

## O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente a *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares

The disinfectant sodium hypochlorite as a sanitary barrier: activity conditions against *Staphylococcus aureus* isolated from foods implicated in foodborne disease outbreaks

RIALA6/1216

Jane Mari Corrêa BOTH<sup>1</sup>, Solange Mendes LONGARAY<sup>1</sup>, César Augusto Marchionatti AVANCINI<sup>2\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Av. Bento Gonçalves, 9.090. Bairro Agronomia. CEP 91540-000. Porto Alegre, RS, Brasil.

e-mail: cesar.avancini@ufrgs.br

<sup>1</sup>Seção de Microbiologia de Alimentos, Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/SES/RS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

Recebido: 28.05.2009 – Aceito para publicação: 25.08.2009

### RESUMO

Para monitorar a eficácia do desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária, foi avaliada a atividade frente a 32 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos, no IPB-LACEN/RS, em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. Foi usado o teste de suspensão com o seguinte delineamento: solução com 200 ppm de cloro livre na ausência e presença de matéria orgânica (1% de leite integral); solução com 100 ppm de cloro livre; quatro tempos de contato (5, 10, 15 e 30 min). Como resultados: com 200 ppm, na ausência de matéria orgânica, todos os isolados foram inativados; com 200 ppm e matéria orgânica, 27 isolados permaneceram viáveis mesmo após 30 min de contato; a solução com 100 ppm necessitou de 30 min para que 24 isolados se apresentassem inativos. Concluiu-se que, para o uso deste desinfetante na proteção da saúde de comensais frente ao gênero bacteriano confrontado, o recomendado é uma solução com pelo menos 200 ppm de cloro livre, tempo de contato não inferior a 30 min e resíduos orgânicos nas superfícies com níveis inferiores a 1%.

**Palavras-chave.** hipoclorito de sódio, desinfecção, doenças transmitidas por alimentos, *Staphylococcus aureus*.

### ABSTRACT

To monitor the efficiency of sodium hypochlorite as a sanitary barrier, was evaluated the activity against 32 strains of *Staphylococcus aureus* gathered from IPB-LACEN/RS from food implicated in foodborne disease outbreaks. Suspension tests were carried out: a 200 ppm free chlorine solution in the absence and presence of organic matter (1% whole milk); 100 ppm free chlorine solution; and four contact times (5, 10, 15 and 30 min). The results: at 200 ppm, in absence of organic matter, all strains were inactivated. At 200 ppm, with organic matter, 27 strains had remained viable even after a contact of 30 minutes. At 100 ppm it was necessary a 30 min contact to 24 strains if presented inactive. In conclusion, to use this disinfectant in protection from health of dinner companion, against bacterial genus confronted, must have at least 200 ppm of free chlorine, contact time not lower than 30 min and levels of organic residues no higher than 1%.

**Key words.** sodium hypochlorite, disinfection, foodborne disease outbreaks, *Staphylococcus aureus*

## INTRODUÇÃO

No Brasil, de 1999 até 2008, 6.062 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) foram registrados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), com acometimento de 117.330 pessoas e com 64 óbitos neste período<sup>1</sup>. No Rio Grande do Sul, estudo epidemiológico indica que os micro-organismos isolados com maior frequência como causadores das DTA são *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus*, sendo este responsabilizado por 11% do total de surtos<sup>2</sup>.

O *Staphylococcus aureus* é o mais patogênico dos estafilococos, produz toxinas que contribuem para a patogenicidade da bactéria, entre elas uma enterotoxina que causa vômitos e náusea quando ingerida. Se os *Staphylococcus* são deixados incubar no alimento (abuso de temperatura), reproduzem-se e liberam enterotoxina estafilocócica no alimento. Os sintomas aparecem rapidamente, em geral após 4 a 6 horas e caracterizam-se por vômitos intensos, diarreia, dor abdominal e, às vezes, seguida de colapso<sup>3</sup>.

Entre as causas mais frequentes apontadas como favorecedoras da contaminação dos alimentos estão a falta de qualificação dos manipuladores no que diz respeito às boas práticas de processamento, as precárias condições de manuseio e conservação bem como a deficiente higienização do ambiente onde esses alimentos são preparados. Quanto ao procedimento de higienização, ele está dividido em etapas<sup>4</sup>: a limpeza (remoção de resíduos) e a desinfecção (ação sobre os micro-organismos deteriorantes ou patogênicos).

O cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, tem sido o composto químico mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica da água e dos alimentos. Comparativamente com outros desinfetantes, ele é de baixo custo e de fácil acesso, estando amplamente disponível no comércio<sup>5</sup>. No entanto, a experiência com resistência a antibióticos e biocidas indica que não há agente químico antimicrobiano que não possa, eventualmente, selecionar ou induzir resistência nos micro-organismos. Especificamente frente ao cloro, existem evidências de que vários micro-organismos apresentam diferentes graus de resistência a esse antimicrobiano<sup>6</sup>. Já foi alertado, também, que a eficácia da atividade antimicrobiana dos desinfetantes sofre variações, dependendo de fatores ambientais ou de manuseio<sup>7,8</sup>.

Visando subsidiar as ações da Vigilância Sanitária na prevenção e no controle de doenças transmitidas por

alimentos, aplicando os desinfetantes como barreira sanitária nos locais de distribuição e de consumo de gêneros alimentícios, propôs-se verificar as condições de eficácia do antimicrobiano de ambiente hipoclorito de sódio frente a amostras de *Staphylococcus aureus*, isoladas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram usados 32 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de alimentos envolvidos em surtos de DTA no Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2002 a 2006. O isolamento foi feito no Laboratório Central de Saúde Pública do Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB-LACEN/RS), onde permaneceram armazenadas mantidas congeladas (-20 °C) em caldo de infusão cérebro e coração (BHI-DIFCO®) e glicerol (na concentração de duas partes de amostra e uma parte de glicerol). Verificada a pureza das linhagens cultivadas em Baird Parker, foram identificadas em provas positiva de coagulase em tubo, catalase, termonuclease, teste de hemólise e fermentação da maltose e do manitol, foram novamente semeadas em Ágar Baird-Parker (DIFCO®) e incubadas por 24/48 horas a 35°C. De cada amostra, uma colônia foi retirada e colocada em 3 mL de caldo BHI (DIFCO®), incubada por 24 horas a 35 °C, tornando-se a “cultura-teste” (10<sup>9</sup> UFC/mL).

Para todas as provas de identificação bioquímicas realizadas, foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25.933.

No experimento, utilizou-se a concentração de 200 ppm e 100 ppm de hipoclorito de sódio<sup>8,9</sup> obtido de água sanitária com teor de cloro ativo de 2,38 % e pH 10,09 no produto a 1%, conforme laudo químico. A diluição foi feita em água destilada estéril, tendo o potenciômetro (Nova Técnica®, modelo NIpHM) indicado o pH de 9,47. Para simular ambiente com deficiência na limpeza, foi usado como matéria orgânica o leite integral, esterilizado em autoclave e adicionado ao teste na água de diluição do hipoclorito a 200 ppm na quantidade de 1 %.

A avaliação de eficácia antibacteriana foi pelo método de diluição, com teste de suspensão<sup>10</sup>. Tubos de ensaio contendo 10 mL do desinfetante na concentração 200 ppm sem e com matéria orgânica, e também, com 100 ppm receberam 0,1 mL da “cultura-teste” (isolados bacterianos). Mantendo-se constante a temperatura com ambiente climatizado no entorno de 25 °C, após os tempos de contato 5, 10, 15 e 30 min, foi retirada uma

alíquota, por meio de alça bacteriológica de platina com 10 µL e colocada em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio de cultura caldo BHI (DIFCO®). Esses tubos foram agitados, incubados a 35°C e as observações feitas nas 96 horas.

A leitura desses tubos indicava os resultados: não-turvação, considerado bactéria inativa (sensível); turvação, bactéria ativa (resistente).

Na análise estatística, utilizou-se a técnica não-paramétrica Teste Q de Cochran, com comparações múltiplas. Com nível de significância ( $p \leq 0,05$ ), levou em consideração a relação dos fatores: resultados bactéria inativa e ativa *versus* concentração de cloro livre *versus* presença/ausência de matéria orgânica *versus* tempo de contato. Formaram-se os seguintes níveis: A ou I; 200 ppm de hipoclorito de sódio sem matéria orgânica (C1S/M); 200 ppm de hipoclorito de sódio com matéria orgânica (C1C/M); 100 ppm (C2), nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos de contato. Deste modo, obteve-se a configuração de 12 níveis de tratamentos, como exemplo: C1C/M-5, C1C/M-10, ....., C2-5, C2-10 ....

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela 1, quando confrontados por 30 minutos de contato com hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm de cloro livre, sem a presença de matéria orgânica, 100% dos isolados foram inativados. Na mesma concentração, mas na presença de matéria orgânica 1% de leite integral, 84,4% dos isolados apresentaram-se ativos e na concentração de 100 ppm, 75% mostraram-se inativos.

Para explicar a diferença entre o total de isolados inativados na presença de 200 ppm e de 100 ppm de cloro livre, parece correto pensar que uma maior concentração de cloro livre na solução deve corresponder (mantendo outros fatores intervenientes constantes) a um aumento da atividade bactericida (desenhos de experimentos realizados para demonstrar essa hipótese serão apresentados mais adiante, no texto).

Sobre a viabilidade do *S. aureus* na presença de matéria orgânica, conforme informam Macêdo e Barra<sup>11</sup>, desinfetantes liberadores de cloro livre têm sua ação reduzida porque o cloro oxida primeiramente a matéria orgânica, reduzindo assim sua disponibilidade para ação antimicrobiana. Anteriormente, Lasmanis et al. (1953 apud Dychdala<sup>6</sup>), usando solução de hipoclorito com amostras de *Staphylococcus* (coagulase positiva e

negativa), observaram que com 3% de leite desnatado não foi obtida a completa morte dos organismos e que pequenas quantidades de leite exibiram progressivamente a diminuição no efeito da ação bactericida. Também Bessems<sup>12</sup> fez semelhante verificação com quaternário de amônio e hipoclorito. Adicionando 0,3% de albumina sérica bovina, a concentração desses compostos e o tempo necessários para obter o mesmo efeito de redução logarítmica do micro-organismo, em ausência de proteína, foi de pelo menos o dobro.

A presença da matéria orgânica pode explicar em parte a viabilidade bacteriana observada. Esse raciocínio, no entanto, não pode ser estendido ao caso da atividade do hipoclorito de sódio frente aos isolados de *S. aureus* na concentração de 100 ppm de cloro livre, posto que ausente a matéria orgânica. Para dar conta da interpretação desse resultado parecem pertinentes os argumentos de Sander et al.<sup>13</sup> quando informam que ao testar-se a sensibilidade de um micro-organismo frente a um desinfetante deve-se levar em consideração todos os fatores que possam interferir na avaliação, principalmente a situação problema específica, isto é, isolados bacterianos dentro de um mesmo gênero e espécie têm diferentes graus de sensibilidade a um mesmo desinfetante. Ou ainda, que o mesmo desinfetante com formulações similares, porém não idênticas, apresenta eficácia diferente contra a mesma bactéria. Com sentido semelhante, pode-se assumir a observação de Lee e Gilbert (1918, apud Wickramanayake e Spoul<sup>14</sup>) para quem a resistência aos antimicrobianos de micro-organismos aparentemente similares, pode ser diferente.

Elemento importante de ser anotado é sobre a influência do potencial hidrogeniônico na atividade bactericida de solução com hipoclorito de sódio. Como referido por Romão<sup>15</sup> e Andrade e Macêdo<sup>5</sup>, a forma mais ativa dos compostos liberadores de cloro é o ácido hipocloroso (HOCl), o qual está mais disponível com o pH da solução entre 5 e 8. No entanto, nesse experimento optou-se por não fazer a correção do pH, pois o objetivo foi o de agregar informações sobre a eficácia desse antimicrobiano em cenários epidemiológicos concretos.

Fair et al. e Morris, citados por Dychdala<sup>6</sup>, reforçam a observação de que a atividade do hipoclorito depende do pH. Dychdala<sup>6</sup> também concorda que o ácido hipocloroso tem maior atividade antimicrobiana, e que a sua presença depende do pH da solução, mas argumenta que a experiência mostra que em solução alcalina tanto o hipoclorito de sódio quanto de cálcio, com pequena quantidade de ácido hipocloroso e grande

do íon hipoclorito definitivamente possui propriedades bactericidas, sugerindo que esse elemento também deve exercer um papel importante na desinfecção.

Uma consideração sobre a técnica empregada. Em testes de avaliação da atividade desinfetante, frequentemente é sugerido o uso de produtos químicos para neutralizar os resíduos antimicrobianos que possam ser carregados junto às subculturas de bactérias suspensas<sup>16</sup>. Como neutralizador do cloro, a indicação é o tiosulfato de sódio a 0,6 %. No entanto<sup>17</sup>, esse composto pode provocar inibição microbiana em organismos do gênero *Staphylococcus*. Assim, optou-se por usar a técnica de neutralização do cloro por diluição até níveis subinibitórios. Esse procedimento foi realizado quando a alíquota retirada com a alça de platina (10 µL) do tubo teste era inoculada em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio líquido caldo BHI, o que significou uma diluição de 300 vezes.

Na Tabela 1 pode-se observar que na concentração de 200 ppm de cloro livre do hipoclorito de sódio, sem a presença de matéria orgânica, nos primeiros 5 minutos de contato 78,1% dos isolados de *Staphylococcus aureus* foram inativados. Aos 10 minutos, e também aos 15 minutos, 96,9% dos isolados foram inativados. Ao tempo de contato de 30 minutos 100% dos isolados apresentaram-se inativos.

Quando os isolados de *Staphylococcus aureus* foram confrontados com o hipoclorito de sódio na

concentração de 200 ppm de cloro livre na presença de matéria orgânica, tanto aos 5 quanto aos 10 minutos de contato 100% permaneceram ativos/resistentes. Aos 15 minutos, 9,4% dos isolados foram inativados. Mesmo com 30 minutos de contato, quando presente a matéria orgânica, apenas 15,6% foram inativados pelo desinfetante ou, por outro lado, 84,4% apresentaram-se ativos.

No confronto dos isolados com a concentração de 100 ppm, aos 5 minutos de contato observa-se que 21,9% dos isolados foram inativados. Aos 10 minutos 34,4% dos isolados foram inativados e aos 15 minutos 46,9% deles. Aos 30 minutos 75% dos isolados estavam inativados, mas, visto de outro modo, 25% dos isolados de *Staphylococcus aureus* ainda estavam viáveis.

Pode-se perceber que quanto maior o tempo de contato, maior inativação de isolados. Para melhor compreensão desse evento recorre-se a Tortora *et al.*<sup>3</sup>, quando explicam que a taxa de morte está na dependência da carga populacional, das características microbianas, mas também do tempo de exposição. Essa reflexão igualmente coincide com a de Bessems<sup>16</sup>, segundo quem a influência do tempo de contato no efeito antimicrobiano de desinfetantes seria relatado com frequência na literatura científica. Em se usando uma concentração constante do antimicrobiano no teste, seu efeito aumentaria com o acréscimo de tempo de contato, o que coincide com o que foi encontrado neste experimento.

**Tabela 1.** Eficácia do hipoclorito de sódio, verificada pelo teste de suspensão, frente a 32 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos no IPB-LACEN/RS entre 2002 e 2006, em alimentos envolvidos em surtos de DTA.

Tempo de contato	200 ppm ausência de matéria orgânica (C1S/M)		200 ppm presença de matéria orgânica (C1C/M)		100 ppm (C2)	
	I	A	I	A	I	A
5 min	I	25	I	0	I	7
	A	7	A	32	A	25
10 min	I	31	I	0	I	11
	A	1	A	32	A	21
15 min	I	31	I	3	I	15
	A	1	A	29	A	17
30 min	I	32	I	5	I	24
	A	0	A	27	A	8

I= inativa; A= ativa.

Verificando a eficácia do hipoclorito de sódio por tempo de contato e nas diferentes concentrações de cloro, mesmo a relação maior tempo de contato e maior inativação dos isolados tendo ocorrido tanto no módulo experimental com 200 ppm quanto com 100 ppm, observou-se que com concentração de cloro livre maior, menor foi o tempo de contato necessário para que os isolados fossem inativados. A observação da relação entre concentração e atividade antimicrobiana já havia sido anotada anteriormente.

Com relação aos resultados da análise estatística foi concluído que deve haver, para a maior parte das comparações, diferença significativa entre a relação dos fatores concentração, ausência ou presença de matéria orgânica e tempo de contato. Não foram encontradas diferenças significativas, ou seja, poder-se-ia usar um ou outro, nos seguintes tratamentos: C1S/M-5 e C2-30; C1S/M-10 e C1S/M-15; C1S/M-10 e C1S/M-30; C1S/M-15 e C1S/M-30; C1C/M-5 e C1C/M-10; C1C/M-5 e C1C/M-15; C1C/M-5 e C1C/M-30; C1C/M-10 e C1C/M-15; C1C/M-10 e C1C/M-30; C1C/M-15 e C1C/M-30; C1C/M-15 e C2-5; C1C/M-30 e C2-5; C2-5 e C2-10; C2-10 e C2-15.

Chama-se a atenção para o fato de que as relações exclusivamente matemáticas podem não ser absolutas na interpretação dos resultados. Pode-se citar exemplos onde os tratamentos C1S/M-5 *versus* C2-30, ou C1S/M-10 e C1S/M-30 estatisticamente não apresentaram diferença significativa. No entanto, o sanitarista/higienista pode ter um olhar diferente sobre o resultado. Mesmo que a diferença de uma amostra, para o “n” 32 usado neste trabalho não indique matematicamente diferença significativa, o higienista deve pensar que uma única amostra viável após confrontação com o desinfetante tem grande importância, pois pode colocar em risco a segurança do alimento e conseqüentemente à saúde dos comensais.

## CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que, tomando como referência o gênero bacteriano confrontado, o uso do hipoclorito de sódio como barreira sanitária em ambientes de manipulação de alimentos promove maior segurança quando estiver com pelo menos 200 ppm de cloro livre, tempo de contato por 30 min e resíduos orgânicos nas superfícies com níveis inferiores a 1%.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. [acesso em 06 de abril de 2009]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=27500](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27500).
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Ministério da Saúde. [acesso em 08 de novembro de 2006]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs>.
3. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed; 2000.
4. Brasil Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] Resolução RDC Nº 216, de 15 de Setembro de 2004. [acesso em 24 de julho de 2004]. Disponível em: <http://www.e-legis.bvs.br/leisref>
5. Andrade NJ, Macêdo JAB. Higienização na indústria de alimentos. Falta edição? São Paulo: Livraria Varela; 1996.
6. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block, S.S. Disinfection, sterilization and preservation. 4. ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger; 1991. p.131-151.
7. Wiest JM. Desinfecção e desinfetantes. In: Guerreiro M, Oliveira SJ, Saraiva D. et al. Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública e saúde animal. Porto Alegre: Sulina; 1984. p. 51-66.
8. Food and Drug Administration – FDA. FDA/ Food Code 2001/ 21 CFR 178. 1010/Ch I (4-1-02 edition). [Accessed 29 jul 2007]. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF178.html>.
9. Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA. Higiene e sanitização para empresas de alimentos. Manual - Série Qualidade. Primeira ed. São Paulo, SP: PROFIQUA; 1995.
10. 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, p. 11937-45, 17 de ago 1993, Seção 1.
11. Macêdo JAB, Barra MM. O estado da arte do processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados, em função do pH. Leite & Derivados. 2002; 65: 26-30.
12. Bessems E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. International Biodeterioration & Biodegradation. 1998; 41: 177-83.
13. Sander JE, Hofacre CL, Cheng IH & Wyatt RD. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. Avian Diseases. 2002; 46: 997-1000.
14. Wickramanayake GB, Spoul OJ. Kinetics of inactivation of microorganisms. In: BLOCK, S.S. Disinfection, sterilization and preservation. 4. ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger; 1991. Part I, Chapter 3.
15. Romão CMCA. Desinfecção esterilização química. In: Teixeira P e Valle S (org). Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1998. p.133-62.
16. Langsrud S, Sundhein G. Factors influencing a suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants. J Appl Microbiol. 1998; 85 (6): 1006 – 12.
17. World Health Organization - WHO. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic disease. Geneva; 1984.(WHO/VPH/84.4).