



AValiação Antifúngica do Álcool 70% e Hipoclorito de Sódio 2% em Superfícies de Empresa Ambiental no Estado da Bahia, Brasil

GEISA LOUISE MOURA COSTA; ERICA LIMA FERREIRA; JULIANA POSSATTO FERNANDES TAKAHASHI;

RESUMO

Os fungos estão presentes em todos os ambientes, sobretudo superfícies, e muitos são potenciais patógenos ao ser humano, como agentes de alergias, micoses e infecções invasivas. Sabendo dos riscos da presença desses microrganismos no ambiente, este trabalho avaliou a ação fungicida do álcool 70% e do hipoclorito 2% em superfícies de bancadas em uma empresa de análises ambientais no estado da Bahia, Brasil. Para isso, foi feito o atritamento de *swabs* em 100cm² de área para cada tratamento – um para álcool 70% e outro para hipoclorito 2%. Em seguida, esses *swabs* foram inseridos em meio BHI, por 24 horas a $\pm 35^{\circ}\text{C}$. As amostras foram inoculadas em meio de cultura Ágar Batata Dextrose e incubados invertidos a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. As colônias foram quantificadas e descritas morfológicamente após observação dos indivíduos macro e microscopicamente – essa realizada por meio da técnica de fita adesiva e coloração com azul de algodão. O resultado desse trabalho mostrou que a maioria das placas não houve crescimento fúngico após uso dos sanitizantes. Além do mais, os resultados de eficiência e do teste t de *Student*, indicaram que ambos os desinfetantes utilizados foram eficazes contra os fungos, sem haver uma diferença significativa entre eles. Muitos bolores apresentaram micélio estéril, porém, fungos dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp. foram identificados. Por fim, notou-se a necessidade de continuidade das práticas laboratoriais e do monitoramento de ambientes empresariais onde há uma constante rotatividade de pessoas e amostras. E, para isso, é imprescindível a criação de um manual que padronize a quantidade limite de fungos em superfícies empresariais e a identificação dos microrganismos, no mínimo a nível de gênero, para um diagnóstico exato do ambiente estudado que guiará as medidas precisas de desinfecção.

Palavras-chave: Microbiologia; Desinfetantes; Fungos; *Aspergillus*; *Trichoderma*.

INTRODUÇÃO

Os fungos anemófilos são seres que podem ser transportados facilmente, pois propagam seus esporos pelo ar. Isso permite que o microrganismo se distribua para outros ambientes por meio das partículas de poeira e gotículas de água, depositando-se sobre materiais de uso comum e superfícies, sobrevivendo por muito tempo (ROGAWANSAMY *et al.*, 2015).

Outro fator para dispersão dos esporos é a rotatividade de pessoas e materiais, pois esses podem ser transportados pelas solas dos sapatos e, sobretudo, as mãos (ABREU *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013). Por isso, é importante evitar que as superfícies se tornem fontes de contaminação, principalmente em uma empresa, para preservar a saúde dos colaboradores e manter a integridade das amostras manipuladas (GALLANDAT *et al.*, 2021).

Para reduzir as cargas fúngicas das superfícies, é muito comum o uso de desinfetantes químicos de nível intermediário, pois eles eliminam bactérias, a maioria dos fungos e vírus lipídicos (SOLON; KILLEEN, 2018). O álcool 70% e o hipoclorito 2% são exemplos de sanitizantes com essas características, ambos têm baixa toxicidade, fácil manuseio, baixo custo

e ação rápida (ROGAWANSAMY *et al*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015).

Dessa forma, após conhecer a fácil disseminação fúngica, a ação dos desinfetantes e notar a baixa produção de trabalhos que estudem a ação desses sanitizantes contra fungos de superfície, o objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar a eficiência do álcool 70% e do hipoclorito 2% contra o crescimento de fungos de superfícies em bancadas de uma empresa ambiental no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Área de estudo

Os experimentos ocorreram em superfícies esmaltadas dos laboratórios de uma empresa com foco ambiental no Brasil, entre os meses de outubro e novembro de 2019. O local para realização do estudo recebe diariamente amostras, desde águas para consumo humano e sistemas de saúde até águas residuais, para análise de diferentes parâmetros.

1.2 Delineamento amostral

Tendo como base as orientações da Associação Brasileira de Cosmetologia (2017), por ausência de guias especializados na temática, os pontos de coleta foram delimitados por dois quadrantes adjacentes de 10 cm x 10 cm, totalizando uma área de 100 cm² para cada quadrante. Para este estudo foram selecionadas salas onde a superfície da bancada era de material não-poroso.

Para cada sala foram coletadas da bancada 3 amostras: controle, comparativo e experimental. Os locais selecionados não deviam apresentar matéria orgânica que precisasse ser removida com água e sabão ou qualquer outro método de higienização prévia. Ao final, um total de 17 salas foram selecionadas para coleta de amostras.

A classificação das amostras foi orientada de acordo com o estudo de Graziano *et al.* (2013): amostras de controle positivo, tratamento 1 e tratamento 2. As do grupo controle positivo foram coletadas sem limpeza prévia, para confirmação da presença dos microrganismos. E as coletas de ambos os tratamentos foram feitas após a aplicação desinfetante e fricção deste sobre a superfície durante 30 segundos. O tratamento 1 foi para o uso do álcool 70% e o tratamento 2 para o hipoclorito 2%. A escolha do quadrante para a aplicação do sanitizante foi aleatória.

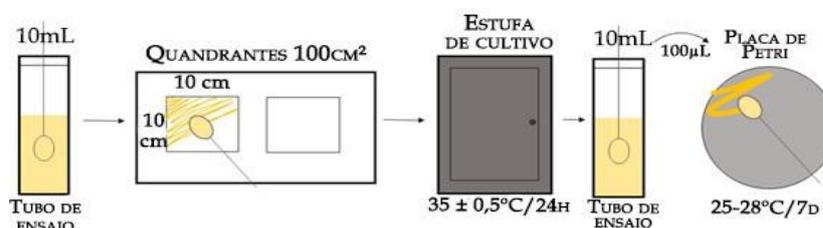
As análises dos experimentos foram realizadas no laboratório de microbiologia instalado na própria empresa onde as amostras foram coletadas.

1.3 Procedimento

Os materiais microbiológicos das bancadas foram coletados por meio de esfregaços de *swab* umedecido com meio BHI. O *swab* foi inserido no tubo de ensaio contendo 10 mL do caldo e este encaminhado para a estufa a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, para recuperação dos fungos coletados.

Após 24 horas, sob o fluxo laminar, pipetou-se 100 µL da amostra sobre o meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) em placa de Petri esterilizada, em seguida esgotou-se o *swab* do tubo respectivo sobre o meio, o qual continha ácido tartárico 10% esterilizado, para evitar o crescimento de bactérias. As placas foram envolvidas com folhas de alumínio e armazenadas em posição invertida em temperatura ambiente a 25-28 °C, por 7 dias (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Esquema de representação das coletas. Fonte: criação a partir do *software* PowerPoint.



O resultado da contagem de colônias foi expresso em UFC/cm², obtido com a seguinte fórmula (CARDOSO; MIGUEL; PEREIRA, 2011):

$$UFC/cm^2 = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias}}{x \ 10} \cdot 10^{-1} \quad / \text{ Área amostrada}$$

Onde:

Nº de Colônias = quantidade de UFC na placa;

10 = inverso do volume inoculado;

10⁻¹ = volume da diluição.

Após a contagem e descrição morfológicas das colônias de bolores e leveduras, os fungos filamentosos foram submetidos à técnica de fita adesiva e coloração com azul de algodão para caracterização fenotípica por meio da observação microscópica do micélio reprodutivo. E nesse trabalho, somente as placas com presença de bolores e leveduras foram incluídas.

1.4 Análise de Dados

A quantidade de UFC recuperadas, em cada sala analisada, foi tabulada com o programa Excel. E a comparação entre as amostras do tratamento 1 e 2 foram realizadas por meio do teste estatístico t de *Student* com o software Past.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado total de amostras foi de 51 placas de Petri, entre as quais 15 apresentaram crescimento de bolores e leveduras. Dessas amostras positivas, 12 foram confirmativas para o grupo de controle positivo. Duas amostras tiveram presença de UFC após a descontaminação com álcool 70% e uma após a limpeza com hipoclorito 2% (TABELA 1).

TABELA 1 - Salas com placas positivas para fungos e quantidade de UFC/cm² nas amostras

Salas	Placas			Salas	Placas		
	CP	T1	T2		CP	T1	T2
Recepção	0	1	1	Microbiologia Sala De Análises 2	0	1	0
Administrativo 1	0,5	0	0	Físico-Químico Sala Quente	13	0	0
Administrativo 2	3,5	0	0	Físico-Químico Cromatografia	264	0	0
Gerência	0,5	0	0	Físico-Químico Descarte	0,5	0	0
Auditório	0,5	0	0	Físico-Químico Análises Diretas	211	0	0
Microbiologia Sala Principal	3,5	0	0	Físico-Químico DBO	2	0	0
Microbiologia Sala De Análises 1	1	0	0	Amostragem Arrumação De Coleta	7,5	0	0

Controle positivo (CP), tratamento 1 (T1) e tratamento 2 (T2)

Apesar de três amostras apresentarem crescimento fúngico, pode-se inferir que os desinfetantes foram eficazes contra os organismos, pois a UFC/cm² de cada amostra foi abaixo do limite tolerável de 4 UFC/cm². Além disso, tanto o álcool 70% quanto o hipoclorito 2% tiveram eficiência de 100%, acima do percentual mínimo de eficiência de 85% (PDS/HPPC, 2015). Esse resultado comparativo se confirma com a análise estatística, a qual mostrou que não houve diferença significativa na ação microbicida entre os sanitizantes ($p = 0,33 > 0,05$).

Esse resultado para o álcool 70% fora semelhante ao observado por Graziano *et al.* (2013) e por outros pesquisadores (ROGAWANSAMY *et al.*, 2015; CDC, 2019). Quanto ao do hipoclorito 2%, os resultados assemelharam-se aos de Perez, Springthorpe e Sattar (2005) e aos do Centers of Disease Control and Prevention (CDC) (2019).

A presença de placas com UFC após tratamento com álcool 70% e hipoclorito 2%, pode ser explicada pela possível maior resistência das leveduras e esporos à ação dos desinfetantes (CARVALHO, 2010; FERNANDO *et al.*, 2014; SOLON; KILLEEN, 2018).

A razão para a ausência de UFC nas placas de controle positivo de pontos amostrais pode ter sido ocasionada pela quantidade insuficiente de microrganismos no inóculo ou pelo tempo de incubação insuficiente para baixar o estresse desses (BRASIL, 2013).

A maior quantidade de UFC/cm² encontrada foi em pontos amostrais onde não ocorrem análises microbiológicas (TABELA 1). Isso pode ser explicado pela menor preocupação em manter essas superfícies higienizadas, se comparado às salas do laboratório de microbiologia. No entanto, é essencial manter esses ambientes regularmente higienizados para evitar a contaminação cruzada e transporte passivo entre superfície, amostra e indivíduo, sobretudo durante a organização de materiais para coleta (TABELA 1) (CESÁRIO; LIRA; HINRICHSEN, 2012).

A presença de UFC de bolores foi maior que a de leveduras. Das 1017 UFC encontradas, foram quantificadas 27 (2,65%) leveduras. E as observações microscópicas revelaram presença de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp., no entanto a maioria dos bolores apresentaram micélio estéril (FIGURA 2).

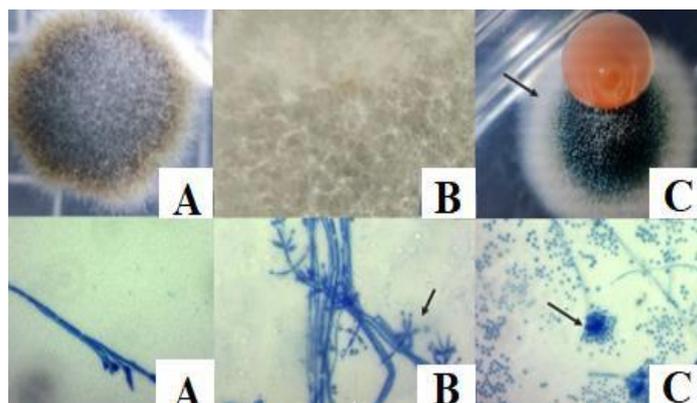


FIGURA 2 - Exemplo de bolores encontrados em placas de Ágar Batata Dextrose e suas respectivas estruturas reprodutivas. A – Morfologia macroscópica (cima) e microscópica (aumento de 400x) (baixo) de bolor estéril; B – Morfologia macroscópica e microscópica de um bolor do gênero *Trichoderma* sp., respectivamente; C – Morfologia macroscópica e microscópica de um bolor do gênero *Aspergillus* sp. Fonte: acerto pessoal e unidas no software PowerPoint.

O gênero *Aspergillus* sp. têm espécies micotoxigênicas e patogênicas responsáveis por causar doenças respiratórias, alergias e micoses, que podem se expressar quando o indivíduo está imunodeprimido (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017; FENNELLY, 2020). Esse gênero é um dos maiores causadores de mortes por infecções fúngicas, sobretudo em imunocomprometidos (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017). Seus esporos podem contaminar amostras, humanos, animais, alimentos e comprometer diagnósticos (GOODALE; OUTERBRIDGE; WHITE, 2016; TANIWAKI; PITT; MAGAN, 2018).

Quanto ao gênero *Trichoderma* sp., descobriu-se que ele antagoniza o crescimento de outros fungos. Assim, ele tem sido estudado como agente de controle biológico de fitopatógenos e promotor de crescimento e produtividade de vegetais (SILVA *et al.*, 2015; CHAGAS *et al.*, 2017). Com as referências citadas nesse trabalho, não há estudos que relatem casos de doenças ou infecções relacionadas ao gênero.

CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que os desinfetantes cumpriram sua função antifúngica, sem haver diferença significativa entre eles. Incentiva-se, então, a continuidade dos métodos de desinfecção utilizados e o biomonitoramento dos ambientes, a fim de evitar interferências à saúde humana e às amostras analisadas.

Por fim, ressalta-se a importância do estudo de resistência fúngica a saneantes, tendo em vista a presença de colônias em placas após a descontaminação. E a necessidade da padronização no limite de UFC/cm² em superfícies de empresas com foco ambiental, além da elaboração de um manual de controle higiênico-sanitário, para que estes documentos guiem novos trabalhos que relacionem os fungos de superfície e os sanitizantes.

REFERÊNCIAS

ABREU, E. S. de. *et al.* Análise Microbiológica de Mãos de Manipuladores de Alimentos do Município de Santo André. **Revista Univap**, São Paulo, v. 17, n. 30, 2011.

ALMEIDA C. B. *et al.* Eficácia dos Desinfetantes Quanto ao Controle Microbiológico. **Revista Científica UNILAGO**, São José do Rio Preto, v.1, n.1, p.309-16, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COSMETOLOGIA. **Guia ABC de Microbiologia**. 5. ed.

São Paulo: Pharmabooks, 2017.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 8: Detecção e identificação dos fungos de importância médica. Brasília: Anvisa, 2013. Disponível em:<
http://ccihadm.med.br/legislacao/Microbiologia_clinica_ANVISA___Deteccao_e_identificacao_de_fungos.pdf>. Acesso em out. 2019.

CARDOSO, M. F.; MIGUEL V.; PEREIRA, C. A. M. Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação em Panificadoras. **Alim. Nutr**, Curitiba, v.22, n.2, p.2011-17, 2011. CARVALHO, I. T. de. **Microbiologia Básica**. Recife: EDUFPRPE, 108 p. 2010.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008**. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. 2019. Disponível Em:<<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2019.

CESÁRIO, A.; LIRA, M. da C.; HINRICHSEN, S. L. O ambiente e a transmissão de infecções relacionadas à assistência à saúde. In: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Brasília: Anvisa, p. 15-18, 2012.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* Trichoderma na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.4, n.3, p.97-102, 2017.

CHOWDHARY, S.; SHARMA, C. ; MEIS, J. F. Azole-resistant aspergillosis: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **J Infect Dis**, v. 216, n.3, p.436-44, 2017.

FENNELLY, K. P. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. **Lancet Respir Med**, v.8, n.9, p.914-24, set. 2020.

FERNANDO, F. S. L de. *et al.* Álcool Etilico: Análise da Ação Desinfetante sobre Leveduras Presentes em Colchões Hospitalares. **Rev enferm UFPE**, Recife, v. 8, n. 5, p. 1273-83, 2014.

GALLANDAT, K. *et al.* A systematic review of chlorine-based surface disinfection efficacy to inform recommendations for low-resource outbreak settings. **Am J Infect Control**, v.49, n.1, p.90-103, jan. 2021.

GOODALE, E.C.; OUTERBRIDGE, C. A.; WHITE, S.D. Aspergillus otitis in small animals — a retrospective study of 17 cases. **Vet Dermatol**, v. 27, n.1, p.3-8, 2016.

GRAZIANO, M. U. *et al.*, 2013. Eficácia da Desinfecção com Álcool 70% (p/v) de Superfícies Contaminadas sem Limpeza Prévia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, n.3, 2013.

PDS/HPPC - Programa de Desenvolvimento Setorial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Guia de Microbiologia: Controle Microbiológico na Indústria de Higiene**

Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. ed. 1. São Paulo, 2015 [acesso 2019 nov 06]. Disponível em: <https://abihpec.org.br/guia-microbiologia/files/assets/basic-html/index.html#1>

PEREIRA, S. S. P., *et al.* Desinfecção com hipoclorito de sódio em superfícies ambientais hospitalares na redução de contaminação e prevenção de infecção: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 681-688, 2015.

PEREZ, J.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental. **Am J Infect Control.**, v. 33, n. 6, p. 320-5, 2005.

ROGAWANSAMY, S. *et al.* An Evaluation of Antifungal Agents for the Treatment of Fungal

Contamination in Indoor Air Environments. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 12, p. 6319-6332, 2015.

SILVA, G. B. P. da. et al. Identificação e Utilização de *Trichoderma* spp. Armazenados e Nativos no Biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 4, p. 33 – 42, 2015.

SOLON J.G.; KILLEEN S. Decontamination and sterilization. **Surg**, v.37, n.1, p.51-7, jan. 2019.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J. I.; MAGAN, N. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Curr Opin Food Sci**, v. 23, n.1, p. 38-43, out. 2018.