

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO NEUTRALIZADORA DO CALDO
LETHEEN, PREPARADO COM LECITINA DE SOJA
NÃO PURIFICADA, SOBRE DESINFETANTES À BASE DE
FENOL E DE AMÔNIO QUATERNÁRIO**

**EVALUATION OF THE LETHEEN BROTH NEUTRALIZATION
ACTION PREPARED WITH UMPURIFIED SOJA
LECTIN ON AMMONIUM QUATERNARY AND PHENOL
DISINFECTANTS**

José Francisco Höfling *
Maria de Fátima Sant'Anna **
Ione Corrêa ***

RESUMO

O uso de substâncias que neutralizam a ação de agentes químicos antimicrobianos tem sido recomendado para avaliar o potencial de ação de desinfetantes. Para desinfetantes fenólicos e de amônio quaternário, recomenda-se o emprego de meios de cultura (Letheen ágar ou caldo Letheen) — contendo lecitina e tween 80 como neutralizantes.

A ação neutralizadora do caldo Letheen, preparado com lecitina de soja não purificada, sobre a atividade antimicrobiana de desinfetantes, foi testada em várias diluições de um desinfetante à base de amônio quaternário e dois desinfetantes fenólicos. Os resultados confirmam a ação neutralizadora do caldo Letheen sobre os desinfetantes testados, mesmo quando preparado com lecitina de soja não purificada, sugerindo o uso desta substância como alternativa para os problemas encontrados na obtenção e ou preparação deste meio.

ABSTRACTS

The utilization of substances that might neutralize antimicrobial chemical agents action has been recommended to evaluate disinfectantes action potential. For phenolic and quaternary ammonium disinfectantes has been suggested culture media (agar Letheen or Letheen broth) enclosing lecitin and tween 80 as neutralization agent.

(*) Prof. Adjunto, Microbiologia e Imunologia FOP/UNICAMP.

(**) Pós-graduanda Biologia e Patologia Buco Dental, FOP/UNICAMP e Profª de Anatomia, FFA.

(***) Pós-graduanda Biologia e Patologia Buco Dental FOP/UNICAMP e Profª de Enfermagem, Faculdade Enfermagem e Obstetrícia de Araras.

The neutralization action of the Lethen broth prepared with unpurified soja lecitin on disinfectants antimicrobial activity was tested using phenolic and quaternary ammonium dilutions. The results obtained confirm the Lethen broth neutralization action over the tested disinfectants even prepared with unpurified soja lecitin suggesting the use of such substance as an alternative concerning the acquirement and preparation of this media.

INTRODUÇÃO

Os desinfetantes químicos são rotineiramente usados na saúde pública, hospitais, laboratórios e clínicas, numa tentativa de se reduzir a contaminação microbiana nestas áreas, já que as mesmas podem se transformar em reservatórios de infecções. Assim torna-se necessário uma avaliação da eficácia de ação dos vários desinfetantes existentes no mercado.

Segundo BRANSON (1972), a avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes é feita empregando-se substâncias que neutralizam a ação dos mesmos sobre os microrganismos. Para os desinfetantes halogenados e a base de metais pesados, utiliza-se como neutralizante o tioglicolato a 0,05%, para desinfetantes fenólicos e germicidas ativos em superfície, à base de amônio quaternário, recomenda-se 0,07% de lecitina mais 0,5% de polisorbato, ou ainda 10% de soro.

Vários autores estudaram a ação neutralizante da lecitina e do tween 80 sobre a ação antimicrobiana dos desinfetantes fenólicos e de amônio quaternário, QUISNO e cols. (1946), utilizando várias diluições de um sal de amônio quaternário, obtiveram resultados positivos para a lecitina e tween 80 como neutralizantes da ação bacteriostática desta substância. ERLANDSON e LAURENCE (1953), testando a ação neutralizadora do tween 80 sobre o hexaclorofeno e outros desinfetantes fenólicos, sugeriram o uso deste composto na diferenciação entre a atividade bactericida e bacteriostática de certos agentes antimicrobianos.

Esta propriedade da lecitina e do tween 80 neutralizar desinfetantes fenólicos e de amônio quaternário, tem sido utilizada também nas pesquisas sobre contaminação e infecção hospitalar. Assim VESLEY e MICHAELSEN (1964), utilizando um meio de cultura contendo lecitina e tween 80 (Lethen ágar), coletaram microrganismos antes e depois da limpeza e esterilização de superfícies de áreas hospitalares, e verificaram o grau de contaminação destas áreas pela contagem das colônias presentes no meio, após incubação das placas. Usando uma técnica semelhante, o Comitê sobre Contaminação Bacteriana (VESLEY e cols., 1970), estudou a eficácia dos diversos processos de limpeza e esterilização de superfície hospitalares, classificando-os em bom, razoável e fraco, conforme o número de colônias bacterianas presentes no Lethen ágar. BRUMMER

(1976), simulando as condições de uso dos desinfetantes, confirmou a ação neutralizadora do Lethen ágar sobre a ação bacteriostática de três desinfetantes, recomendando a utilização deste meio na detecção de microrganismos contaminantes de superfícies.

O presente trabalho tem como objetivo, testar a ação neutralizante do caldo Lethen sobre a atividade antimicrobiana de desinfetantes, usando na sua preparação lecitina de soja não purificada, como alternativa para as dificuldades encontradas na obtenção e preparação destes meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

A ação neutralizadora da lecitina e do tween 80 a ação antimicrobiana de desinfetantes, foi realizada empregando-se o método de QUISNO e cols. (1946), em que diluições do desinfetante testado são adicionadas em caldo Lethen e caldo simples, acrescentados de uma cultura de 24 horas de *Staphylococcus aureus* e incubados a 37°C por 48 horas.

Lethen é o meio de cultura que contém a lecitina e o tween 80, e sua fórmula e método de preparação são os seguintes:

Extrato de carne (Difco)	5,0g
Peptona (Difco)	10,0g
NaCl	5,0g
Lecitina (Drogasil)	0,7g
Tween 80 (Merck)	5,0g
Água destilada	1000ml

A lecitina e o tween 80 são adicionados à cerca de 400ml de água destilada quente. A mistura é fervida rapidamente. Os outros ingredientes são dissolvidos separadamente e adicionados à mistura de lecitina e tween, quando esta já estiver fria. Este caldo é então fervido por 10 minutos, filtrado, o pH ajustado entre 6,8 e 7,0, e o volume completado para 1000ml com água destilada. A seguir o caldo é distribuído em tubos de ensaio, 10ml em cada tubo. Os tubos são tampados com chumaço de algodão hidrófobo e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Foi utilizada lecitina de soja acondicionada em cápsula gelatinosa de 500mg (Drogasil).

Para a preparação do caldo simples, a fórmula e o método são os seguintes:

Extrato de carne (Difco)	5,0g
Peptona (Difco)	10,0g
NaCl	5,0g
Água destilada	1000ml

Os ingredientes são adicionados a cerca de 400ml de água destilada e aquecidos até a dissolução completa. Após a dissolução o caldo é fervido por 5 minutos, filtrado, o pH ajustado entre 7,4 e 7,6 e o volume completado para 1000ml com água destilada. A seguir o caldo é distribuído em tubos de ensaio, colocando-se 10ml em cada tubo. Os tubos são tampados com chumaço de algodão hidrófobo e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

Foram testados três desinfetantes: um à base de amônio quaternário – Duo Cide SP (Formaldeído-álcool, cloreto de Benzetônio, Isto-octil-fenoxi-polietoxi-etanol), e dois fenólicos – Duplofen e Germopol (ortobenzilparaclorofenol, paraterciário butil fenol).

As diluições feitas com cada desinfetante foram as seguintes: 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/20.000, 1/40.000, 1/50.000, 1/100.000, 1/120.000 e 1/140.000. Com os desinfetantes a base de fenol foram feitas duas diluições adicionais: 1/200 e 1/500.

Para avaliação da capacidade neutralizadora do Letheen, 1ml de cada diluição do desinfetante foi adicionada a 10ml do caldo Letheen, e 1ml da mesma diluição a 10ml do caldo simples. Os tubos foram então inoculados com 0,1ml de uma cultura de 24 horas de *Staphylococcus aureus* e incubados a 37°C por 48 horas.

Após a incubação, verificou-se o crescimento do microrganismo pela turbidez do meio, pelo exame microscópico das culturas, através da coloração pelo Gram, e pelo repique das culturas em ágar simples, com posterior incubação a 37°C por 48 horas.

Para verificar se a ação do desinfetante era bactericida ou bacteriostática, realizou-se com os resultados negativos uma contra prova, semeando-os em caldo simples, e incubando-os a 37°C por 48 horas.

RESULTADOS

Os resultados para o desinfetante a base de amônio quaternário estão apresentados na Tabela I.

Pelos resultados observa-se que o desinfetante inibiu o crescimento do *S. aureus* até uma diluição de 1/5000, e que o Letheen neutralizou a ação deste desinfetante até a diluição mínima testada, ou seja, 1/1000.

Uma turbidez nítida do caldo simples, apareceu a partir da diluição 1/50.000. Pelo exame microscópico verificou-se ausência de *S.*

aureus nas diluições 1/1000, 1/1500, 1/2000 e 1/5000, e presença de estafilococos esparsos nas diluições 1/20.000 e 1/40.000. Estafilococos abundantes apareceram a partir da diluição 1/50.000. Não se observou crescimento de microrganismos nas culturas em ágar simples e em caldo simples, realizados a partir das diluições 1/1000, 1/1500, 1/2000 e 1/5000, que haviam apresentado resultados negativos para turbidez e exame microscópico.

Tabela I. Efeito neutralizante do caldo Lethen sobre a ação antimicrobiana do Duo Cide Sp, verificado pela turbidez do meio, exame microscópico (coloração pelo Gram) e pela cultura em ágar simples.

Diluições de Desinfetante	Turbidez do Meio		Exame Microscópico (Coloração p/ Gram)		Crescimento de colonias em Ágar Simples	
	Caldo Lethen	Caldo Simples	Caldo Lethen	Caldo Simples	Caldo Lethen	Caldo Simples
	1/1000	?	(-)	(+)	(-)	(+)
1/1500	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1/2000	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1/5000	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1/20.000	(+)	?	(+)	(+ -)	(+)	(+)
1/40.000	(+)	?	(+)	(+ -)	(+)	(+)
1/50.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/100.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/120.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/140.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+) Indica turbidez positiva, presença abundante de cocos no exame microscópico e crescimento de colonias em ágar simples.

(?) Indica turbidez duvidosa.

(+ -) Indica presença de cocos esparsos no exame microscópico.

(-) Indica turbidez, exame microscópico e crescimento em ágar simples negativos.

No meio contendo lecitina e tween 80 a turbidez foi característica em todas as diluições, exceto na diluição 1/1000. Entretanto, pelo exame microscópico e pela cultura em ágar simples, todas as diluições apresentaram crescimento de microrganismos.

Os resultados para os desinfetantes fenólicos estão apresentados na tabela II.

Tabela II. Efeito neutralizante do caldo Letheen sobre a ação antimicrobiana dos desinfetantes Germopol e Duplofen, verificado pela turbidez do meio, exame microscópico (coloração pela Gram) e pela cultura em ágar simples.

Diluições de Desinfetantes	Turbidez do Meio		Exame microscópico (Coloração p/ Gram)		Crescimento de colônias em Ágar Simples	
	Caldo Letheen	Caldo Simples	Caldo Letheen	Caldo Simples	Caldo Letheen	Caldo Simples
	1/200	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
1/500	(+)	?	(+)	(+ -)	(+)	(+)
1/1000	(+)	?	(+)	(+ -)	(+)	(+)
1/1500	(+)	?	(+)	(+ -)	(+)	(+)
1/2000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/5000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/20.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/40.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/80.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/100.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/120.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1/140.000	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

LEGENDA:

(+) Indica turbidez positiva, presença abundante de cocos no exame microscópico e crescimento de colônias em ágar simples.

(?) Indica turbidez duvidosa.

(+ -) Indica presença de cocos esparsos no exame microscópico.

(-) Indica turbidez, exame microscópico e crescimento em ágar simples, negativos.

A turbidez, o exame microscópico e a cultura em ágar simples, revelaram presença evidente de estafilococos em todas as diluições em caldo Letheen.

No caldo simples não houve aparecimento de turbidez na diluição 1/2000, e esta turbidez não foi muito caracterizada nas diluições 1/1500, 1/1000 e 1/1500. A coloração pelo Gram demonstrou ausência de cocos na diluição 1/200, cocos esparsos nas diluições 1/500, 1/1000 e 1/1500, e os cocos abundantes a partir da diluição 1/2000. A cultura em ágar simples acusou crescimento em todas as diluições exceto na diluição 1/200. A contra prova em ágar simples desta diluição, mostrou-se também negativa para o crescimento dos microrganismos em teste.

DISCUSSÃO

As substâncias antimicrobianas agem sobre os microrganismos de duas maneiras: provocando sua morte — ação bactericida, ou inibindo seu crescimento — ação bacteriostática.

A adição de substâncias neutralizadoras ao meio de cultura, tem sido o método empregado para se fazer uma distinção entre ação bacteriostática e bactericida, na avaliação da atividade do desinfetante, conforme demonstram as pesquisas efetuadas por QUISNO e cols., 1946; ERLANDSON e LAWRENCE, 1953; MILLER e cols., 1973.

Os resultados de nossas experiências demonstram a ação neutralizadora do caldo Lethen, preparado com lecitina de soja não purificada, sobre os desinfetantes à base de fenol e de amônio quaternário, nas diluições em que eles mostraram alguma atividade antimicrobiana. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por QUISNO e cols. (1946), para a ação neutralizadora do caldo Lethen sobre sais de amônio quaternário, e, com aqueles obtidos por ERLANDSON e LAWRENCE (1953), para a ação neutralizadora de tween 80 sobre desinfetantes fenólicos.

O Duo Cide Sp mostrou-se ativo até uma diluição de 1/5000, entretanto, o aparecimento de uma turbidez pouco caracterizada e a presença de cocos esparsos na análise microscópica das diluições 1/20.000 e 1/40.000, sugerem que nestas concentrações ele seria um bacteriostático. O resultado positivo da cultura em ágar simples destas diluições, reforçam esta suposição. As diluições 1/1000, 1/1500, 1/2000 e 1/5000, do Duo Cide Sp, demonstram ação bactericida, pois a cultura em ágar simples e em caldo simples foi negativa para estas diluições.

O Germopol e Duplofen apresentaram atividade antibacteriana na diluição 1/200; este resultado concorda parcialmente com os de ERLANDSON e LAWRENCE (1953), para desinfetantes fenólicos. O não crescimento de microrganismos na cultura em ágar simples e em caldo simples, sugerem que estes desinfetantes teriam ação bactericida em diluições menores que 1/200. Nas diluições 1/500, 1/1000 e 1/1500, o crescimento de microrganismos foi baixo. Tal fato pôde ser comprovado pela turbidez não característica do meio, e pela presença de poucos cocos no exame microscópico. Além disso, o crescimento foi positivo para a cultura em ágar simples destas diluições, o que sugere uma ação bacteriostática.

Os resultados da ação neutralizadora da lecitina e tween 80 sobre a atividade antimicrobiana dos desinfetantes fenólicos e de amônio quaternário, confirmam o emprego destas substâncias na avaliação do potencial e do modo de ação de desinfetantes deste tipo, bem como o uso do Lethen ágar nas pesquisas sobre contaminação e infecção hospitalar mesmo utilizando-se lecitina de soja não purificada, na preparação deste

meio. Todavia, os resultados para as concentrações onde os desinfetantes testados exerceriam ação bactericida ou bacteriosstática, indicam a necessidade de mais pesquisas, através de repetições do teste e da realização de diferentes diluições.

Recebido para publicação em 8-3-88

BIBLIOGRAFIA

- BRANSON, D. Methods in clinical bacteriology. Illinois, Charles C. Thomas. Publischer, 1972.
- BRUMMER, B. Influence of possible desinfetant transfer on *Staphylococcus aureus* plate counts after ágar contact sampling. Applied and Environmental Microbiology, **32**(1): 80-84, 1976.
- ERLANDSON, A. L. Jr. and LAWRENCE, C. A. Inativating medium for hexachlorophene (G.11) types of compounds and some substituted phenolic desinfetantes. Science, **153**: 274-276, 1953.
- MILLER, C. H. e col. Bactericidal efficiency of some antimicrobial chemicals. J. dent. Res., **52**: 184, 1973.
- QUISNO, R. e cols. A neutralizing medium for evaluating the germidal potency of the quaternary ammonium salts. American Journal Pharmacy, **118**: 320-323, 1946.
- VESLEY, D. and MICHAELSEN, G. S. Application of a surface sampling technic to the evaluation of bacteriological effectiveness of certain hospital howsekeeping procedures. Healch Laboratory Science, **1**: 107-113, 1964.
- VESLEY, D. e col. A cooperative microbiological evaluation of floor - cleaning procedures in hospital patient rooms Healch Laboratory Science, **7**: 256-264, 1970.