

ANÁLISE DA EFICÁCIA ANTIBACTERIANA DO LYSOFORM® NA DESINFECÇÃO DE SUPERFÍCIES

Data de submissão: 17/06/2024

Data de aceite: 01/08/2024

Mellani Vitória de Farias Jucá

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Engenharia de Bioprocessos
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/5553439573272910>

Carlos Daniel Cruz Ribeiro

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Engenharia de Bioprocessos
Belém – Pará
<https://orcid.org/0009-0009-6661-2206>

Emmanuelle Giuliana Mendes Santana

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Engenharia de Bioprocessos
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/4977724089266744>

Luan Ratis Oliveira

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Engenharia de Bioprocessos
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/7906121361812935>

Rebeca Moraes Pimentel da Costa

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Engenharia de Bioprocessos
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/3302943092594421>

Sandriele dos Passos Aires

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Engenharia de Bioprocessos
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/2484390842448743>

Suellen Emilliany Feitosa Machado

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Biomedicina
Belém – Pará
<http://lattes.cnpq.br/1188745397501771>

RESUMO: “Desinfecção” é a eliminação de microrganismos na forma vegetativa durante a higienização de superfícies inanimadas; já “desinfetante” são agentes químicos classificados pela eficiência da quantidade de microrganismos erradicados. Este estudo avaliou a eficácia antibacteriana de Lysoform® na desinfecção do piso de um Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pará. A área analisada foi demarcada e a primeira coleta foi realizada com swab embebido em solução salina 0,9%, que foi friccionado no piso e semeado em Ágar Nutriente (AN; placa suja). A superfície foi desinfetada

com Lysoform® por 5 minutos (recomendação do fabricante). Realizou-se a segunda coleta, que foi inoculada em AN (placa limpa). As placas foram incubadas (37°C) e, após 24 horas, fez-se a análise macroscópica das unidades formadoras de colônias (UFC). Realizou-se coloração de Gram de 6 colônias que eram diferentes macroscopicamente. Seus perfis de susceptibilidade foram avaliados por disco-difusão: as suspensões bacterianas foram padronizadas e semeadas em ágar Mueller Hinton, onde foram dispostos discos com 10µL de clorexidina 0,12%, hipoclorito de sódio 2,5%, álcool 70% e Lysoform®, e um disco de eritromicina. Após incubação das placas (37°C/24h), mediu-se os halos. Lysoform® reduziu as bactérias do piso, pois o número de UFC na placa suja foi maior que na limpa. Das 6 colônias analisadas, 5 eram da placa suja (C1-C5) e 1 da limpa (C6). Constatou-se apenas bactérias Gram positivas: C1-C2 eram bacilos e C3-C6, cocos. Quanto à sensibilidade, C1 foi sensível a todas às substâncias, menos álcool; C2-C4 e C6 foram resistentes a álcool e hipoclorito de sódio e sensíveis aos demais. C5 foi resistente a álcool, hipoclorito de sódio e eritromicina. Lysoform® foi eficaz na desinfecção da área avaliada, porém reitera-se a importância na escolha de desinfetantes usados em ambientes laboratoriais, atendendo às recomendações do fabricante, pois a eficácia pode variar a cada microrganismo.

PALAVRAS-CHAVE: Desinfecção, microrganismos, agente químico, eficiência.

ANALYSIS OF THE ANTIBACTERIAL EFFICACY OF LYSOFORM® IN DISINFECTING SURFACES

ABSTRACT: “Disinfection” is the elimination of microorganisms in vegetative form during the cleaning of inanimate surfaces; “disinfectants” are chemical agents classified by the efficiency of the number of microorganisms eradicated. This study evaluated the antibacterial effectiveness of Lysoform® in disinfecting the floor of a Microbiology Laboratory at the Federal University of Pará. The area analyzed was demarcated and the first collection was carried out with a swab soaked in 0.9% saline solution, which was rubbed on the floor and sown on Nutrient Agar (AN; dirty plate). The surface was disinfected with Lysoform® for 5 minutes (manufacturer’s recommendation). The second collection was carried out, which was inoculated in AN (clean plate). The plates were incubated (37°C) and, after 24 hours, macroscopic analysis of the colony forming units (UFC) were done. Gram staining was performed on 6 colonies that were macroscopically different. Their susceptibility profiles were evaluated by disk diffusion: the bacterial suspensions were standardized and seeded on Mueller Hinton agar, where disks were placed with 10µL of 0.12% chlorhexidine, 2.5% sodium hypochlorite, 70% alcohol and Lysoform®, and an erythromycin disc. After incubating the plates (37°C/24h), the halos were measured. Lysoform® reduced bacteria on the floor, as the number of UFC on the dirty floor was greater than on the clean floor. Of the 6 colonies analyzed, 5 were from the dirty plate (C1-C5) and 1 from the clean plate (C6). Only Gram positive bacteria were found: C1-C2 were bacilli and C3-C6 were cocci. Regarding sensitivity, C1 was sensitive to all substances, except alcohol; C2-C4 and C6 were resistant to alcohol and sodium hypochlorite and sensitive to the others. C5 was resistant to alcohol, sodium hypochlorite and erythromycin. Lysoform® was effective in disinfecting the area evaluated, however, the importance of choosing disinfectants used in laboratory environments is reiterated, considering the manufacturer’s recommendations, as effectiveness may vary for each microorganism.

KEYWORDS: Disinfection, microorganisms, chemical agent, efficiency.

INTRODUÇÃO

A desinfecção eficaz de superfícies inanimadas é de extrema importância na prevenção da disseminação de microrganismos em ambientes diversos, incluindo áreas de saúde e espaços públicos. Em um cenário atual, vale destacar a pandemia de COVID-19, na qual observou-se a importância do uso de desinfetantes adequados para conter a propagação do SARS-CoV-2, causador de infecções respiratórias graves em humanos (Kampf, 2020).

Realizar a desinfecção e a esterilização utilizando desinfetantes e práticas de esterilização é essencial para garantir que objetos e superfícies ambientais não sejam transmissores de microrganismos patogênicos (Rutala; Donskey; Weber, 2023). Os produtos químicos são altamente eficazes nos processos de desinfecção quando usados conforme indicado pelo fabricante, incluindo a observação do tempo permanência exigido (Fickenscher *et al.*, 2023), da quantidade e das condições ambientais (como temperatura, umidade relativa e pH). Além disso, as propriedades específicas dos patógenos determinam a suscetibilidade a diferentes desinfetantes e cinética de inativação (Wibmann *et al.*, 2023).

Os quaternários de amônio (QACs) são desinfetantes sem álcool bem conhecidos e largamente utilizados na limpeza e desinfecção (Andreica *et al.*, 2024). São um grupo de compostos formados por um cátion de amônio quaternário substituído por uma ou mais cadeias laterais de hidrocarbonetos hidrofóbicos e três ou menos cadeias laterais mais curtas, possuindo propriedades anfífilas. Atividades antimicrobianas foram descritas para QACs, que podem interagir com as membranas fosfolipídicas de patógenos como as bactérias, levando à ruptura da membrana e à lise celular (Belova *et al.*, 2023).

Desde 1930, quando a atividade antimicrobiana desta classe de produtos químicos foi descrita pela primeira vez, muitas gerações de compostos de amônio quaternário foram desenvolvidas (Andreica *et al.*, 2024). Assim, devido a essas propriedades, os QACs são amplamente aplicados em agentes desinfetantes de superfícies inanimadas, bem como de tecidos vivos (Belova *et al.*, 2023). Vale ressaltar que, além do mecanismo de ação antimicrobiana desenrolar-se a partir da ruptura da parede celular dos microrganismos, os QACs também agem desnaturando proteínas e inibindo enzimas. Contudo, é um desinfetante que não inativa formas esporuladas, microbactérias e vírus hidrofílicos (Ribeiro; Dutra, 2020).

Os patógenos que sobrevivem no ambiente por vários momentos, potencialmente por longos períodos, enfatizam a importância da limpeza rotineira dos locais (Porter *et al.*, 2024). Os ambientes acadêmicos, como os laboratórios de pesquisa, também necessitam devida atenção para uma desinfecção eficaz, uma vez que neles há manipulação de diversos agentes patogênicos e contaminantes. Por isso, para prevenir contaminações cruzadas, manter a segurança dos pesquisadores e até mesmo evitar falsos resultados em práticas experimentais, faz-se necessário seguir à risca as práticas de desinfecção. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar a eficácia antibacteriana do agente químico Lysoform® na desinfecção de uma área delimitada do piso de um Laboratório de Microbiologia, localizado na Universidade Federal do Pará (UFPA).

METODOLOGIA

Caracterização do desinfetante

De acordo com o fabricante, Lysoform® mata 99,9% dos vírus (inclusive o SARS-CoV-2, vírus que pode causar a COVID-19), bactérias e fungos. Seus princípios ativos o Cloreto de Benzil Alquil Dimetil Amônio/Cloreto de Didecil Dimetilamônio (quaternários de amônio - QACs).

Demarcação da área a ser analisada

Com auxílio de uma fita adesiva, delimitou-se uma área no piso do Laboratório de Microbiologia (Figura 1). Escolheu-se, estrategicamente, uma área próxima à porta de entrada e saída, onde o fluxo de circulação é maior.



Figura 1 – Demarcação da área analisada (piso de um Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pará).

Fonte: Autor, 2023.

Coleta das amostras

A primeira coleta foi realizada utilizando um swab estéril, embebido em solução salina a 0,9%, que foi friccionado no piso e, em seguida, semeado em Ágar Nutriente (AN; nomeada “placa suja”). A superfície foi desinfetada com Lysoform® por 5 minutos (recomendação do fabricante). Decorrido este tempo, realizou-se uma segunda coleta com outro swab estéril, também embebido em solução salina a 0,9%, que foi inoculado em outra placa de AN (nomeada “placa limpa”). Os procedimentos estão ilustrados a seguir, na Figura 2. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 °C e, após 24 horas.

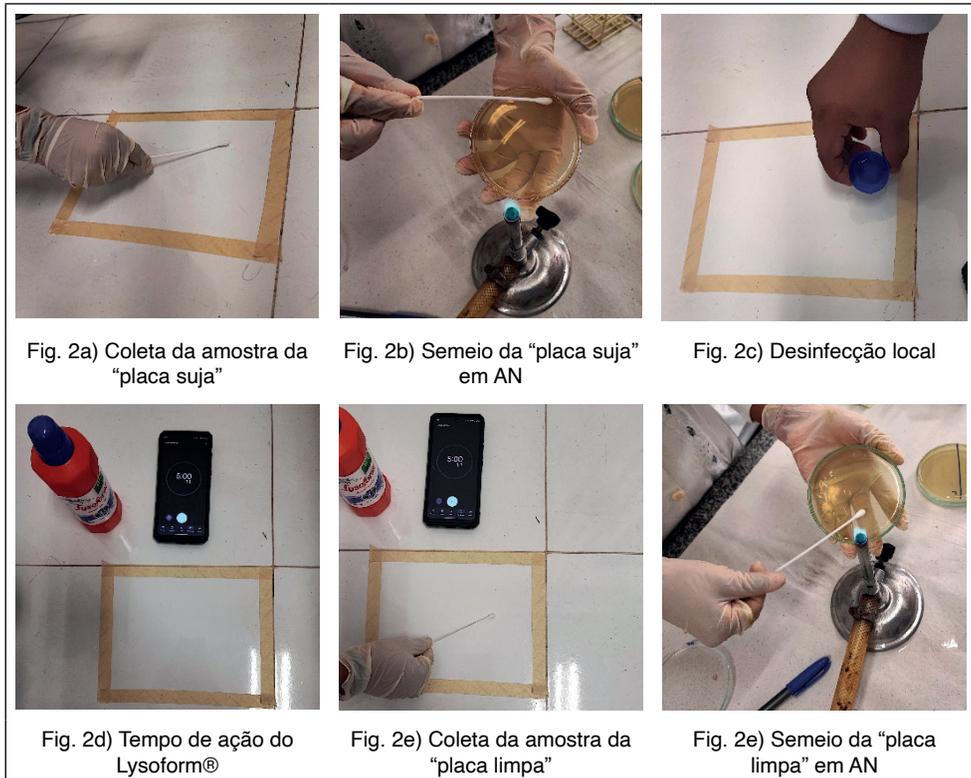


Figura 2 - Coleta e incubação das amostras.

Fonte: Autor, 2023.

Análises das colônias

Decorridas as 24 horas de incubação das placas, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram analisadas quanto aos critérios macroscópicos (cor, forma, elevação e textura). Realizou-se a coloração de Gram de 6 colônias isoladas morfologicamente diferentes do ponto de vista macroscópico, a fim de caracterizá-las microscopicamente.

Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade das 6 colônias isoladas foram avaliados utilizando a metodologia de disco-difusão, que se baseia na formação do halo de inibição em torno dos discos impregnados com os agentes antimicrobianos. Para isso, as suspensões bacterianas foram padronizadas de acordo com o tubo 0.5 da escala de MacFarland e semeadas em ágar Mueller Hinton, sobre os quais foram dispostos 5 discos de papel impregnados, separadamente, com 10 μ L dos seguintes agentes: clorexidina a 0,12%; hipoclorito de sódio a 2,5%; álcool a 70%; Lysoform®; antibiótico eritromicina.

Após este procedimento, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e, então, os halos de inibição foram medidos. Os microrganismos foram considerados resistentes (se não houvesse formação de nenhum halo) ou sensíveis (quando houvesse formação de halo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que, na desinfecção local, Lysoform® reduziu consideravelmente as formas vegetativas de bactérias que estavam presentes no piso, pois o número de UFC presentes na placa suja foi significativamente maior que na placa limpa. Este resultado pode ser visualizado na Figura 3.

Das 6 colônias selecionadas para análise, 5 eram da placa suja (C1-C5) e 1 da limpa (C6). Na coloração de Gram constatou-se apenas bactérias Gram positivas, sendo C1 e C2 bacilos e C3-C6 cocos (Tabela 1).

Quanto aos resultados do teste de disco-difusão, C1 foi sensível a todas às substâncias, menos ao álcool. C2, C3, C4 e C6 foram resistentes ao álcool e ao hipoclorito de sódio e sensíveis ao Lysoform®, clorexidina e ao antibiótico eritromicina. Destaca-se a resistência de C5 ao álcool, hipoclorito de sódio e ao antibiótico. Os tamanhos dos halos de inibição, em milímetros, são mencionados na Tabela 1. A interpretação destes resultados foi útil para estabelecer o perfil de susceptibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos avaliados.



Fig. 3a) Visualização das UFC na “placa suja”, antes da desinfecção com Lysoform®

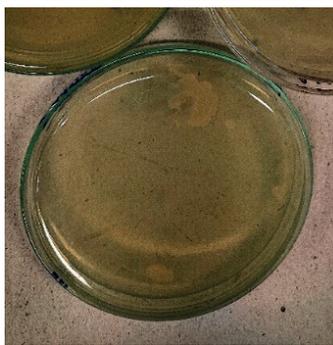


Fig. 3b) Visualização das UFC na “placa limpa”, após desinfecção, evidenciando a considerável redução da quantidade de colônias

Figura 3 – Unidades Formadoras de Colônia (UFC) na “Placa Suja” e “Placa Limpa” após o período de incubação em Meio Ágar Nutriente.

Fonte: Autor, 2023.

Colônia	Coloração de Gram	Resistente a	Sensível a	Halo (mm)
C1	Bacilos Gram Positivos	Álcool	Lysoform; Eritromicina; Clorexidina; Hipoclorito	Lys.: 29 Atb.: 30 Clo.: 40 HS.: 12
C2	Bacilos Gram Positivos	Álcool; Hipoclorito	Lysoform; Eritromicina; Clorexidina	Lys.: 22 Atb.: 35 Clo.: 38
C3	Estafilococos Gram Positivos	Álcool; Hipoclorito	Lysoform; Eritromicina; Clorexidina	Lys.: 15 Atb.: 32 Clo.: 35
C4	Diplococos Gram Positivos	Álcool; Hipoclorito	Lysoform; Eritromicina; Clorexidina	Lys.: 10 Atb.: 27 Clo.: 15
C5	Estafilococos Gram Positivos	Álcool; Eritromicina; Hipoclorito	Lysoform; Clorexidina	Lys.: 14 Clo.: 23
C6	Estafilococos Gram Positivos	Álcool; Hipoclorito	Lysoform; Eritromicina; Clorexidina	Lys.: 26 Atb.: 31 Clo.: 30

Tabela 1 – Perfil de susceptibilidade das colônias C1, C2, C3, C4, C5 e C6 a agentes antimicrobianos diversos. As colônias foram isoladas do piso de um Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pará (Legenda: álcool (Alc); clorexidina (Clo); eritromicina (Atb); hipoclorito de sódio (HS); Lysoform® (Lys)).

Fonte: Autor, 2023.

Superfícies contaminadas podem facilitar a transmissão de patógenos para as mãos às quais, da mesma forma, podem transferir patógenos para superfícies (Porter et al., 2024). Após a realização deste estudo, constatou-se que o Lysoform® reduziu de maneira significativa a quantidade de bactérias que estavam na área delimitada do piso do Laboratório, conforme relatado por Fickenscher *et al.* (2023), que mencionaram que a limpeza de superfícies reduz a carga microbiana.

O agente químico Lysoform®, bastante utilizado em limpezas domésticas, tem Cloreto de Benzil Alquil Dimetil Amônio/Cloreto de Didecil Dimetilamônio como princípios ativos, os quais são quaternários de amônio (QACs) e agem sobre a membrana bacteriana, a partir da adesão e penetração na parede celular. Os QACs têm muitas aplicações como surfactantes, em produtos de limpeza, amaciantes e produtos de higiene pessoal (Belova *et al.*, 2023).

Segundo Gerba (2015), acontece a seguinte série de eventos envolvidos na ação dos QACs contra microrganismos: (i) adsorção e penetração do QAC na parede celular; (ii) reação com a membrana citoplasmática (lipídica ou proteica), seguida de desorganização da membrana; (iii) vazamento de material intracelular de menor peso; (iv) degradação de proteínas e ácidos nucleicos; e (v) lise da parede celular causada por enzimas autolíticas.

Quanto ao álcool a 70%, todas as colônias se demonstraram resistentes no teste de disco-difusão. Supõe-se que, nas condições avaliadas, o agente químico evaporou dos discos antes que pudesse interagir com as bactérias semeadas. De acordo com Graziano *et al.* (2013), tal germicida de nível intermediário é largamente utilizado principalmente devido ao menor custo, quando se compara a outros produtos e, além disso, a recomendação clássica e consensual dos métodos seguros para descontaminação das superfícies consiste na limpeza prévia do local, seguida de desinfecção com um agente microbicida, por exemplo, o álcool a 70%.

Ademais, a C5 foi sensível ao Lysoform® no teste de disco-difusão, mas foi resistente ao álcool, hipoclorito de sódio e à eritromicina. Tal fato é preocupante, pois a resistência aos antibióticos é um grave problema de saúde pública. Segundo Dhingra *et al.* (2020), embora a resistência antimicrobiana (RAM) seja um fenômeno natural, o processo tem se agravado devido ao uso excessivo de antibióticos, os quais são subutilizados e mau utilizados, tanto em humanos como em animais. A expansão consistente da RAM prejudica a prevenção e o tratamento de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos e, como resultado, a RAM proporcionou um risco progressivamente grave para a saúde pública global nas últimas duas décadas, sendo que, atualmente, é avaliada como o maior perigo para a saúde no século XXI.

Novos testes são necessários para que as colônias dos microrganismos isoladas neste estudo sejam identificadas e, possivelmente, avaliadas quanto às características genéticas de resistência aos antimicrobianos.

CONCLUSÃO

Lysoform® demonstrou eficácia na desinfecção da área avaliada, pois reduziu a carga bacteriana. A partir dos resultados obtidos e analisados do teste de disco-difusão, reitera-se a importância na escolha adequada de desinfetantes empregados em ambientes laboratoriais, devendo ser respeitada as recomendações do fabricante, pois a eficácia pode variar dependendo do tipo de microrganismo, concentração do agente químico e tempo de ação.

REFERÊNCIAS

ANDREICA, B.I.; MITITELU-TARTAU, L.; ROSCA, I.; PELIN, I.M.; NICOL, E.; MARIN, L. **Biocompatible hydrogels based on quaternary ammonium salts of chitosan with high antimicrobial activity as biocidal agents for disinfection.** *Carbohydrate Polymers*, v. 342, 122389, 2024.

BELOVA, L.; POMA, G.; ROGGEMAN, M.; JEONG, Y. *et al.* **Identification and characterization of quaternary ammonium compounds in Flemish indoor dust by ion-mobility high-resolution mass spectrometry.** *Environment International*, v. 177 108021, 2023.

DHINGRA, S.; RAHMAN, N.A.A.; PEILE, E.; RAHMAN, M. *et al.* **Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter.** *Frontiers in Public Health*, v. 8, 2020.

FICKENSCHER, M.C.; STEWART, M.; HELBER, R.; QUILLIGAN, E.J.; KREITENBERG, A.; PRIETTO, C.A.; GARDNER, V.O. **Operating room disinfection: operator-driven ultraviolet 'C' vs. chemical treatment.** *Infection Prevention in Practice*, v. 5, 100301, 2023.

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

GRAZIANO, M.U.; GRAZIANO, K.U.; PINTO, F.M.G.; BRUNA, C.Q.M.; SOUZA, R.Q.; LASCALA, C.A. **Eficácia da desinfecção com álcool 70% (p/v) de superfícies contaminadas sem limpeza prévia.** *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 21, n. 2, p. 1-6, 2013.

KAMPF, G. **Potential role of inanimate surfaces for the spread of coronaviruses and their inactivation with disinfectant agents.** *Infection Prevention in Practice*, v.2., n. 2, 2020.

MARES-GUIA, M.A.M.M.; PAIVA, A.A.P.; MELLO, V.M.; ELLER, C M. *et al.* **Efetividade das técnicas de desinfecção doméstica para remover SARS-CoV-2 de máscaras de pano.** *Pathogens*, v. 11, p. 1-14, 2022.

MEDEIROS, L.P.; GAZAL, L.E.S.; SOUZA, LM. S.; CRUZ, V.D. *et al.* **Pesquisa da formação de biofilme e susceptibilidade ao quaternário de amônio em cepas de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas da produção aviária do Paraná.** *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 3, p. 21998-22009, 2021.

PORTER, L.; SULTAN, O.; MITCHELL, B.G.; JENNEY, A.; KIERNAN, M.; BREWSTER, D.J.; RUSSO, P.L. **How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A scoping review.** *Journal of Hospital Infection*, v. 147, p.25-31, 2024.

RIBEIRO, I.A.; DUTRA, L.M.A. **Métodos de limpeza e desinfecção em tempos de pandemia pelo novo coronavírus: revisão de literatura.** *Com. Ciências Saúde*, v. 31, n. 3, p. 49-55, 2020.

RUTALA, W.A.; DONSKEY, C.J.; WEBER, D.J. **Disinfection and sterilization: New technologies.** *American Journal of Infection Control*, v. 51, A13-A21, 2023.

WISSMANN, J.E.; BRÜGGEMANN, Y.; TODT, D.; STEINMANN, J.; STEINMANN, E. **Survival and inactivation of hepatitis E virus on inanimate surfaces.** *Journal of Hospital Infection*, v. 134, p. 57-62, 2023.