<https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n2a512.1-4>

Ação do cloreto de benzalcônio frente ao vírus de influenza e Newcastle

Rogério Frozza^{1*}, Cesar Bado², Ana Serapião Caselles³

¹Médico Veterinário especialista em avicultura. Florianópolis – SC.

²Médico Veterinário especialista em suinocultura. Ijuí – RS.

³Médica Veterinária gerente técnica Sanphar Saúde Animal. Campinas – SP.

*Autor para correspondência, E-mail: frozza.rogerio@gmail.com

Resumo. O cloreto de benzalcônio é um desinfetante catiônico com atividade surfactante e efeito bactericida sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungicida e viricida para vírus envelopados e pertence ao grupo dos compostos de quaternário de amônia, amplamente utilizados em avicultura. Neste estudo foi avaliado a ação do cloreto de benzalcônio, um quaternário de amônia de primeira geração, frente aos vírus de Influenza H1N2 e vírus de Doença de Newcastle⁷ na diluição de 1:1000, sem adição de matéria orgânica e tempo de contato de 15 minutos. O ensaio demonstrou eficácia do Germon 50[®] frente aos vírus de Influenza H1N2 e Doença de Newcastle sem exercer efeito tóxico para o embrião.

Palavras-chave: Bioseguridade, cloreto de benzalcônio, viricida

Action of benzalkonium chloride before H1N2 virus and Newcastle

Abstract. Benzalkonium chloride is a cationic disinfectant with surfactant activity and bactericidal effect on Gram positive, Gram negative, fungicidal and viricidal bacteria on enveloped viruses and belongs to the group of quaternary ammonium compounds widely used in poultry. In this study was available the action of benzalkonium chloride, a first-generation ammonium quaternary, against H1N2 influenza viruses and Newcastle disease virus at a 1: 1000 dilution, without addition of organic matter and contact time of 15 minutes. The trial showed efficacy of Germon 50[®] against H1N2 Influenza and Newcastle disease viruses without exerting an embryo-toxic effect.

Keywords: biosecurity, benzalkonium chloride, viricidal

Acción del cloruro de benzalconio ante el virus de H1N2 y Newcastle

Resumen. El cloruro de benzalconio es un desinfectante catiónico con actividad tensioactivo y efecto bactericida sobre bacterias grampositivas, gramnegativas, fungicidas y viricidas para virus envelopados y pertenencia al grupo de compuestos cuaternarios de amoníaco ampliamente utilizados en la producción avícola. En este estudio, se evaluó la acción del cloruro de benzalconio, un cuaternario de amoníaco de primera generación, contra los virus de la gripe H1N2 y el virus de la enfermedad de Newcastle en dilución de 1:1000, sin la adición de materia orgánica y tiempo de contacto de 15 minutos. El ensayo mostró eficacia de Germon 50[®] frente a los virus de la gripe H1N2 y la enfermedad de Newcastle sin ejercer efecto tóxico sobre el embrión.

Palabras clave: Bioseguridad, benzalconio cloruro, viricidal

Introdução

Os compostos de quaternário de amônia (QACs) são bioativos catiônicos com poder surfactante, foram introduzidos no final da década de 1930 e desde então são frequentemente utilizados como

detergentes e desinfetantes na produção avícola ([Luyckx, 2016](#); [Maertens et al., 2019](#); [Tezel & Pavlostathis, 2012](#); [Zhang et al., 2015](#)). A estrutura básica dos QACs contempla duas regiões definidas, sendo um átomo central de nitrogênio ligado covalentemente a quatro grupos funcionais por meio de carga positiva, formando a região catiônica e outra região denominada aniônica, carregada negativamente onde geralmente o cloro (Cl⁻) ou bromo (Br⁻) se liga ao nitrogênio, completando a estrutura molecular ([Al-Adham et al., 2013](#); [Gerba, 2015](#); [Mulder et al., 2018](#)). Para a boa atividade antimicrobiana é requisito que ao nitrogênio esteja ligado uma cadeia alquila de comprimento de C8 a C18 ([Al-Adham et al., 2013](#); [Gerba, 2015](#); [Gorman & Scott, 2004](#); [Mulder et al., 2018](#)).

Desinfetantes desta classe são bactericidas contra formas planctônicas e biofilme, bactérias Gram negativas e Gram positivas, fungos e vírus envelopados ([Oblak et al., 2019](#); [Perinelli et al., 2019](#); [Rutala & Weber, 2008](#)). O pH ideal para ação dos QACs é neutro a ligeiramente alcalino ([Al-Adham et al., 2013](#); [Gorman & Scott, 2004](#); [Grezzi, 2008](#); [Morgulis & Spinosa, 2005](#)).

Neste contexto o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade viricida do Germon 50[®] desinfetante a base de cloreto de benzalcônio (BAC) pertencente a primeira geração do QACs frente a vírus de Influenza H1N2 e vírus de Newcastle.

Material e métodos

O Germon 50[®] foi testado frente aos vírus de Influenza H1N2 isolado de campo, de acordo com o protocolo interno 131/17 e vírus vacinal La Sota de Newcastle (Anexo 2). O ensaio ocorreu sem adição de matéria orgânica e com tempo de contato entre desinfetante e vírus de 15 minutos, para ambos os vírus. A prova de eficácia foi realizada no Laboratório Laudo, seguindo a metodologia interna POP 336 adaptada da AOAC 960.09 que descreve e normatiza os procedimentos de execução de teste de eficácia de desinfetantes ([Principle, 1998](#)).

A solução desinfetante foi preparada em solução salina estéril a 0,85% na dosagem acima descritas. Uma alíquota de 0,1 mL sem os respectivos vírus foi inoculada em ovos embrionados de 9 dias de incubação para controle de embriotoxicidade. O objetivo desta etapa é avaliar possíveis efeitos tóxicos sobre os embriões em decorrência da atividade do Germon 50[®]. Para qualquer efeito tóxico constatado o ensaio não terá validade.

Na etapa seguinte do ensaio os agentes foram retirados do nitrogênio, descongelados em temperatura ambiente durante 5 minutos, padronizados para 100.000 unidades virais/mL, para o vírus de Newcastle e 100.000 unidades virais/mL para o vírus de Influenza H1N2. Em seguida foram adicionados em seus respectivos tubos com 5 mL de solução salina a 0,85% com desinfetante previamente preparado na dosagem desejada para prova de suspensão. Os tubos foram homogeneizados e o tempo de contato cronometrado. Ao fim do tempo de contato uma alíquota de 100 microlitros (µL) de cada suspensão com agentes e desinfetante foram transferidas para seus respectivos tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,85% estéril, em seguida homogeneizados no vortex, e novamente uma alíquota de 0,1 mL para vírus de Influenza e vírus de Newcastle foram inoculados em ovos embrionados de galinha “Specific Pathogen Free” (SPF).

Para esta prova de eficácia também foi realizado uma solução de controle positivo de solução salina a 0,85% contendo apenas os agentes virais devidamente padronizados. Desta solução controle foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada em ovos embrionados de 9 dias, para avaliar a atividade viral sobre o substrato de cultivo.

Para validade do ensaio foi levado em consideração a atividade viral no controle positivo, (sem desinfetante) e ausência total de qualquer interferência do Germon 50[®] na viabilidade dos embriões garantindo a ausência de embriotoxicidade.

A avaliação e interpretação dos resultados da eficácia do produto foram baseados nos títulos hemaglutinantes de líquido corioalantóide e mortalidade embrionária pela técnica de ovoscopia.

Resultados

Os resultados de Hemaglutinação (HA) realizados em líquido corioalantóide foram negativos e a integridade dos embriões que receberam alíquota de Germon 50[®] e com vírus Influenza H1N2 e vírus

da Doença de Newcastle foi preservada conforme observado pela técnica de ovoscopia, comprovando a efetividade do desinfetante pela ausência de atividade viral em ambos os indicadores.

Para as provas de validação do ensaio, a técnica de ovoscopia demonstrou atividade normal do embrião em que recebeu somente a solução desinfetante, comprovando a ausência de embriotoxicidade e para o controle viral onde foi inoculado somente os vírus em membrana corioalantóide de acordo com o descrito no material e métodos, os agentes causaram mortalidade embrionária e o HA de líquido corioalantóide mostrou aglutinação entre hemácias e os vírus do estudo, comprovando a presença.

Discussão

Desinfetantes são agentes químicos empregados na redução de micro-organismos em superfícies de diferentes ambientes e sua atividade antimicrobiana ocorre de duas formas: inibindo o crescimento (bacteriostático, fungistático), ação letal (bactericida, viricida) e desta forma os QACs são amplamente utilizados em granjas de aves associado a programas de limpeza e desinfecção e são importantes na prevenção e controle da transmissão de agentes infecciosos dentro e entre os lotes ([Ito et al., 2002](#); [Maertens et al., 2019](#); [Song et al., 2019](#)). O cloreto de benzalcônio (BAC) pertence ao grupo dos QACs e graças a sua conformação estrutural ou seja, parte hidrofílica e parte hidrofóbica, é possível a interação com micro-organismos e sua atividade antimicrobiana está intimamente relacionada as suas propriedades surfactantes ([Lukáč et al., 2010](#); [Muehler et al., 2017](#); [Oblak et al., 2019](#)).

De modo geral a parte hidrofóbica é incorporada à bicamada lipídica da membrana e interage com os fosfolipídios eletrostaticamente negativos inibindo ou desnaturando as membranas celulares, em seguida extravasa os componentes essenciais e eventual lise, consequentemente exercendo seu efeito bactericida, fungicida e ou viricida para vírus envelopados ([Oblak et al., 2019](#); [Walia et al., 2017](#)).

Embora o mecanismo de ação pelo qual o BAC inativa vírus envelopado não está bem elucidado, como agentes ativos de superfície são rapidamente adsorvidos pelas proteínas virais e a inativação viral pode ocorrer alterações de componentes de superfície ou em receptores que interagem com as células hospedeiras ([Figuerola et al., 2017](#); [Wood & Payne, 1998](#)). Para [Gerba \(2015\)](#) são capazes interagir com alvos intracelulares e ligar-se ao DNA e algumas formulações são eficazes contra vírus não envelopados.

Vários autores comprovaram a eficácia do BAC frente a vírus envelopado. [Wainberg et al. \(1990\)](#) comprovaram o que o BAC inibiu a atividade da transcriptase reversa do vírus HIV-1. O estudo de [Wood & Payne \(1998\)](#) mostraram que o BAC alterou componentes da superfície viral tornando-o incapaz de ligar-se as células do hospedeiro. [Lazzaro et al. \(2009\)](#) demonstraram por imunofluorescência a lise viral causada pelo BAC.

Conclusão

O presente estudo comprovou que desinfetante Germon 50® a base de cloreto de benzalcônio foi eficaz frente aos vírus de Influenza H1N2 e vírus de Newcastle na dosagem de 1:1000 e seu efeito viricida não interferiu na viabilidade embrionária. Com base nestas informações o Germon 50® pode ser alternativa eficaz e de custo acessível para uso em programas de higienização de instalações.

Referências bibliográficas

- Al-Adham, I., Haddadin, R. & Collier, P. (2013). Types of microbicidal and microbi-static agents. In H. Russel (Ed.), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. Iowa, USA: Wiley Blackwell.
- Figuerola, A., Hauck, R., Saldias-Rodriguez, J. & Gallardo, R. A. (2017). Combination of quaternary ammonia and glutaraldehyde as a disinfectant against enveloped and non-enveloped viruses. *Journal of Applied Poultry Research*, 26(4):491-497.
- Gerba, C. P. (2015). Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2):464-469.
- Gorman, S. & Scott, E. (2004). Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology* 285-305.
- Grezzi, G. (2008). Limpeza e desinfecção na avicultura. Ergomix.

- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K. Tsuji, K. (2002). NOD/SCID/ γ c null mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(9):3175-3182.
- Lazzaro, D. R., Abulawi, K. & Hajee, M. E. (2009). In vitro cytotoxic effects of benzalkonium chloride on adenovirus. *Eye & Contact Lens*, 35(6):329-332.
- Lukáč, M., Lacko, I., Bukovský, M., Kyselová, Z., Karlovská, J., Horváth, B. & Devínsky, F. (2010). Synthesis and antimicrobial activity of a series of optically active quaternary ammonium salts derived from phenylalanine. *Central European Journal of Chemistry*, 8(1):194-201.
- Luyckx, K. (2016). *Evaluation and implication of cleaning and disinfection of broiler houses and pig nursery units*. Ghent University.
- Maertens, H., De Reu, K., Meyer, E., Van Weyenberg, S., Dewulf, J. & Van Coillie, E. (2019). Exposure of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* broiler isolates to subinhibitory concentrations of a quaternary ammonium compound does not increase antibiotic resistance gene transfer. *Poultry Science*, 98(7):2972-2976.
- Morgulis, M. S. F. A. & Spinosa, H. S. (2005). Antimicrobianos: desinfetantes. In J. Palermo-Neto, H. S. Spinosa & S. L. Górniak (Eds.), *Farmacologia aplicada à avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos*. São Paulo, Brasil: Editora Rocca Ltda.
- Muehler, D., Sommer, K., Wennige, S., Hiller, K.-A., Cieplik, F., Maisch, T. & Späth, A. (2017). Light-activated phenalen-1-one bactericides: efficacy, toxicity and mechanism compared with benzalkonium chloride. *Future Microbiology*, 12(14):1297-1310.
- Mulder, I., Siemens, J., Sentek, V., Amelung, W., Smalla, K. & Jechalke, S. (2018). Quaternary ammonium compounds in soil: implications for antibiotic resistance development. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(1):159-185.
- Oblak, E., Piecuch, A., Rewak-Soroczyńska, J. & Paluch, E. (2019). Activity of gemini quaternary ammonium salts against microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2):625-632.
- Perinelli, D. R., Petrelli, D., Vitali, L. A., Bonacucina, G., Cespi, M., Vllasaliu, D. & Palmieri, G. F. (2019). Quaternary ammonium leucine-based surfactants: The effect of a benzyl group on physicochemical properties and antimicrobial activity. *Pharmaceutics*, 11(6):1-11.
- 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. (2008). *Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities*, 2008.
- Song, X., Vossebein, L. & Zille, A. (2019). Efficacy of disinfectant-impregnated wipes used for surface disinfection in hospitals: a review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1):1-14.
- Tezel, U. & Pavlostathis, S. G. (2012). Role of quaternary ammonium compounds on antimicrobial resistance in the environment. *Antimicrobial Resistance in the Environment*, 33349-387.
- Wainberg, M. A., Spira, B., Bleau, G. & Thomas, R. (1990). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 in tissue culture fluid and in genital secretions by the spermicide benzalkonium chloride. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(1):156-158.
- Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Grant, J., Leonard, F. C., Lawlor, P. G. & Duffy, G. (2017). 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*, 24664-71.
- Wood, A. & Payne, D. (1998). The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. *Journal of Hospital Infection*, 38(4):283-295.
- Zhang, C., Cui, F., Zeng, G.-m., Jiang, M., Yang, Z.-z., Yu, Z.-g. & Shen, L.-q. (2015). Quaternary ammonium compounds (QACs): a review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Science of the Total Environment*, 518352-362.

Recebido: 25 de setembro, 2019.

Aprovado: 15 de novembro, 2019.

Publicado: 21 de março, 2020.

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.