	S	S	S	S
<b>1:3000</b>	4 log	S	R	S	R
	5 log	S	R	S	R

S – Sensível: inóculo que apresentou redução logarítmica de 4 log (redução de 99,99%) ou log (redução de 99,999%) frente ao desinfetante e condições testadas;

R – Resistente: inóculo que não apresentou redução logarítmica de 4 log (redução de 99,99%) ou 5 logs (redução de 99,999%) frente ao desinfetante e condições testadas.

A grande preocupação mundial em relação as salmonelas é a capacidade de causar toxi-infecção alimentar em humanos. Majowicz et al. (2010) estimam que 93,8 milhões de ocorrências de gastroenterites registradas no mundo são causadas por salmonela e levam cerca de 155.000 óbitos anualmente. Afirmam ainda que do total, 80,3 milhões de casos foram transmitidos por alimentos.

Limpeza e desinfecção das instalações são fundamentais para reduzir o risco de introdução e permanência de doenças animais e zoonoses (LUYCKX et al., 2015a). Ao selecionar um desinfetante para execução de um protocolo de limpeza e desinfecção devemos considerar as características específicas do princípio ativo, dos micro-organismos alvo e questões ambientais, além da saúde dos operadores (DROVAK et al., 2008).

Os fatores que afetam a ação dos desinfetantes, inerentes a química dos produtos, condições de aplicação a campo e aos micro-organismos são bem descritos (DAVIES, 2003; DROVAK et al., 2008; GREZZI, 2008; LUYCKX et al., 2015b; MAILLARD, 2013; RUTALA; WEBER, 2008). Alguns testes laboratoriais simulam possíveis condições de uso frente a micro-organismos específicos, substâncias que interferem

na ação e tempo de contato para ação (STANIFORTH, 2013).

Maillard (2013) afirma que a matéria orgânica compromete a ação dos desinfetantes de três maneiras: (I) redução da concentração disponível do desinfetante; (II) proteção aos micro-organismos contra danos externos; (III) formação de agregados microbianos envoltos por camada de exopolissacarídeos. Entretanto vale ressaltar que o déficit de princípios ativos do produto “B” pode ter comprometido o resultado.

Em contraste aos antimicrobianos que atuam em sítios específicos, os desinfetantes, de modo geral atuam sobre a estrutura e função de várias macromoléculas estruturais, tais como carboidratos, lipídeos, ácidos nucléicos e vários componentes essenciais que em combinação formam paredes celulares de bactérias, membranas e envelopes virais (MCDONNELL, 2007; NHUNG et al., 2015).

Há evidências crescentes de que a exposição a alguns desinfetantes pode induzir a resistência cruzada com agentes antimicrobianos. Isso ocorre principalmente em situações de erros diluição, em doses subletais, degradação química da molécula ou reação com outros compostos orgânicos ou inorgânicos. O principal mecanismo responsável pela resistência cruzada é mediado por bombas de efluxo encontrados em bactérias Gram-negativas (DE SILVA et al., 2015; MAILLARD, 2013; NHUNG et al., 2015).

De acordo com Nhung et al. (2015), 12 cepas de enterobactérias, seis *E. coli* e seis SNT, analisadas antes e depois da exposição *in vitro* a um desinfetante comercial a base de glutaraldeído e cloreto de benzalcônio, revelaram aumento na concentração inibitória mínima (MIC) variando de 0 a 100% (mediana de 31%). Os MICs para alguns antimicrobianos testados antes e depois da exposição ao desinfetante também aumentaram. As maiores alterações foram para a tetraciclina com variação média de 776%, seguido de ciprofloxacina com 316% e cloranfenicol com 106%, o que suporta a teoria de resistência cruzada. Ainda no mesmo trabalho, as cepas foram tratadas com inibidor genérico de bomba de efluxo, fenil-arginina beta-naftilamida (PAβN) após a adaptação e resultou em redução média de 18% do MIC para o desinfetante. Para os antimicrobianos o tratamento com PAβN não resultou em alterações significativas com exceção do cloranfenicol, com redução média de MIC de 24%, concluído que apenas uma pequena fração da resistência pode ser por bomba de efluxo genérica.

## CONCLUSÃO

Através da análise em HPLC foi possível constatar que o desinfetante “B” estava com teor de ativos inferior ao descrito em rótulo e esta diferença pode caracterizar erro de fabricação, baixa instabilidade da formulação e/ou fraude. Este déficit de princípio ativo comprometeu a atividade antimicrobiana frente as bactérias estudadas, conforme apresentado na tabela 2, e pode resultar em desinfecção ineficiente e ainda induzir a resistência bacteriana por expor as mesmas subdoses.



## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Dezembro de 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresentação-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE\\_899\\_2003\\_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b)> Acesso em: 27 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 15**, de 09 de maio de 2005. Regulamento Técnico para Testes de Estabilidade de Produto Farmacêutico de uso Veterinário. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 maio. 2005, Seção I, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 101**, de 17 de agosto de 1993. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 17 ago. 1993, Seção I, p. 11937-45.

CARDOSO, M. R. de I.; DA SILVA. L. E. Controle de Salmonela em matadou-ros frigoríficos de suínos. In: KICH, J. D.; SOUZA. J. C. V. B. **Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle**. 1.ed. Brasília: DF. Embrapa, 2015, Cap.4, p. 117-154.

COLLETT, S. R. Overview of Biosecurity. In: **The Merck Manual Veterinary**. Disponível em: <<http://www.msdsvetmanual.com/en-in/management-and-nutrition/biosecurity/overview-of-biosecurity>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–22, 2003.

DA SILVA, L. E. et al. Longitudinal Dissemination of Salmonella enterica Clonal Groups through the Slaughter Process of Salmonella-Positive Pig Batches. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1580–1588, 2012.

DE SILVA, M. et al. Evidence that a novel quaternary compound and its organic N-chloramine derivative do not select for resistant mutants of Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Hospital Infection**, v. 91, n. 1, p. 53–58, 2015.

DI FABIO, J.; MARTINS, P.C.; Biosseguridade no incubatório. In: MACARI, M. et al., **Manejo da incubação**. 3º ed. Jaboticabal. 2013, Cap.3.8, p. 411-458.

DVORAK, G.; ROTH, J.; AMASS, S. **Disinfection 101**. Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, Ames, IA, 2008.

GEHAN, Z. M. et al. In vitro Efficacy Comparison of Disinfectants Used in the Commercial Poultry Farms. **International journal of Poultry Science**, v. 8, n. 3, p. 237–241, 2009.

GREZZI, G. Limpeza e desinfecção na avicultura. Ergomix. **Artigo Técnico**. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/avicultura/artigos/limpeza-desinfeccao-avicultura-t36727.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

GONZALEZ, M. et al. Sources for Salmonella Contamination During Pig Production in Eastern Spain. v. 2, n. 5, p. 37–42, 2015.

JAENICH, F. R. F.; COLDEBELLA, A.; MACHADO, H. G. P.; et al. Importância da Higienização na Produção Avícola. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. **Comunicado Técnico 363**. p. 1–5, 2004.

JUNIOR, D. Pirataria on-line desafia autoridades com comércio de medicamentos veterinários. In: **Jornal Correio do Povo**. Disponível em : <<http://www.correiodopovo.com.br/Noticias/554332/Pirataria-online-desafia-autoridades-com-comercio-de-medicamentos-veterinarios>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

LUYCKX, K. et al. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. **Poultry Science**, v. 94, p. 740–749, 2015a.

LUYCKX, K. Y. et al. On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses. **Poultry science**, v. 94, p. 1986–1993, 2015b.

MAILLARD, J. Y. Factores Affecting the Activities Microbicides. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.3, p. 71-86.

MCDONNELL, G. Biocides: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. In: GURUSAMY, M. **Disinfection and decontamination: Principles, applications and related issues**. 1. ed. NewYork: Crc, 2007, Cap.6, p. 88-120.

MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882–889, 2010.

MORÉS, N; AMARAL, A. L; KICH, J. D. Controle de Salmonela granjas de suínos. In: KICH, J. D.; SOUZA. J. C. V. B. **Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle**. 1.ed. Brasília: DF. Embrapa, 2015, Cap.4, p. 117-154.

NHUNG, N. T. et al. Induction of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli and Non-Typhoidal Salmonella Strains after Adaptation to Disinfectant Commonly Used on Farms in Vietnam. **Antibiotics**, v. 4, n. 4, p. 480–494, 2015.

PINHEIRO, V. Número mais provável de Salmonella isoladas de carcaças de frango resfriadas Most probable number of Salmonella isolated from refrigerated broiler carcasses. p. 2338–2342, 2010.

PRINCIPLE, A. Copyright 1998 AOAC INTERNATIONAL Copyright 1998 AOAC INTERNATIONAL. Control, v. 1991, n. c, p. 4–5, 1998.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Draft guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities U.S. **Centre for Disease Control and Protection (CDC)**. [s.l: s.n.].

SALOMÃO, R. Sindan lança campanha contra pirataria de medicamentos veterinários. In: **Revista Globo Rural**. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/noticia/2014/09/sindan-lanca-campanha-contra-pirataria-de-medicamentos-veterinarios.html>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

SESTI, L. A. C. Biosseguridade em granajs de reprodutoras. In: MACARI, M.; MENDES, A. A. **Manejo de Matrizes de Corte**. 2.ed. Campinas: Facta, 2005, Cap.12, p. 244-321.

SCUR, M. C. et al. Atividade in vitro de desinfetantes comerciais no controle de duas espécies de bactérias de interesse avícola. **Boletim de Indústria Animal**, v. 71, n. 2, p. 147–153, 2014.

STANIFORTH, L. Evaluation of Antimicrobial Efficacy. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. lo-wa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.12, p. 236-243.

WICKSTROM, M. L. Overview of Antiseptics and Disinfectants In: **The Merck Manual Veterinary**. Disponível em: <[http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antiseptics\\_and\\_disinfectants/overview\\_of\\_antiseptics\\_and\\_disinfectants.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antiseptics_and_disinfectants/overview_of_antiseptics_and_disinfectants.html)>. Acesso em: 10 ago. 2017.

### 3 CAPITULO 2. AÇÃO DO CLORETO DE BENZALCÔNIO EM DIFERENTES pH

#### RESUMO

Os compostos de quaternário de amônia são amplamente utilizados na avicultura e suinocultura como desinfetantes e são fundamentais para o controle de patógenos. Eles atuam sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e vírus envelopados. Entretanto em algumas condições de pH e presença de matéria orgânica podem ser inativados. Neste estudo foi avaliado a ação dos compostos de quaternário de amônia nas diluições de 1:1000 e 1:2000, frente a *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis na presença de três diferentes simuladores de matéria orgânica, soro fetal bovino, leite desnatado e leite integral na concentração de 1%, 3%, 5% e 7%, e, em pH 6 e 9, com 15 minutos de contato. Foi possível verificar que os simuladores de matéria orgânica ajustados nas mesmas condições de tempo de contato e percentual, nas provas *in vitro*, apresentaram resultados diferentes e o soro fetal bovino não inativou o desinfetante. Contudo o melhor resultado frente a *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis foi obtido em pH 6 nas diluições de 1:1000 em todos os simuladores de matéria orgânica.

**Palavras-chave:** Quaternário de amônia. Matéria orgânica. Salmonela

#### ABSTRACT

Ammonium quaternary compounds are widely used in poultry and swine production as disinfectants in the control of pathogens. They act on Gram positive bacteria, Gram negative bacteria, enveloped fungi and viruses. However, in some conditions of pH and presence of organic matter can be inactivated. This study evaluated the action of ammonium quaternary compounds at 1:1000 and 1:2000 dilutions against *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in the presence of three different organic matter simulators, fetal bovine serum, skimmed milk and whole milk concentration of 1%, 3%, 5% and 7%, and at pH 6 and 9, with 15 minutes of contact. It was possible to verify that the organic matter simulators adjusted in the same conditions of contact time and percentage, in the *in vitro* tests, presented different results and the fetal bovine serum did not inactivate the disinfectant. However, the best result against *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis was obtained at pH 6 at the dilution of 1:1000 in all organic matter simulators.

**Key words:** Quaternary ammonia. Organic matter. Salmonela

## INTRODUÇÃO

Compostos de quaternário de amônia (CQA) são os principais tensoativos catiônicos, amplamente utilizados em ambientes domésticos, industriais, agrícolas e clínicos como desinfetantes e detergentes desde o final da década de 1930 (TEZEL; PAVLOSTATHIS, 2011; ZHANG et al., 2015). São importantes para saúde animal em diferentes sistemas de criação e manejo, como granjas, galpões e incubatórios, pois desempenham papel fundamental no controle da propagação de patógenos (GERBA, 2015; PAULINO, 2002).

Os CQA são compostos orgânicos com duas regiões definidas na estrutura molecular, sendo uma região com quatro grupos funcionais ligados a um átomo de nitrogênio central, denominada região catiônica (carregada positivamente) e outra região denominada aniônica (carregada negativamente) onde geralmente o cloro (Cl-) ou bromo (Br-) liga-se ao nitrogênio (AL-ADHAM et al. 2013; GERBA, 2015; MCDONNELL, 2007).

Para que um CQA tenha atividade antimicrobiana alta, pelo menos um dos grupos radicais (R) deve ter cadeia entre C8 a C18, sendo C12 a C16 os grupos metila com maior atividade antimicrobiana (AL-ADHAM et al., 2013; GERBA, 2015; GORMAN; SCOTT, 2004; MARIS, 1995). A grande variedade de estruturas químicas dos CQA permitiu a evolução para melhor atividade antimicrobiana e redução da toxicidade com o surgimento de novas gerações (AL-ADHAM et al., 2013; GERBA, 2015).

Atuam sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas, fungos e vírus envelopados (CFSPH, 2008; KUANA, 2009; PAULINO, 2002; RUTALA; WEBER, 2008). De acordo com Gerba (2015), os CQA são capazes interagir com alvos intracelulares e ligar-se ao DNA e ainda, algumas formulações são capazes de inativar vírus não envelopados. Seu pH ótimo de atuação é neutro a ligeiramente alcalino (AL-ADHAM et al., 2013; GREZZI, 2008; GORMAN; SCOTT, 2004; MORGULIS; SPINOSA, 2005; PAULINO, 2002; SESTI, 2005).

Levando em consideração as informações citadas, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade microbicida de um desinfetante à base de cloreto de benzalcônio em duas diluições frente a *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Enteritidis (SE), nos pH6 e 9 diante de diferentes porcentagens e tipos de matéria orgânica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O cloreto de benzalcônio foi testado na dosagem de 1:1000 e 1:2000 com variações na concentração de matéria orgânica (MO) de 1%, 3%, 5%, e 7%, para leite integral (LI), leite desnatado (LD) e soro fetal bovino (SFB) em pH de solução de 6 e 9, frente a *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Enteritidis (SE), ambas isolados de campo, armazenadas na bacterioteca do Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA), Concórdia, Santa Catarina, seguindo adaptação da metodologia DIN EN 1276 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E. V., 2009).

As cepas foram semeadas no Labmor em ágar nutriente em condições de aerobiose e incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas. Em seguida as culturas foram diluídas em solução salina e o inóculo foi padronizado para conter 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Os simuladores de matéria LI e LD foram preparados em solução ajustadas para conter 10%, 30%, 50% e 70%, em seguida padronizados para conter em 1mL.

Após a padronização, 1mL do inóculo foi adicionado a tubo de ensaio, seguido da adição de 1mL de MO, também ajustado, nas concentrações de 1%, 3%, 5%, e 7% para LI e LD. Posteriormente foram adicionados aos tubos 8mL de solução desinfetante nas diluições de 1:1000 e 1:2000.

Para o SFB foram adicionados 1 mL de inóculo devidamente padronizado em tubo de ensaio, em seguida adicionado 1 mL de SFB nas concentrações de 1%, 3%, 5% e 7% e em seguida adicionados aos tubos 8mL de solução desinfetante nas diluições de 1:1000 e 1:2000.

Os tubos foram homogeneizados e mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida uma alíquota de 1mL da solução foi transferida para tubo contendo 8mL de caldo nutriente com 0,5% de tween 80 e lecitina 0,07% (caldo Letheen), posteriormente adicionado 1mL de água destilada, devidamente homogeneizados e descansados por 5 minutos.

Na sequência 1mL da solução foi adicionado em tubo contendo 9mL de tampão fosfato salina (PBS) a pH 7,4. Desta solução foram semeados 100µL em placas de ágar trípico soja (TSA) e incubado por 18 a 24 horas em temperatura de 36 ±1°C. A eficiência do desinfetante foi expressa em redução logarítmica, sendo considerado a redução de 4 log (99,99%) entre a população inicial e população sobrevivente. O

procedimento foi realizado em pH 6 e 9.

## RESULTADOS

O desinfetante foi eficiente quando testado para inibição de SE nas diluições de 1:1000 em pH6 na presença de MO (SFB, LI e LD) nas concentrações de 1%, 3%, 5%, e 7%, conforme pode ser observado na tabela 1. Em pH 9 respeitando a mesma diluição do produto, MO e seus respectivos percentuais, o desinfetante não foi efetivo frente SE em LI a 7%.

Na diluição 1:2000 o desinfetante inativou SE em SFB 1%, 3%, 5%, 7% em pH6 e pH9. Na mesma diluição do produto e em LI tanto em pH6 como em pH9 houve redução do crescimento nas concentrações de 1% e 3% e não foi efetivo nas concentrações 5% e 7%. Entretanto, em pH6 nas concentrações de LD 1%,3%, 5%, e 7% não houve crescimento, quando comparado a pH9 que houve crescimento em LD nas concentrações de 5% e 7%, conforme descrito em tabela 1.

TABELA 1: ATIVIDADE DO DESINFETANTE À BASE DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIA FRENTE A *SALMONELLA ENTERITIDIS* EM DUAS DIFERENTES DILUIÇÕES, PH6 E PH9 E COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIFERENTES MATÉRIAS ORGÂNICAS, APÓS 15 MINUTOS DE CONTATO

(continua)

	1:2000		1:1000	
	(pH6)	(pH9)	(pH6)	(pH9)
<b>SFB 1%</b>	S	S	S	S
<b>SFB 3%</b>	S	S	S	S
<b>SFB 5%</b>	S	S	S	S
<b>SFB 7%</b>	S	S	S	S
<b>LI 1%</b>	S	S	S	S
<b>LI 3%</b>	S	S	S	S
<b>LI 5%</b>	R	R	S	S
<b>LI 7%</b>	R	R	S	R
<b>LD 1%</b>	S	S	S	S
<b>LD 3%</b>	S	S	S	S
<b>LD 5%</b>	S	R	S	S
<b>LD 7%</b>	S	R	S	S



(conclusão)

Sensível (S): Inoculo que apresentou redução logarítmica de quatro log (99,99%);  
 Resistente (R): Inoculo que não apresentou redução logarítmica de quatro log (99,99%).  
 SFB: Soro fetal bovino; LI: Leite integral; LD: Leite desnatado

Quando desafiado frente a ST, o desinfetante foi eficiente nas diluições de 1:1000 e 1:2000 em pH6 e pH9 para SFB 1%, 3%, 5%, e 7%. Na diluição de 1:1000 em pH6 houve redução bacteriana de 99,99% em LI 1%, 3% e 5%, já em pH9 o desinfetante foi eficiente somente em LI 1% e 3%. Nas mesmas concentrações de LI, na diluição de 1:1000 o desinfetante foi eficiente somente a 1%, tanto em pH6 e pH9. Em LD o desinfetante foi eficiente na diluição de 1:1000 nas concentrações de 1% e 3% em pH6 e pH9. Na diluição de 1:2000 o desinfetante foi eficiente nas concentrações de LD 1% e 3% em pH6 e somente na concentração de 1% em pH9, conforme tabela 2.

TABELA 2: ATIVIDADE DO DESINFETANTE À BASE DE QUATERNÁRIO DE AMÔNIA FRENTE A *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM DUAS DIFERENTES DILUIÇÕES, PH6 E PH9 E COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIFERENTES MATÉRIAS ORGÂNICAS, APÓS 15 MINUTOS DE CONTATO EM DIFERENTES DILUIÇÕES.

	1:2000		1:1000	
	(pH6)	(pH9)	(pH6)	(pH9)
<b>SFB 1%</b>	S	S	S	S
<b>SFB 3%</b>	S	S	S	S
<b>SFB 5%</b>	S	S	S	S
<b>SFB 7%</b>	S	S	S	S
<b>LI 1%</b>	S	S	S	S
<b>LI 3%</b>	R	R	S	S
<b>LI 5%</b>	R	R	S	R
<b>LI 7%</b>	R	R	R	R
<b>LD 1%</b>	S	S	S	S
<b>LD 3%</b>	S	R	S	S
<b>LD 5%</b>	R	R	R	R
<b>LD 7%</b>	R	R	R	R

Sensível (S): Inoculo que apresentou redução logarítmica de quatro log (99,99%);  
 Resistente (R): Inoculo que não apresentou redução logarítmica de quatro log (99,99%).  
 SFB: Soro fetal bovino; LI: Leite integral; LD: Leite desnatado



## DISCUSSÃO

De acordo com Walia et al. (2017), o principal mecanismo de ação do cloreto de benzalcônio é a ruptura da bicamada lipídica de membrana citoplasmática seguida de extravazamento de componentes citoplasmáticos e eventual lise da célula. A seguinte sequência de eventos foi sugerida a micro-organismos expostos aos agentes catiônicos (CARMONA-RIBEIRO; DE MELO CARRASCO, 2013; GERBA, 2015; MCDONNELL, 2007): 1) adsorção e penetração do agente a parede celular; 2) reação com membrana citoplasmática, seguida de desorganização da membrana; 3) vazamento de material de baixo peso molecular; 4) degradação de proteínas e ácidos nucleicos; e 5) lise da parede celular causada por enzimas autolíticas.

Entretanto, vários estudos mostram que fatores inerentes a química dos produtos, condições de aplicação a campo e aos micro-organismos alvo podem comprometer a eficácia dos desinfetantes e por isso devem ser testados. (DAVIES, 2003; DROVAK et al., 2008; GREZZI, 2008; MAILLARD, 2013; RUTALA; WEBER, 2008; TAMÁSI, 1995).

Neste estudo constatamos que a atividade do desinfetante é inversamente proporcional a concentração de MO, ou seja, ao aumentar a concentração de MO, o desinfetante torna-se incapaz de inativar os micro-organismos, exceto com SFB onde o desinfetante foi eficiente em todos os tratamentos. De acordo com Maillard (2013) a MO compromete a ação dos desinfetantes de três maneiras: (I) redução da concentração disponível do desinfetante; (II) proteção aos micro-organismos contra danos externos; e (III) formação de agregados microbianos envoltos por camada de exopolissacarídeos.

O SFB usado como simulador de MO no ensaio geralmente é produzido a partir de sangue extraído de feto bovino de vacas prenhes enviadas ao abate e é universalmente utilizado como “aditivo” para cultivo celular (HEMEDA; GIEBEL; WAGNER, 2014). Embora amplamente utilizado e com demanda mundial de consumo em torno de 500.000 L/ano apresentam variações quantitativas e qualitativas em seus lotes (GSTRAUNTHALER, 2003). De acordo com a tabela 3, apenas 4,07% dos componentes orgânicos do SFB são efetivamente capazes de inativar os desinfetantes,

ou seja, na condição de 7% de desafio de MO com SBF, teremos 0,28% de substâncias capazes de inibir a atividade do desinfetante.

O leite, também utilizado como simulador de MO é constituído por aproximadamente 87% de água, e o restante, em torno de 12% a 13%, de elementos sólidos. Os principais elementos sólidos do leite são lipídeos, carboidratos, proteínas, sais minerais, e vitaminas. Desta forma, os sólidos totais do leite (ST) englobam todos os seus componentes, exceto água. Entretanto os sólidos não gordurosos (SNG) são todos os elementos do leite exceto água e gordura (BRITO et al., 2007).

TABELA 3: COMPONENTES DO SORO FETAL BOVINO E SUA VARIAÇÃO DE ACORDO COM O CERTIFICADO E ANÁLISE DO FABRICANTE.

<b>CONCENTRAÇÃO BIOQUÍMICA DO SORO FETAL BOVINO</b>		
<b>Componentes</b>	<b>Especificação</b>	<b>Concentração</b>
Proteína total	3,50 a 5,50 g/100mL	4,07 g/100mL
Hemoglobina	0,001 a 0,03 g/100mL	0,01779 g/100mL
Bactéria	Negativo	Negativo
Fungo	Negativo	Negativo
Mycoplasma	Negativo	Negativo

Adaptado do Certificado de Análise do Soro Fetal Bovino disponibilizado pelo fornecedor

Para o Decreto 9.013, de 29 de março de 2017 (BRASIL, 2017), considera-se que o leite atenda as seguintes especificações da tabela 4:

TABELA 4: COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE.

<b>Itens de composição</b>	<b>Requisitos</b>	
	<b>LI</b>	<b>LD</b>
<b>Gordura (g/100 g)</b>	Mínimo 3,0	Máximo 0,5
<b>Sólidos não gordurosos (g/100 g)</b>	Mínimo 8,4	Mínimo 8,4
<b>Sólidos Totais (g/100 g)</b>	Mínimo 11,4	Mínimo 8,9

LI: Leite integral; LD: Leite desnatado.

Adaptado de Decreto 9.013, de 29 de março de 2017.

Levando em consideração os constituintes do leite capazes de inativar a atividade dos desinfetantes, para o LI é 11,4%, ou seja, em 7% de LI, apenas 0,798% compromete a ação do desinfetante e para o LD a 7%, somente 0,623% inibe a ação do desinfetante.

Em relação ao pH é necessário retomar a etapa inicial do mecanismo de ação, ou seja, a adsorção e penetração do desinfetante a bactéria depende da interação

eletrostática entre a porção catiônica da molécula de CQA com as proteínas carregadas negativamente na membrana celular bacteriana, e em seguida perfuram a bicamada lipídica bacteriana causando ruptura da membrana e vazamento do conteúdo celular e lise celular (MELIN et al., 2016; JENNINGS; MINBIOLE; WUEST, 2016).

Maillard (2013) afirma que a alteração do pH também pode alterar a carga na superfície celular, ou seja, a medida que o pH aumenta o número de grupos carregados negativamente na superfície bacteriana também aumentaria, melhorando o grau de ligação com o cátion, conseqüentemente melhoraria a ação do desinfetante. Esta afirmação corrobora com outros autores que afirmam que o pH ótimo de atuação para os CQA é alcalino. (AL-ADHAM et al., 2013; GREZZI, 2008; GORMAN; SCOTT, 2004; MORGULIS; SPINOSA, 2005; PAULINO, 2002; SESTI, 2005). No trabalho constatamos que o desinfetante apresentou melhores resultados frente as condições de estudo em pH ligeiramente ácido.

## **CONCLUSÃO**

O SFB não comprometeu a ação do desinfetante em nenhum dos ensaios do estudo e por esta razão ele não é o simulador de MO mais adequado para estudos de eficácia de desinfetantes.

O LI e LD comprometeram a ação do desinfetante estudado e por esta razão podem ser usados como alternativas em substituição do SRF para simular MO.

O desinfetante apresentou melhor desempenho em pH ligeiramente ácido, contrariando o que a literatura indica como melhor condição de atividade.

## REFERÊNCIAS

- AI-ADHAM, I. HADDADIN, R. COLLIER, P. Types of Microbicidal and Microbi-static Agents. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.1, p. 5-70.
- BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCIRU, A.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. In: **Agencia de Informação Embrapa**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_21720039243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html)>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- BRASIL, P. D. R. DO. **Decreto no 9.013**, de 29 de março de 2017. 2017.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.; DE MELO CARRASCO, L. D. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9906–9946, 2013.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–22, 2003.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E. V. **DIN EN 1276**. Beuth Verlag, 2009.
- GERBA, C. P. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 464–469, 2015.
- GORMAN, S.; SCOTT, E.; Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. In: HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. **Pharmaceutical Microbiology 7º ed**. Massachusetts: Blackwell Science, 2004, Cap. 17, p. 285- 305.
- GREZZI, G. Limpeza e desinfecção na avicultura. Ergomix. **Artigo Técnico**. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/avicultura/artigos/limpeza-desinfeccao-avicultura-t36727.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2017.
- GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **Altex**, v. 20, n. 4, p. 275–281, 2003.
- HEMEDA, H.; GIEBEL, B.; WAGNER, W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 170–180, 2014.
- JENNINGS, M. C.; MINBIOLE, K. P. C.; WUEST, W. M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. **ACS Infectious Diseases**, v. 1, n. 7, p. 288–303, 2016.
- KUANA, S.L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: BERCHIERI, J. A. et al., **Doenças das Aves**. 2º ed. Campinas. 2009, Cap.1.2, p. 21-38.

- MARIS, P. **Modes of action of disinfectants**. v. 14, n. 1, p. 47–55, 1995.
- MCDONNELL, G. Biocides: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. In: GURUSAMY, M. **Disinfection and decontamination: Principles, applications and related issues**. 1. ed. New York: Crc, 2007, Cap.6, p. 88-120
- MELIN, V. E. et al. Quaternary ammonium disinfectants cause subfertility in mice by targeting both male and female reproductive processes. **Reproductive Toxicology**, v. 59, p. 159–166, 2016.
- MORGULIS, M. S. F. A.; SPINOSA, H. S.; Antimicrobianos: Desinfetantes. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOZA, H.S.; GORNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à Avicultura**. ed. Roca. 2005, Cap. 7, p. 105-114.
- PAULINO, C. A.; Anti-sépticos e desinfetantes. In: SPINOZA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNASI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 2º ed. Rio de Janeiro. 2002, Ca. 35, p. 386-397.
- RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Draft guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities U.S. **Centre for Disease Control and Protection (CDC)**. [s.l: s.n.].
- SESTI, L. A. C. Biosseguridade em granjas de reprodutoras. In: MACARI, M.; MENDES, A. A. **Manejo de Matrizes de Corte**. 2.ed. Campinas: Facta, 2005, Cap.12, p. 244-321.
- TAMÁSI, G. Testing disinfectants for efficacy. **Revue scientifique et technique International Office of Epizootics**, v. 14, n. 1, p. 75–79, 1995.
- TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS, S. G. **Role of Quaternary Ammonium Compounds on Antimicrobial Resistance in the Environment**. [s.l: s.n.].
- THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH AT IOWA STATE UNIVERSITY. **Characteristics of Selected Disinfectants**. p. 1, 2008.
- WALIA, K. et al. The efficacy of different cleaning and disinfection procedures to reduce Salmonella and Enterobacteriaceae in the lairage environment of a pig abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 246, p. 64–71, 2017.
- ZHANG, C. et al. Science of the Total Environment Quaternary ammonium compounds ( QACs ): A review on occurrence , fate and toxicity in the environment. **Science of the Total Environment**, The, v. 518–519, p. 352–362, 2015.

## 4 CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE PLANOS DE HIGIENIZAÇÃO

### RESUMO

Planos de higienização bem executados no final do ciclo de criação são potencialmente capazes de reduzir a pressão de infecção e assegurar bons índices zootécnicos. Desta forma, cumprir cada etapa do plano de higienização, desde a escolha de um desinfetante, a limpeza previa e desinfecção são passos criteriosos a seguir. Com o presente trabalho foi avaliada a atividade *in vitro* de uma associação de glutaraldeído a 42,5% com cloreto de benzalcônio a 7,5% frente a frente a *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium, na presença de 3% de leite em pó desnatado para simular ação da matéria orgânica com 15 minutos de contato. Na segunda etapa do estudo foi comparada a redução de micro-organismos aeróbios em diferentes protocolos de higienização das instalações. Embora na análise *in vitro* o desinfetante foi eficaz para *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium, mesmo com presença de matéria orgânica, *in vivo* constatamos que o nível de limpeza é diretamente proporcional a redução de mesófilos totais, ou seja, o grau de limpeza das instalações interfere diretamente na eficácia do desinfetante.

**Palavras chave:** Biossegurança. Limpeza a seco. Limpeza úmida.

### ABSTRACT

Well-performed hygiene plans at the end of the productive cycle are potentially capable of reducing infection pressure and ensuring good zootechnical indexes. In this way, follow with each step of the hygiene plan, from the choice of a disinfectant, the previous cleaning and disinfection are steps the must by followed carefully. The present study evaluated the *in vitro* activity of a combination of glutaraldehyde 42.5% with benzalkonium chloride 7.5% compared to *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in the presence of 3% of skimmed milk powder for simulate organic matter action with 15 minutes of contact. In the second stage of the study, the reduction of aerobic microorganisms in different sanitation protocols of the facilities was compared. Although in the *in vitro* analysis the disinfectant was effective for *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium, even with presence of organic matter, *in vivo* we verified that the level of cleaning is directly proportional to the reduction of total mesophiles, that is, the degree of cleaning of the facilities interferes directly on the effectiveness of the disinfectant.

**Keywords:** Biosecurity. Dry cleaning. Wet cleaning.

## INTRODUÇÃO

No âmbito da saúde e produção animal, biosseguridade pode ser definida como o conjunto de procedimentos implantados para prevenir, controlar e ou gerenciar riscos diretamente relacionados a perigos específicos, como por exemplo agentes potencialmente capazes de causar enfermidades (LÉGER et al., 2017). De modo geral, um programa de biosseguridade (PB) abrangente segue uma hierarquia composta por três níveis: conceitual; estrutural e operacional (COLLETT, 2016; SESTI, 2005).

O objetivo primordial do PB é estabelecer nível de segurança por meio de um conjunto de normas rígidas afim de diminuir o risco da ocorrência de enfermidades para os animais e ou de importância em saúde pública (SESTI, 2005). Dentre essas destaca-se o plano de higienização (PH), componente fundamental para o PB (JANG et al., 2017).

O PH corretamente adotado ao final dos ciclos de criação são potencialmente capazes de reduzir a pressão de infecção e conseqüentemente prevenir a introdução e persistência de zoonoses e doenças endêmicas, além de ser indispensáveis para a manutenção de alta produtividade (BURBARELLI, FERNANDA et al., 2017; WHITE et al., 2017; JANG et al., 2017; LUYCKX et al., 2016, 2015; SESTI; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 1998).

Como premissas, um PH deve incluir procedimentos seguros e exequíveis, orientação do uso adequado de equipamentos para aplicação, a forma correta de aplicação de detergentes e desinfetantes e um sistema de monitoramento eficiente (GEHAN et al., 2009). Os equipamentos devem ser periodicamente revisados, pois se usados inadequadamente podem comprometer o objetivo final (PAYNE; KROGER; WATKINS, 2005).

Outro fator relevante é a escolha do desinfetante. Não existe produto ideal que atenda todas as exigências (COLDEBELLA et al., 2004; GEHAN et al., 2009; WHITE et al., 2017). Eles representam uma ampla variedade de produtos químicos com princípios ativos potencialmente capazes de prevenir, inativar ou inibir o crescimento de micro-organismos (DI FABIO & MARTINS, 2013). Portanto, é sensato monitorar a eficácia dos desinfetantes nas instalações e quando necessário fazer rotação

de moléculas (WHITE et al., 2017).

Contudo, a avaliação e comparação entre diferentes planos de higienização podem ajudar a selecionar o método mais apropriado para reduzir ou eliminar micro-organismos patogênicos, além da visão do tempo de trabalho e a indentificação de locais de difícil limpeza (LUYCKX et al., 2015b).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade de uma associação de desinfetantes disponível no mercado *in vitro* com dois diferentes agentes bacterianos e *in vivo* com diferentes tipos de limpeza.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, *in vitro*, foi avaliada a ação do desinfetante a base de glutaraldeído a 42,5% e cloreto de benzalcônio a 7,5% frente a *Salmonella* Heidelberg (SH) e *Salmonella* Typhimurium (ST), na presença de 3% de leite em pó desnatado para simular ação da matéria orgânica. Na segunda etapa, a avaliação *in vivo*, foi conduzida em três blocos diferentes de um aviário vazio com cinco boxes cada bloco, devidamente isolados. A dimensão do bloco era de 2,25m<sup>2</sup>, com um metro de altura, feito de piso de concreto e mureta sem reboco.

### PRIMEIRA ETAPA

#### **Avaliação da atividade *in vitro* do desinfetante:**

##### Preparo do inóculo:

As bactérias utilizadas para o ensaio foram isoladas de campo, provenientes da bacterioteca do Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA), Concórdia, Santa Catarina, sendo:

- SH isolado de suabe de arrasto de aviário no ano de 2016;
- ST isolado de caso clínico de diarreia em leitões de 72 dias no ano de 2014.

As cepas foram semeadas em ágar nutriente e incubadas a 37°C em condições de aerobiose, durante 18 a 24 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas em solução salina e o inóculo foi padronizado para *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, obtendo-se 6,3x10<sup>9</sup> e 1,1x10<sup>10</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /mL, respectivamente.



Protocolo do teste: A metodologia utilizada foi adaptada do método de suspensão da AOAC - 960.09 (PRINCIPLE, 1998). Após padronização do inoculo, 1mL da suspensão bacteriana foi colocado em quatro tubos. A eles foi adicionado 1mL de tampão fosfato salina (PBS) a pH 7,4 e acrescentado 1mL de leite desnatado 30% para simular a ação da matéria orgânica em cada tubo. Em seguida, adicionou-se 8mL do desinfetante em cada tubo seguindo as diluições de 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:3000. O desinfetante utilizado foi uma associação de glutaraldeído a 42,5% com cloreto de benzalcônio a 7,5%. Após 15 minutos, transferiu-se 1mL da solução de cada diluição para um tubo contendo 9mL de solução neutralizante (caldo nutriente + 0,5% de tween 80 + 5% de soro de coelho). Ainda, foi então transferido 1mL da solução para 9mL de tampão fosfato salina (PBS pH 7,4), repetindo-se esse procedimento mais uma vez. De cada diluição foram semeados 100µL em ágar tríptico de soja (TSA) e incubados a 37°C por 24h.

A eficácia do desinfetante foi expressa em redução logarítmica (log) cinco ciclos logarítmicos das UFC entre a população inicial e a população sobrevivente. Foram apresentados os resultados considerando-se eficiente quando o desinfetante eliminou 99,999% (5 log), ou seja, quando não houve crescimento de colônias nas placas.

## **SEGUNDA ETAPA**

### **Avaliação da atividade *in vivo* do desinfetante:**

Foram realizados três protocolos diferentes de desinfecção, com solução desinfetante na concentração de 1:1000 e o volume solução desinfetante utilizado de 500 mL/m<sup>2</sup>, sendo:

Protocolo 1 (P1): a desinfecção ocorreu sem limpeza prévia, ou seja, com presença de matéria orgânica;

Protocolo 2 (P2): a desinfecção ocorreu após a limpeza a seco, ou seja, sem lavagem das instalações;

Protocolo 3 (P3): a desinfecção ocorreu após a limpeza a seco e úmida;

Na etapa de limpeza a seco foi utilizado vassoura e pá para retirada do material orgânico, enquanto que para a lavagem úmida foi utilizada uma bomba de alta pressão, modelo Jacto J7000.

As amostras de suabe de arrasto foram coletadas antes dos procedimentos

em todos os protocolos (amostra 1), após a limpeza nos protocolos P2 e P3 (amostra 2) e após a desinfecção em todos os protocolos (amostra 3).

As amostras foram enviadas para processamento no Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da UFPR (Labmor). Para análise quantitativa das amostras foi adotado métodos analíticos oficiais descritos na Instrução Normativa (IN) 62 (Brasil, 2003). No processamento das amostras foi adicionado ao suabe de arrasto 90mL de água peptonada a 2% e homogeneizado por dois minutos. Em seguida foi retirado 1 mL da solução e acondicionado em tubo com 9 mL de peptona a 0,1% e homogeneizado no vórtex. Este procedimento foi repetido em diluições seriadas até  $10^{-8}$  para cada amostra 1,  $10^{-7}$  após a limpeza para cada amostra 2 e  $10^{-6}$  após a desinfecção para cada amostra 3. Para cada diluição de interesse foi semeando 100  $\mu$ L em duplicatas nas placas de ágar padrão para contagem (PCA). As placas devidamente identificadas foram para a estufa a temperatura de 36°C, durante 24 horas para posterior contagem de colônias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito dos desinfetantes sobre os micro-organismos, de modo geral, é determinado pela interação entre os componentes celulares e princípio ativo (LAMBERT, 2013). Genericamente atuam sobre a estrutura e função de várias macromoléculas estruturais, tais como carboidratos, lipídeos, ácidos nucléicos e vários componentes essenciais que em combinação formam paredes celulares de bactérias, membranas e envelopes virais (MCDONNELL, 2007; NHUNG et al., 2015).

Associações de cloreto de benzalcônio e glutaraldeído são amplamente utilizadas (NHUNG et al., 2015). Essa associação é efetiva contra bactérias vegetativas, vírus lipofílicos e hidrofílicos, fungos e esporos (AL-ADHAM., et al 2013; CFSPH, 2008; CHIMA et al., 2012; MURRAY., et al 2015). No entanto alguns autores consideram que embora efetivos contra a maioria dos micro-organismos, somente a solução ativada em pH alcalino é mais eficiente e com capacidade de eliminar esporos (RUSSELL, 1990; MORGULIS; SPINOSA, 2005; SEHMI et al., 2016).

O principal mecanismo de ação do cloreto de benzalcônio é a ruptura da bicamada lipídica de membrana citoplasmática, consequentemente extravazamento de

componentes citoplasmáticos e eventual lise da célula (WALIA et al., 2017). O glutaraldeído atua como alquilante de grupos químicos afetando a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) e proteínas dos micro-organismos (AL-ADHAM, et al 2013; MORGULIS; SPINOSA, 2005). Entretanto os desinfetantes devem ser testados para garantir que são capazes de inativar micro-organismos alvo e entregar o grau de proteção pretendido pelo usuário ou garantido pelo fabricante (STANIFORTH, 2013).

De acordo com Staniforth (2013) os métodos para o teste de eficiência são semelhantes, o que difere são as condições que simulam os possíveis desafios encontrados no campo, tais como: micro-organismo alvo; temperatura; tempo de contato; e matéria orgânica.

Na avaliação *in vitro*, o desinfetante testado reduziu cinco logs tanto para SH como para ST em todas as diluições propostas, a 3% de matéria orgânica com 15 minutos de contato, conforme demonstrado na tabela 1.

TABELA 1: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO DESINFETANTE FRENTE A *SALMONELLA* HEIDELBERG E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM DIFERENTES DILUIÇÕES, COM 3% DE MATÉRIA ORGÂNICA EM 15 MINUTOS DE CONTATO.

(continua)

Diluição	Redução Logarítmica	S. Heidelberg	S. Typhimurium
<b>1:500</b>	5 log	S	S
<b>1:1000</b>	5 log	S	S
<b>1:2000</b>	5 log	S	S
<b>1:3000</b>	5 log	S	S

Sensível (S): Inoculo que apresentou redução logarítmica de cinco log (99,999%);

Resistente (R): Inoculo que não apresentou redução logarítmica de cinco log (99,999%).

A desinfecção é melhor definida como tratamento físico ou químico que destrói a maioria dos micro-organismos na forma vegetativa, de superfícies inanimadas (DROVAK et al., 2008; MORGULIS; SPINOSA, 2005). Entretanto é importante ressaltar que a eficácia da desinfecção não depende isoladamente do desinfetante (GOSLING et al., 2017; LUYCKX et al., 2015a; LUYCKX et al., 2016; MCLAREN et al., 2011; PAYNE; KROGER; WATKINS, 2005).

Embora o desinfetante avaliado tenha sido eficaz no estudo *in vitro*, para alguns autores é difícil determinar a verdadeira eficácia dos desinfetantes mesmo com

aplicação de metodologias laboratoriais padronizados e validados por órgãos nacionais e internacionais, pois fatores inerentes a química dos desinfetantes, condições de aplicação a campo e micro-organismo alvo interferem diretamente (MAILLARD, 2013; MCLAREN et al., 2011; PAYNE; KROGER; WATKINS, 2005). Complementando, a superfície a ser desinfetada associada ao gênero da bactéria, pode influenciar negativamente no resultado da desinfecção de forma mais acentuada que tempo de exposição ou número inicial de bactérias (MCLAREN et al., 2011).

A matéria orgânica também compromete a ação dos desinfetantes, em maior ou menor grau (MCLAREN et al., 2011). A limpeza antes da desinfecção é fundamental, pois qualquer detrito orgânico remanescente da limpeza inadequada pode reduzir ou anular a ação dos desinfetantes, além de fazer barreira física para micro-organismos (LUYCKX et al., 2015a; LUYCKX et al., 2016).

No presente trabalho constatou-se que o nível de limpeza é diretamente proporcional a redução de mesófilos totais, ou seja, para o P3 que passou pelas etapas de limpeza a seco e úmida, a redução de mesófilos pós desinfecção foi superior ao P2 onde só houve limpeza a seco. O P1 não passou por etapa de limpeza, consequentemente não apresentou diferença estatística antes e depois da desinfecção. Esses dados podem ser observados na tabela 2.

TABELA 2: REDUÇÃO DE MESÓFILOS TOTAIS ANTES E APÓS A EXECUÇÃO DOS PROTOCOLOS DE HIGIENIZAÇÃO.

(continua)

	Antes da limpeza	Após desinfecção
<b>P1 Sujo</b>	7.91 <sup>A</sup>	8.24 <sup>A</sup>
<b>P2 Seco</b>	7.95 <sup>A</sup>	6.68 <sup>B</sup>
<b>P3 Lavagem</b>	8.53 <sup>A</sup>	5.15 <sup>C</sup>

A, B, C diferem estatisticamente pelo método de Tukey (P < 0,05).  
Dados expressos em log 10

Segundo Maillard (2013) a matéria orgânica residual compromete a ação dos desinfetantes de três maneiras: (I) redução da concentração disponível do desinfetante; (II) proteção aos micro-organismos contra danos externos; (III) formação de agregados microbianos envoltos por camada de exopolissacarídeos o que justifica os resultados elencados observados.

De acordo com Rose et al. (2000) a limpeza é fundamental para a ação dos desinfetantes. A atividade visa a remoção física dos resíduos orgânicos das instalações e pode ser dividida em limpeza a seco e limpeza úmida ou lavagem, e é a fase em que a maior parte dos micro-organismos podem ser retirados. (AMARAL et al., 2006; COLDEBELLA et al., 2004; GREZZI, 2008; MORÉS et al., 2015; SESTI, 2005; SESTI; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 1998).

A tabela 3 compara os níveis de limpeza adotados no P2 e P3 e ao confrontar os resultados constatamos que somente a limpeza a seco não apresenta diferença significativa quando comparada com a limpeza a seco e posterior limpeza úmida.

TABELA 3: REDUÇÃO DE MESÓFILOS TOTAIS ANTES E APÓS OS PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA.

	Antes da limpeza	Após a limpeza	Redução (%)
<b>P2 Seco</b>	110.000.000 <sup>A</sup>	10.926.667 <sup>A</sup>	79,85 <sup>A</sup>
<b>P3 Lavagem</b>	1.105.000.000 <sup>A</sup>	833.333 <sup>B</sup>	99,92 <sup>B</sup>

<sup>A, B</sup>, diferem estatisticamente pelo método de Tukey (P < 0,05).

Apesar de Kašková et al. (2006) afirmar que a redução de contagem microbiana em uma limpeza prévia bem executada chega em torno de 84%, para Ramirez (2009) com equipamento adequado podemos reduzir até 99,99% dos micro-organismos do ambiente. A limpeza deve preceder a desinfecção e pode ser dividida em limpeza a seco e úmida (DI FABIO & MARTINS, 2013; SESTI, 2005). Na etapa de limpeza a seco é fundamental remover ao máximo o material orgânico sólido, ao passo que a limpeza úmida é a etapa mais demorada do processo, mas também a mais importante, pois. Desta forma a seleção de equipamentos para a lavagem é fundamental, pois a ineficácia dos PHs podem ser determinadas por falhas na remoção da matéria orgânica antes da desinfecção (BATTERSBY et al., 2017, GREZZI, 2007).

## CONCLUSÃO

Na etapa de avaliação *in vitro* o desinfetante mostrou ser eficiente para SH e ST de acordo com o protocolo testado. Ao confrontar os resultados entre as etapas

de execução do PH concluímos que o nível de limpeza das instalações influencia diretamente no resultado da desinfecção, ou seja, matéria orgânica compromete a ação da associação de glutaraldeído 42,5% e cloreto de benzalcônio a 7,5%. Para as práticas de limpeza aplicadas no estudo, a limpeza a seco associada a limpeza úmida foram superiores na redução de micro-organismos em comparação a limpeza a seco, ou seja, com melhor ação do desinfetante.

## REFERÊNCIAS

- AL-ADHAM, I. HADDADIN, R. COLLIER, P. Types of Microbicidal and Microbistatic Agents. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.1, p. 5-70.
- AMARAL, A. L. et al. Boas Práticas de Produção de Suínos. **Circular Técnica - Embrapa Suínos e Aves**, v. 50, p. 1–60, 2006.
- BATTERSBY, T. et al. Evaluating and improving terminal hygiene practices on broiler farms to prevent *Campylobacter* cross-contamination between flocks. **Food Microbiology**, v. 64, p. 1–6, 2017.
- BURBARELLI, FERNANDA, M. et al. Cleaning and disinfection programs against *Campylobacter jejuni* for broiler chickens : productive performance , microbiological assessment. **Poultry Science**, v. 96, n. September, p. 3188–3198, 2017.
- CHIMA, I. U. et al. Biosecurity and Disinfection Controls of Poultry Microbial Pathogen Infections in Nigeria. **J. World's Poult. Res. Journal homepage: J. World's Poult. Res**, v. 2, n. 21, p. 5–17, 2012.
- COLDEBELLA, A. et al. Comunicado 363 Técnico. p. 1–5, 2004.
- DI FABIO, J.; MARTINS, P.C.; Biosseguridade no incubatório. In: MACARI, M. et al., Manejo da incubação. 3º ed. Jaboticabal. 2013, Cap.3.8, p. 411-458.
- DVORAK, G.; ROTH, J.; AMASS, S. **Disinfection 101. Center for Food Security and Public Health**, Iowa State University, Ames, IA, 2008.
- GEHAN, Z. M. et al. In vitro Efiicacy Comparison of Disinfectants Used in the Commercial Poultry Farms. **International journal of Poultry Science**, v. 8, n. 3, p. 237–241, 2009.
- GOSLING, R. J. et al. Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where *Salmonella* is present. **Veterinary Microbiology**, v. 204, p. 46–53, 2017.
- GREZZI G. Limpeza e desinfecção na avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA,2007, Campinas, SP. **Anais**. Campinas, SP: FACTA, 2007.p.161-182.
- JANG, Y. et al. Efficacy evaluation of commercial disinfectants by using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a test organism. **J Vet Sci**, v. 18, n. May 2016, p. 209–216, 2017.
- KAŠKOVÁ, A.; ONDRAŠOVICOVÁ, O.; SOKOL, J.; et al. Efficiency of sanitary treatment in poultry breeding and poultry meat processing plant. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, n. 4, p. 611–617, 2006

LAMBERT, P. A. Mechanisms of Action of Microbicides. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Io-wa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.5 p. 95-107

LÉGER, A. et al. Assessment of biosecurity and control measures to prevent incursion and to limit spread of emerging transboundary animal diseases in Europe: An expert survey. **Vaccine**, v. 35, p. 5956–5966, 2017.

LUYCKX, K. et al. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. **Poultry Science**, v. 94, p. 740–749, 2015a.

LUYCKX, K. et al. Identification and biocide susceptibility of dominant bacteria after cleaning and disinfection of broiler houses. **Poultry Science**, v. 331, p. pew355, 2016.

LUYCKX, K. Y. et al. On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses. **Poultry science**, v. 94, p. 1986–1993, 2015b.

MAILLARD, J. Y. Factores Affecting the Activities Microbicides. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.3, p. 71-86.

MCDONNELL, G. Biocides: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. In: GURUSAMY, M. **Disinfection and decontamination: Principles, applications and related issues**. 1. ed. NewYork: Crc, 2007, Cap.6, p. 88-120.

MCLAREN, I. et al. Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination. **Avian Pathology**, v. 40, n. 1, p. 33–42, 2011.

MORGULIS, M. S. F. A.; SPINOSA, H. S.; Antimicrobianos: Desinfetantes. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOZA, H.S.; GORNIAK, S.L. **Farmacologia aplicada à Avicultura**. ed. Roca. 2005, Cap. 7, p. 105-114.

MORÉS, N; AMARAL, A. L; KICH, J. D. Controle de Salmonela granjas de suínos. In: KICH, J. D.; SOUZA. J. C. V. B. **Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle**. 1.ed. Brasília: DF. Embrapa, 2015, Cap.4, p. 117-154.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Medical Microbiology**. 8.ed. Philadelphia: Elsevier, 2016, Cap. 3, p 11-14.

NHUNG, N. T. et al. Induction of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli and Non-Typhoidal Salmonella Strains after Adaptation to Disinfectant Commonly Used on Farms in Vietnam. **Antibiotics**, v. 4, n. 4, p. 480–494, 2015.

PAYNE, J. B.; KROGER, E. C.; WATKINS, S. E. Evaluation of disinfectant efficacy when applied to the floor of poultry grow-out facilities. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 322–329, 2005.

PRINCIPLE, A. Copyright 1998 AOAC INTERNATIONAL Copyright 1998 AOAC



INTERNATIONAL. **Control**, v. 1991, n. c, p. 4–5, 1998.

RUSSELL, A. D. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 2, p. 99–119, 1990.

SEHMI, S. K. et al. The bactericidal activity of glutaraldehyde-impregnated polyurethane. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 5, p. 891–897, 2016.

SESTI, L.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. DE. Limpeza e Desinfecção em Suinocultura. **Suinocultura Dinâmica**, v. Nº20, 1998.

SESTI, L. A. C. Biosseguridade em granajs de reprodutoras. In: MACARI, M.; MENDES, A. A. Manejo de Matrizes de Corte. 2.ed. Campinas: Facta, 2005, Cap.12, p. 244-321.

STANIFORTH, L. Evaluation of Antimicrobial Efficacy. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Io-wa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.12, p. 236-243.

THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH AT IOWA STATE UNIVERSITY. Characteristics of Selected Disinfectants. p. 1, 2008.

WALIA, K. et al. The efficacy of different cleaning and disinfection procedures to reduce Salmonella and Enterobacteriaceae in the lairage environment of a pig abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 246, p. 64–71, 2017.

WHITE, D. et al. Evaluation of layer cage cleaning and disinfection regimens. **The Journal of Applied Poultry Research**, 2017.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise em HPLC constatou que o desinfetante “B” descrito no capítulo 2 estava com teor de ativos menor que o descrito em rótulo. Este déficit de ativo pode caracterizar erro de fabricação, baixa instabilidade da formulação e/ou fraude, consequentemente comprometeu a atividade antimicrobiana frente as bactérias estudadas *in vitro*, conforme apresentado na tabela 2 e pode resultar em desinfecção ineficiente e ainda induzir a resistência bacteriana por expor a subdoses.

As análises laboratoriais padronizadas para avaliar a eficácia *in vitro* dos desinfetantes usam simuladores de matéria orgânica. No trabalho descrito no capítulo 3 concluímos que o SFB usado para simular a ação da MO não comprometeu a atividade microbicida do desinfetante, ou seja, o desinfetante foi eficiente nas concentrações de 1%, 3%, 5%, e 7% de SFB em pH 6 e 9. O LI e LD comprometeram a ação do desinfetante estudado e por esta razão sugere-se que as provas de eficácia podem ser feitas com alternativas para simuladores de MO. Ainda no capítulo 3 o desinfetante apresentou melhor desempenho em pH ligeiramente ácido, contrariando o que a literatura indica como melhor condição de atividade.

Na etapa de avaliação *in vitro* descrita no capítulo 4 o desinfetante mostrou ser eficiente para SH e ST de acordo com o protocolo testado. Ao confrontar os resultados entre as etapas de execução do PH concluímos que o nível de limpeza das instalações influencia diretamente no resultado da desinfecção, ou seja, matéria orgânica compromete a ação da associação de glutaraldeído 42,5% e cloreto de benzalcônio a 7,5%. Para as práticas de limpeza aplicadas no estudo, a limpeza a seco associada a limpeza úmida foram superiores na redução de micro-organismos em comparação a limpeza a seco, ou seja, com melhor ação do desinfetante.

Elaborar e implantar um plano de higienização é uma tarefa complexa e a primeira decisão a tomar é escolher um desinfetante eficaz contra micro-organismos capazes de comprometer a saúde do plantel e ou de importância em saúde pública. As provas de eficácia *in vitro* podem ajudar nesta etapa. Outro ponto crítico é a limpeza, e deve ser bem executado, de preferência cumprindo as etapas de limpeza a seco e posteriormente úmida, pois qualquer resíduo de matéria orgânica pode inativar a ação dos desinfetantes. E por fim implantar um programa de monitoria pós execução do plano de higienização para avaliar a eficácia do procedimento adotado bem como

atividade *in vivo* do desinfetante de escolha.

## REFERÊNCIAS

- AI-ADHAM, I. HADDADIN, R. COLLIER, P. Types of Microbicidal and Microbi-static Agents. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.1, p. 5-70.
- AMARAL, A. L. et al. Boas Práticas de Produção de Suínos. **Circular Técnica** - Embrapa Suínos e Aves, v. 50, p. 1–60, 2006.
- BATTERSBY, T. et al. Evaluating and improving terminal hygiene practices on broiler farms to prevent *Campylobacter* cross-contamination between flocks. **Food Microbiology**, v. 64, p. 1–6, 2017.
- BRASIL, P. D. R. DO. **Decreto no 9.013**, de 29 de março de 2017. 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE\\_899\\_2003\\_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b)> Acesso em: 27 mar. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 15**, de 09 de maio de 2005. Regulamento Técnico para Testes de Estabilidade de Produto Farmacêutico de uso Veterinário. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 maio. 2005, Seção I, p. 6.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 101**, de 17 de agosto de 1993. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 17 ago. 1993, Seção I, p. 11937-45.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Dezembro de 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresentação-Surtos-DTA-2016.pdf/>>. Acesso em: 27 mar. 2017.
- BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCIRU, A.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. In: **Agência de Informação Embrapa**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_21720039243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html)>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- BURBARELLI, FERNANDA, M. et al. Cleaning and disinfection programs against *Campylobacter jejuni* for broiler chickens: productive performance, microbiological assessment. **Poultry Science**, v. 96, n. September, p. 3188–3198, 2017.
- CARDOSO, M. R. de I.; DA SILVA, L. E. Controle de Salmonela em matadou-ros frigoríficos de suínos. In: KICH, J. D.; SOUZA, J. C. V. B. **Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle**. 1.ed. Brasília: DF. Embrapa, 2015, Cap.4, p. 117-154.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; DE MELO CARRASCO, L. D. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9906–9946, 2013.

CHIMA, I. U. et al. Biosecurity and Disinfection Controls of Poultry Microbial Pathogen Infections in Nigeria. **J. World's Poult. Res. Journal homepage: J. World's Poult. Res.**, v. 2, n. 21, p. 5–17, 2012.

COLDEBELLA, A. et al. **Comunicado 363 Técnico**. p. 1–5, 2004.

COLLETT, S. R. Overview of Biosecurity. In: **The Merck Manual Veterinary**. Disponível em: <<http://www.msdsvetmanual.com/en-in/management-and-nutrition/biosecurity/overview-of-biosecurity>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

COLLETT, S. R. Overview of Biosecurity. In: **The Merck Manual Veterinary**. Disponível em: <<http://www.msdsvetmanual.com/en-in/management-and-nutrition/biosecurity/overview-of-biosecurity>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

DA SILVA, L. E. et al. Longitudinal Dissemination of Salmonella enterica Clonal Groups through the Slaughter Process of Salmonella-Positive Pig Batches. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1580–1588, 2012.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–22, 2003.

DE SILVA, M. et al. Evidence that a novel quaternary compound and its organic N-chloramine derivative do not select for resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Hospital Infection**, v. 91, n. 1, p. 53–58, 2015.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E. V. **DIN EN 1276**. Beuth Verlag, 2009.

DI FABIO, J.; MARTINS, P.C.; Biosseguridade no incubatório. In: MACARI, M. et al., **Manejo da incubação**. 3º ed. Jaboticabal. 2013, Cap.3.8, p. 411-458.

DVORAK, G.; ROTH, J.; AMASS, S. **Disinfection 101. Center for Food Security and Public Health**, Iowa State University, Ames, IA, 2008.

GEHAN, Z. M. et al. In vitro Efficacy Comparison of Disinfectants Used in the Commercial Poultry Farms. **International journal of Poultry Science**, v. 8, n. 3, p. 237–241, 2009.

GERBA, C. P. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 464–469, 2015.

GONZALEZ, M. et al. Sources for Salmonella Contamination During Pig Production in Eastern Spain. v. 2, n. 5, p. 37–42, 2015.

GORMAN, S.; SCOTT, E.; Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. In: HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. **Pharmaceutical Microbiology 7<sup>o</sup> ed.** Massachusetts: Blackwell Science, 2004, Cap. 17, p. 285- 305.

GOSLING, R. J. et al. Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where Salmonella is present. **Veterinary Microbiology**, v. 204, p. 46–53, 2017.

GREZZI G. Limpeza e desinfecção na avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2007, Campinas, SP. **Anais**. Campinas, SP: FACTA, 2007. p.161-182.

GREZZI, G. Limpeza e desinfecção na avicultura. Ergomix. **Artigo Técnico**. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/avicultura/artigos/limpeza-desinfeccao-avicultura-t36727.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **Altex**, v. 20, n. 4, p. 275–281, 2003.

HEMEDA, H.; GIEBEL, B.; WAGNER, W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, v. 16, n. 2, p. 170–180, 2014.

JAENICH, F. R. F.; COLDEBELLA, A.; MACHADO, H. G. P.; et al. Importância da Higienização na Produção Avícola. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. **Comunicado Técnico 363**. p. 1–5, 2004.

JANG, Y. et al. Efficacy evaluation of commercial disinfectants by using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a test organism. **J Vet Sci**, v. 18, n. May 2016, p. 209–216, 2017.

JENNINGS, M. C.; MINBIOLE, K. P. C.; WUEST, W. M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. **ACS Infectious Diseases**, v. 1, n. 7, p. 288–303, 2016.

JUNIOR, D. Pirataria on-line desafia autoridades com comércio de medicamentos veterinários. In: **Jornal Correio do Povo**. Disponível em: <<http://www.correiodopovo.com.br/Noticias/554332/Pirataria-online-desafia-autoridades-com-comercio-de-medicamentos-veterinarios>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

KAŠKOVÁ, A.; ONDRAŠOVICOVÁ, O.; SOKOL, J.; et al. Efficiency of sanitary treatment in poultry breeding and poultry meat processing plant. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, n. 4, p. 611–617, 2006.

KEITHLIN, J. et al. Systematic review and meta-analysis of the proportion of non-typhoidal Salmonella cases that develop chronic sequelae. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 7, p. 1333–1351, 2015.

KUANA, S.L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: BERCHIERI, J. A. et al., **Doenças das Aves**. 2º ed. Campinas. 2009, Cap.1.2, p. 21-38.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of Action of Microbicides. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Io-wa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.5 p. 95-107

LÉGER, A. et al. Assessment of biosecurity and control measures to prevent incursion and to limit spread of emerging transboundary animal diseases in Europe: **An expert survey**. *Vaccine*, v. 35, p. 5956–5966, 2017.

LUYCKX, K. et al. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. **Poultry Science**, v. 94, p. 740–749, 2015a.

LUYCKX, K. et al. Identification and biocide susceptibility of dominant bacteria after cleaning and disinfection of broiler houses. **Poultry Science**, v. 331, p. pew355, 2016.

LUYCKX, K. Y. et al. On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses. **Poultry science**, v. 94, p. 1986–1993, 2015b.

MAILLARD, J. Y. Factores Affecting the Activities Microbicides. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.3, p. 71-86.

MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882–889, 2010.

MARIS, P. **Modes of action of disinfectants**. v. 14, n. 1, p. 47–55, 1995.

MCDONNELL, G. Biocides: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. In: GURUSAMY, M. **Disinfection and decontamination: Principles, applications and related issues**. 1. ed. NewYork: Crc, 2007, Cap.6, p. 88-120.

MCLAREN, I. et al. Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination. **Avian Pathology**, v. 40, n. 1, p. 33–42, 2011.

MELIN, V. E. et al. Quaternary ammonium disinfectants cause subfertility in mice by targeting both male and female reproductive processes. **Reproductive Toxicology**, v. 59, p. 159–166, 2016.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Emerging Infectious Diseases: Threats to Human Health and Global Stability. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 7–9, 2013.

MORÉS, N; AMARAL, A. L; KICH, J. D. Controle de Salmonela granjas de suínos. In: KICH, J. D.; SOUZA, J. C. V. B. **Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle**. 1.ed. Brasília: DF. Embrapa, 2015, Cap.4, p. 117-154.

MORGULIS, M. S. F. A.; SPINOSA, H. S.; Antimicrobianos: Desinfetantes. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOZA, H.S.; GORNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à Avicultura**. ed. Roca. 2005, Cap. 7, p. 105-114.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Medical Microbiology**. 8.ed. Philadelphia: Elsevier, 2016, Cap. 3, p 11-14.

NHUNG, N. T. et al. Induction of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli and Non-Typhoidal Salmonella Strains after Adaptation to Disinfectant Commonly Used on Farms in Vietnam. **Antibiotics**, v. 4, n. 4, p. 480–494, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). **One Health**, 2018. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/>>. Acesso em: 08 Jan. 2018.

PAULINO, C. A.; Anti-sépticos e desinfetantes. In: SPINOZA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNASI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 2º ed. Rio de Janeiro. 2002, Ca. 35, p. 386-397.

PAYNE, J. B.; KROGER, E. C.; WATKINS, S. E. Evaluation of disinfectant efficacy when applied to the floor of poultry grow-out facilities. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 322–329, 2005.

PINHEIRO, V. Número mais provável de Salmonella isoladas de carcaças de frango resfriadas Most probable number of Salmonella isolated from refrigerated broiler carcasses. p. 2338–2342, 2010.

PIRES, S. M. et al. Source Attribution of Human Salmonellosis: An Overview of Methods and Estimates. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 9, p. 667–676, 2014.

PRINCIPLE, A. Copyright 1998 AOAC INTERNATIONAL Copyright 1998 AOAC INTERNATIONAL. Control, v. 1991, n. c, p. 4–5, 1998.

RUSSELL, A. D. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 2, p. 99–119, 1990.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Draft guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities U.S. **Centre for Disease Control and Protection (CDC)**. [s.l: s.n.].

SALOMÃO, R. Sindan lança campanha contra pirataria de medicamentos veterinários. In: **Revista Globo Rural**. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/noticia/2014/09/sindan-lanca-campanha-contra-pirataria-de-medicamentos-veterinarios.html>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

SCUR, M. C. et al. Atividade in vitro de desinfetantes comerciais no controle de duas espécies de bactérias de interesse avícola. **Boletim de Indústria Animal**, v. 71, n. 2, p. 147–153, 2014.



SEHMI, S. K. et al. The bactericidal activity of glutaraldehyde-impregnated polyurethane. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 5, p. 891–897, 2016.

SESTI, L. A. C. Biosseguridade em granajs de reprodutoras. In: MACARI, M.; MENDES, A. A. **Manejo de Matrizes de Corte**. 2.ed. Campinas: Facta, 2005, Cap.12, p. 244-321.

SESTI, L.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. DE. Limpeza E Desinfecção Em Suinocultura. **Suinocultura Dinâmica**, v. No20, 1998.

SLEEMAN, J. M.; DELIBERTO, T.; NGUYEN, N. Introduction: Why One Health? **Journal of Veterinary Science**, v. 18, p. 263–268, 2017.

STANIFORTH, L. Evaluation of Antimicrobial Efficacy. In: RUSSELL, H. **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterelization**. 5.ed. Io-wa: Wiley Blackwell, 2013, Cap.12, p. 236-243.

TAMÁSI, G. Testing disinfectants for efficacy. **Revue scientifique et technique International Office of Epizootics**, v. 14, n. 1, p. 75–79, 1995.

TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS, S. G. **Role of Quaternary Ammonium Compounds on Antimicrobial Resistance in the Environment**. [s.l: s.n.].

THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH AT IOWA STATE UNIVERSITY. **Characteristics of Selected Disinfectants**. p. 1, 2008.

WALIA, K. et al. The efficacy of different cleaning and disinfection procedures to reduce Salmonella and Enterobacteriaceae in the lairage environment of a pig abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 246, p. 64–71, 2017.

WHITE, D. et al. Evaluation of layer cage cleaning and disinfection regimens. **The Journal of Applied Poultry Research**, 2017.

WICKSTROM, M. L. Overview of Antiseptics and Disinfectants In: **The Merck Manual Veterinary**. Disponível em: <[http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antiseptics\\_and\\_disinfectants/overview\\_of\\_antiseptics\\_and\\_disinfectants.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antiseptics_and_disinfectants/overview_of_antiseptics_and_disinfectants.html)>. Acesso em: 10 ago.

XIE, T. et al. A system dynamics approach to understanding the One Health concept. **PLoS ONE**. 1–11, 2017.

ZHANG, C. et al. Science of the Total Environment Quaternary ammonium compounds ( QACs ): A review on occurrence , fate and toxicity in the environment. **Science of the Total Environment, The**, v. 518–519, p. 352–362, 2015.