

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E QUANTIFICAÇÃO DE CLORIDRATO DE POLIHEXAMETILENO BIGUANIDA (P.H.M.B) EM TECIDOS MUSCULARES E VÍSCERAS DE FRANGOS ¹

Albenones José de Mesquita², Moacir Evandro Lage²,
Guilherme Roberto de Oliveira² e Cristiano Sales Prado²

ABSTRAT

Antibacterial Activity and Quantification of Polyhexamethylene Biguanide Hydrochloride in Muscular Tissues and Viscera of Boilers

Trials were carried out in order to check out the viability of polyhexamethylene biguanide hydrochloride in the control of pathogenic and degenerating bacteria in carcass of chicken, as well as a spectrophotometric monitoring of the residual content of this polymer in the carcasses and viscera of chicken quenched with biguanid. The sanitizing power of this substance was high, although the previous analysis point out to the inefficacy of the residual monitoring method, due to the action of interferings.

KEY WORDS: Polyhexamethylene biguanide hydrochloride, carcass of chicken, sanitizer.

RESUMO

Nos últimos anos, na procura de princípios sanitizantes ativos, certos polímeros sintéticos ou naturais modificados mereceram atenção especial por possuir uma ação antimicrobiana mais elevada, definida e por apresentar toxicidade reduzida, o que os tornam potencialmente úteis como sanitizantes nas indústrias alimentícias, onde se exigem condições higiênico-sanitárias satisfatórias. Nesta comunicação, foram ensaiados métodos para a viabilização do cloridrato de polihexametileno biguanida no controle de bactérias patogênicas ou deteriorantes em carcaças de frango, bem como um monitoramento espectrofotométrico do teor residual deste polímero nessas carcaças e vísceras de frangos dessedentados com biguanida. O poder sanitizante dessa substância foi elevado, no entanto as análises preliminares sugerem a ineficácia do método de monitoramento residual, devido à atuação de interferentes.

PALAVRAS-CHAVE: Cloridrato de polihexametileno biguanida, carcaça de frango, sanitizante.

1 - Entregue para publicação em abril de 1997.

2 - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. C. P. 131. CEP . 74.001-970. Goiânia - Goiás.

INTRODUÇÃO

A necessidade crescente de condições higiênico-sanitárias satisfatórias nos mais diversos setores e produtos industriais, em que a proteção contra bactérias patogênicas ou deteriorantes se faz necessária, tem exigido estudos no sentido de se conseguir substâncias sanitizantes com poder bactericida cada vez maior em relação às atualmente empregadas, segundo May (s.d.) Entretanto, nas diversas áreas das indústrias alimentícias (fábrica de laticínios, estabelecimentos de abate das espécies de açougue, etc), onde há consumo direto dos produtos pela população, exigências para essas novas espécies químicas se fazem necessárias, além da maior eficácia antibacteriana já mencionada. Essas formas químicas devem ser adequadas comercialmente (soluções, dispersões, suspensões, etc) de modo a obter o efeito desejado com a menor toxicidade possível, quando comparada com os desinfetantes atualmente comercializados.

Certos polímeros sintéticos, bem como alguns polímeros naturais modificados, possuem propriedades antimicrobianas que os tornam potencialmente úteis como agentes de controle de microrganismos (May s.d). Entre esses, se destaca o cloridrato de polihexametileno biguanida (P.H.M.B), que forma soluções incolores, inodoras, de natureza catiônica, quimicamente estável, não volátil, de alta atividade contra uma série de organismos, principalmente bactérias Gram-negativas, e de baixa toxicidade para mamíferos.

No intuito de se obter a concentração adequada de P.H.M.B na redução bacteriana em carcaças de frango e determinar o teor residual do princípio ativo, foram ensaiados, no presente estudo, métodos de tratamento de carcaças, objetivando verificar a eficiência do sanitizante. Além disso, aves de cortes foram dessedentadas com soluções aquosas de P.H.M.B a 0,25 %, até 23 dias de idade, e suas vísceras (fígado e rins) e tecido muscular (peito com pele inclusa) foram submetidos à dosagem residual de P.H.M.B.

MATERIAL E MÉTODOS

De cada carcaça de frango tratada com soluções aquosas nas concentrações de 50 e 33 ppm, foram tomadas porções musculares do peito e coxa, tendo a pele inclusa, totalizando aproximadamente 30 g para compor a amostra. As porcentagens de resíduos de polihexametileno biguanida foram determinadas espectrofotometricamente.

Após a homogeneização da amostra, foram retiradas porções em quadruplicatas, entre 0,25 e 0,35g cada e, posteriormente, diluídas em água destilada em balão volumétrico de 100 ml. Destas "soluções", foram tomadas alíquotas de 5 ml e vertidas em balões volumétricos de 250 ml, completando-se o volume com água destilada ("solução" final).

A determinação de polihexametileno biguanida foi realizada espectrofotometricamente na região do ultravioleta a 237nm (ICI-PL-Q-064 1994), em um espectrofôme-

tro UV/VISÍVEL (Becmam DU70), utilizando-se um “branco” de água destilada como referência, sendo as leituras em absorbância das “soluções” finais convertidas em porcentagem de polihexametileno biguanida, segundo a relação abaixo:

$$\%P.H.M.B = A \times 8,758/a$$

onde:

A = absorbância da solução final

a = massa da amostra

8,758 = fator de correção

Para estas amostras em carcaças e vísceras de aves dessedentadas com solução aquosa de P.H.M.B a 25 ppm seguiu-se a mesma metodologia descrita, embora as leituras tenham sido realizadas em triplicatas.

Foram analisadas 20 carcaças de frangos provenientes de estabelecimento de abate com inspeção federal, localizado no município de Itaberai-GO. As carcaças foram divididas em 2 grupos de 10 unidades, sendo um deles tratado por imersão no bactericida com uma concentração de 50 ppm e outro com 33 ppm e, ambos, durante três minutos. De cada carcaça foram retiradas, assepticamente, antes (conc. 50 ppm) e após (conc. 50 e 33 ppm) o tratamento com solução aquosa do bactericida, porções da musculatura da coxa e peito, tendo ambos a pele inclusa, compondo uma amostra de 25 g.

As 25g foram homogeneizadas em *stomacher* com 225ml de água peptonada a 0,1% tamponada, durante quatro minutos, obtendo-se assim a diluição 1:10. Diluições decimais seriadas sucessivas foram obtidas a partir dessa diluição até 10^{-4} .

As amostras foram submetidas às seguintes análises: a) contagem padrão de microrganismos aeróbios ou facultativos mesófilos viáveis (Brasil 1991/1992); b) contagem padrão de microrganismo aeróbios ou facultativos psicotróficos viáveis (Brasil 1991/1992); c) determinação do número mais provável de coliformes fecais (Brasil 1991/1992); d) contagem de *Staphylococcus aureus* (Brasil 1991/1992); e) pesquisa de *Salmonella* (Brasil 1991/1992); e f) contagem de *Clostridium* sulfitorreduzores (Brasil 1991/1992).

Para a contagem padrão de microrganismos aeróbios ou facultativos mesófilos viáveis (Brasil 1991/1992) foi transferido 1,0ml das diluições decimais para placas de Petri esterilizadas, sendo a seguir vertidos 15 ml de ágar padrão para contagem, fundido e resfriado a 45°C. Após a homogeneização e a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sendo então efetuadas as contagens das unidades formadoras de colônias – UFC. Para isso, foram selecionadas placas contendo entre 30 e 300 colônias e o valor do número de UFCs foi multiplicado pelo fator de diluição, expressando o resultado por grama de carne de frango.

A contagem padrão de microrganismos aeróbios ou facultativos psicotróficos viáveis (Brasil 1991/1992) foi realizada seguindo o mesmo procedimento adotado para

a contagem de mesófilos, exceto para a temperatura e o tempo de incubação que foram de 22°C e 5 dias, respectivamente.

Para a determinação do número mais provável de coliformes fecais (Brasil 1991/1992) foi inoculado, em triplicata, 1,0ml das diluições decimais 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose e tubos de fermentação de Durham. Após a incubação a 37°C por 48 horas, foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás e turvação do caldo. A partir de cada um dos tubos positivos, foram inoculadas aliquotas das culturas em tubos contendo caldo EC e tubos de Durham. Após a incubação em banho-maria a 44,5°C por 48 horas, foram considerados positivos os tubos que apresentaram gás e turvação do caldo. O resultado foi expresso utilizando a tabela referenciada no Food and Drug Administration – *Bacteriological Analytical Manual* (1984).

Para a contagem de *Staphylococcus aureus* (Brasil 1991/1992) foram depositados 0,1 ml das diluições decimais 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , na superfície do ágar Baird-Parker. A seguir, com auxílio de alça de Drigalsky, o inóculo foi espalhado cuidadosamente sobre a superfície do meio. Após a incubação das placas, em posição invertida, a 37°C por 48 horas, foram selecionadas aquelas que continham entre 10 e 150 unidades formadoras de colônias típicas (negras brilhantes, com anel opaco e rodeadas de halo transparente) e atípicas (acinzentadas, negras brilhantes sem halo ou com apenas um dos halos). De cada placa foram selecionadas de 3 a 5 colônias típicas que, após a coloração pelo método de Gram, foram inoculadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), para a realização das provas bioquímicas: coagulase, produção de acetoina, fermentação da maltose, manitol e trealose.

Para a pesquisa de *Salmonella* (Brasil 1991/1992), realizou-se um pré-enriquecimento através da incubação a 37°C por 24 horas da diluição 10^{-1} , obtida pela homogeneização de 25g de carne com 225ml de água peptonada a 0,1% tamponada. Para o enriquecimento seletivo, alíquotas de 1ml da cultura pré-enriquecida foram transferidas para tubos contendo 10ml de caldo tetrionato e 10ml de caldo Rappaport. Ambos os meios foram incubados a 43°C por 24 horas. No plaqueamento seletivo foram empregados os meios ágar verde brilhante e Hektoen, que após serem estriados por esgotamento foram incubados a 37°C por 24 horas. De 3 a 5 colônias características de *Salmonella* foram tomadas em cada placa e submetidas à triagem em ágar triplice açúcar ferro a 37°C, a provas bioquímicas e ao teste sorológico para antígenos “O” (somático) e “H” (flagelar).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 revela a distribuição dos valores obtidos nas determinações, pesquisa e contagens de bactérias em carcaças de frango antes e após o tratamento com solução de P.H.M.B na concentração 50 ppm. Nota-se que a redução nos valores do número mais provável de coliformes fecais foi de 100%, o mesmo aconteceu com a contagem

de *Staphylococcus aureus*. Em relação às contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, observou-se uma acentuada redução em valores absolutos nos dois grupos de microrganismos, o que pode ser constatado claramente através da observação das Figuras 1 e 2, além da Tabela 3. A redução em termos percentuais pode ser observada na Figura 5. Nota-se nesta figura que, em oito amostras, a contagem de psicrotróficos apresentou uma redução percentual acima de 75%. Em seis amostras, a contagem de mesófilos apresentou redução igual ou superior a 75%. E, apenas a amostra de nº 8 apresentou uma redução inferior a 50% para mesófilos e psicrotróficos.

Na Tabela 4 e na Figura 6 estão distribuídos os valores percentuais de polihexametileno biguanida em vísceras e músculos de frangos dessedentados com solução de P.H.M.B na concentração de 25 ppm até os 23 dias de idade. Verifica-se que o fígado apresentou maiores concentrações de resíduos, variando a média entre 0,882 (amostra 4) e 1,355 (amostra 10). Os rins apresentaram uma média variável entre 0,621 (amostra 8) e 1,267 (amostra 9). Nos músculos foram observados as menores concentrações de resíduo, ficando a média entre 0,446 (amostra 3) e 0,730 (amostra 10).

Visando monitorar a especificidade da técnica recomendada por empresas para controlar a produção do polímero e, no presente estudo, para detectar resíduo em carcaças e vísceras de frangos, aves oriundas da granja da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, que certificadamente não tiveram nenhum contato com P.H.M.B, foram tomadas e submetidas à análise para detecção de resíduo de P.H.M.B. O resultado desse ensaio pode ser observado na Figura 7, que mostra a comparação entre os resíduos médios teóricos de P.H.M.B em vísceras e músculos de frangos dessedentados com solução de P.H.M.B a 25 ppm até os 23 dias de idade e frangos que não tiveram nenhum contato com o biocida. Nota-se que o fígado e os rins das aves dessedentadas com a solução apresentaram valores médios de resíduo superiores àqueles obtidos para essas duas vísceras oriundas das aves que não tiveram contato com o produto. Isto reforça a hipótese da presença de resíduo nessas vísceras. No entanto, verifica-se que os músculos dos dois grupos de aves praticamente não apresentaram diferença nos valores de resíduo médio teórico de P.H.M.B. Isto vem demonstrar que provavelmente a técnica utilizada por algumas empresas para a análise do P.H.M.B. (ICI-PL-Q-064 1994) não seja a mais adequada para a detecção de resíduos desse polímero em carcaças e vísceras de frango. Isto pode ser compreendido atentando-se para o fato de que as análises na região do ultravioleta são seletivas a transições eletrônicas específicas de grupos funcionais, sendo geralmente irrelevante a massa molecular das espécies químicas em questão. Sendo assim, carcaças e vísceras de frangos constituem matéria orgânica complexa em termos de seus constituintes, onde a existência de substâncias diferentes, porém com grupos químicos que possuem transições eletrônicas similares aos presentes na biguanida, gera uma maior absorção de radiação no ultravioleta, induzindo a falsos resultados quantitativos do cloridrato de polihexametileno biguanida. Sugere-se, para tanto, que estudos sejam feitos visando ao emprego de técnicas de análise mais seletivas frente aos interferentes.

Tabela 1 – Distribuição dos valores obtidos nas determinações, pesquisa e contagens de bactérias em carcaças de frango antes e após o tratamento com solução aquosa de cloridrato de polihemetileno biguanida (P.H.M.B) a 50 ppm.

Carcaça	Carcaças antes do tratamento					Carcaças após tratamento					
	NMP de C. fecalis	Contagem de <i>S. aureus</i>	Contagem de <i>Clostridium</i> Sulfito Redu- tores	Pesquisa de <i>Salmo- nella</i>	Contagem de Mesó- filos	Contagem de Psicro- tróficos	NMP de C. fecalis	Contagem de <i>S. au- reus</i>	Contagem de <i>Clos- tridium</i> Sulfito Redutores	Pesquisa de <i>Salmo- nella</i>	Contagem de Mesó- filos
01	0,0	200	<10	-	5600	125000	-	<10	-	750	24600
02	0,0	800	<10	-	2000	15200	-	<10	-	630	2500
03	0,0	5100	<10	-	17000	8600	-	<10	-	770	7300
04	0,0	500	<10	-	5300	70000	-	<10	-	270	1450
05	0,0	<10	<10	-	8500	86000	-	<10	-	470	8500
06	0,0	1200	<10	-	8400	90000	-	<10	-	400	4200
07	3,0	2100	<10	-	2120	160000	-	<10	-	500	4500
08	0,0	80-0	<10	-	1500	23000	-	100	-	800	15000
09	3,6	400	<10	-	900	19000	-	<10	-	230	10000
10	3,0	800	<10	-	1100	18800	-	<10	-	410	1200

Tabela 2 - Distribuição dos valores percentuais de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) em carcaças de frango tratadas com soluções aquosas dessa substância a 33 e 50 ppm.

Carcaça	% P.H.M.B. - solução 50 ppm				% P.H.M.B. - solução 33 ppm			
	A	B	C	D Média	A	B	C	D Média
01	0,60	0,35	0,39	0,45 0,447	0,74	0,75	0,65	0,72 0,715
02	0,50	0,39	0,45	0,57 0,477	0,97	0,70	1,00	0,71 0,845
03	0,55	0,67	0,80	0,57 0,647	0,69	0,57	0,69	0,60 0,637
04	0,78	0,76	0,87	0,83 0,810	0,39	0,40	0,35	0,50 0,410
05	0,95	1,29	1,11	1,13 1,120	0,47	0,35	0,30	0,60 0,430
06	1,12	0,91	0,75	1,05 0,957	0,94	0,44	0,58	0,53 0,622
07	0,74	0,79	0,61	0,89 0,757	0,37	0,29	0,54	0,53 0,430
08	1,12	0,90	0,79	0,76 0,892	0,59	0,81	0,63	0,64 0,667
09	0,94	0,94	1,09	0,88 0,962	0,44	0,47	0,34	0,40 0,412
10	1,13	1,11	1,39	1,15 1,195	0,45	0,42	0,39	0,59 0,462

Tabela 3 – Porcentagem de redução da carga bacteriana de carcaças de frango tratadas com solução aquosa de cloridrato de polihexametileno biguanida a 50 ppm.

Amostra	REDUÇÃO DA CARGA BACTERIANA (%)						
	NMP C. fecalis	Contagem de <i>S. aureus</i>	Contagem de <i>Clostridium</i>	Pesquisa de <i>Salmonella</i>	Contagem de Mesófilos	Contagem de Psicrotróficos	
			Sulfito/Redutores				
01	-	100	-	-	86,60	80,32	
02	-	100	-	-	68,50	83,55	
03	-	100	-	-	95,47	91,51	
04	-	100	-	-	94,90	97,92	
05	-	-	-	-	94,47	90,11	
06	-	100	-	-	95,23	95,33	
07	100	100	-	-	76,41	97,18	
08	-	87,5	-	-	46,66	37,78	
09	100	100	-	-	74,44	47,36	
10	100	100	-	-	62,27	93,61	

Tabela 4 – Distribuição dos valores percentuais de polihexametileno biguanida – P.H.M.B. – em vísceras e músculos (pele inclusa) de frangos dessedentados com solução aquosa a 25 ppm, até os 23 dias de idade.

Amostra	% P.H.M.B. no fígado			Média			% P.H.M.B. nos rins			Média			% P.H.M.B. nos músculos e peles			Média		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
01	1.383	1.368	1.190	1.313	0.915	1.076	1.127	1.039	0.346	0.857	0.368	0.523	0.346	0.857	0.368	0.523	0.368	0.523
02	1.183	1.183	1.224	1.346	.925	0.915	0.810	0.883	0.537	0.770	0.574	0.627	0.537	0.770	0.574	0.627	0.574	0.627
03	0.954	0.954	1.000	1.182	0.851	0.801	1.079	0.910	0.405	0.454	0.481	0.446	0.405	0.454	0.481	0.446	0.481	0.446
04	0.865	0.865	0.905	0.882	1.167	0.660	0.701	0.842	0.580	0.515	0.708	0.601	0.580	0.515	0.708	0.601	0.708	0.601
05	1.043	1.043	0.791	0.896	0.934	0.811	1.496	1.080	0.703	0.532	0.745	0.660	0.703	0.532	0.745	0.660	0.745	0.660
06	0.957	0.957	1.225	1.014	1.234	0.882	1.105	1.073	0.597	0.674	0.874	0.715	0.597	0.674	0.874	0.715	0.874	0.715
07	0.927	0.927	1.174	1.165	1.325	0.851	1.260	1.145	0.728	0.640	0.726	0.698	0.728	0.640	0.726	0.698	0.726	0.698
08	1.178	1.178	1.076	1.289	1.006	0.853	0.904	0.621	0.740	0.690	0.740	0.723	0.740	0.690	0.740	0.723	0.740	0.723
09	0.712	0.712	1.908	1.333	1.141	1.521	1.141	1.267	0.777	0.584	0.714	0.691	0.777	0.584	0.714	0.691	0.714	0.691
10	1.445	1.445	1.371	1.355	1.131	0.728	1.251	1.036	0.768	0.752	0.672	0.730	0.768	0.752	0.672	0.730	0.672	0.730

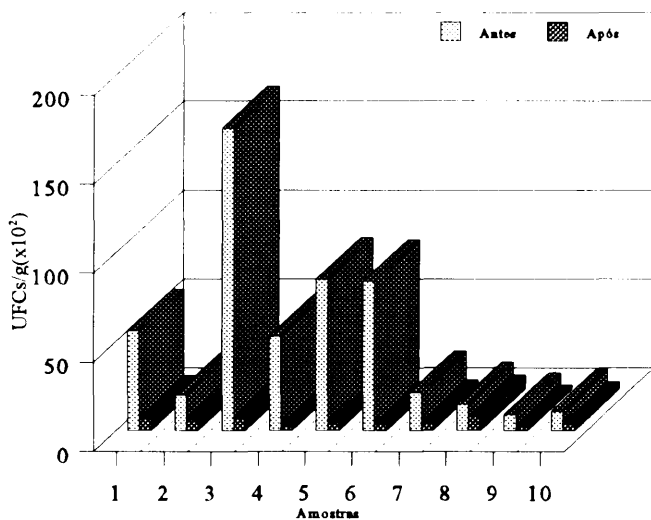


Figura 1 – Contagem de microrganismos mesófilos em carcaças de frango antes e após tratamento com solução aquosa de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) na concentração de 50 ppm.

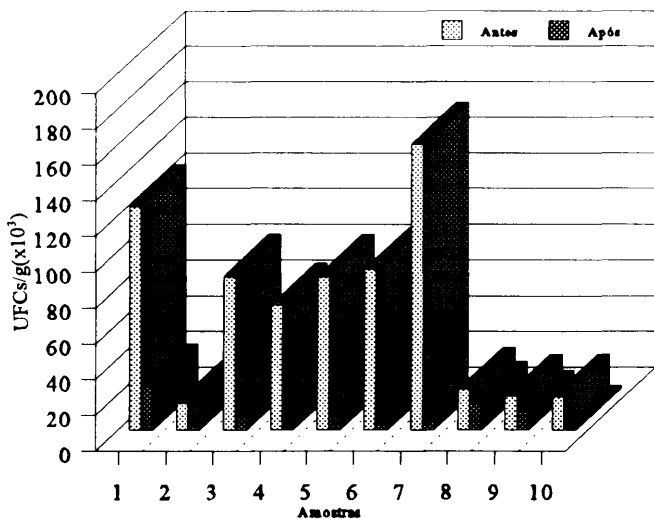


Figura 2 – Contagem de microrganismos psicrotróficos em carcaças de frango, antes e após tratamento com solução aquosa de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) na concentração de 50 ppm.

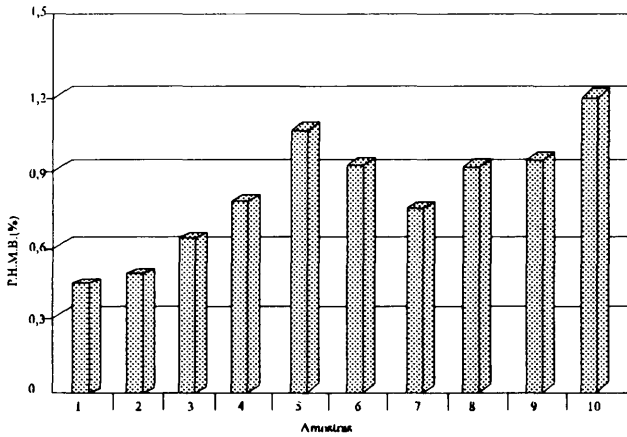


Figura 3 - Resíduo médio de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.), em carcaças de frango tratadas com solução aquosa de P.H.M.B. na concentração de 50 ppm.

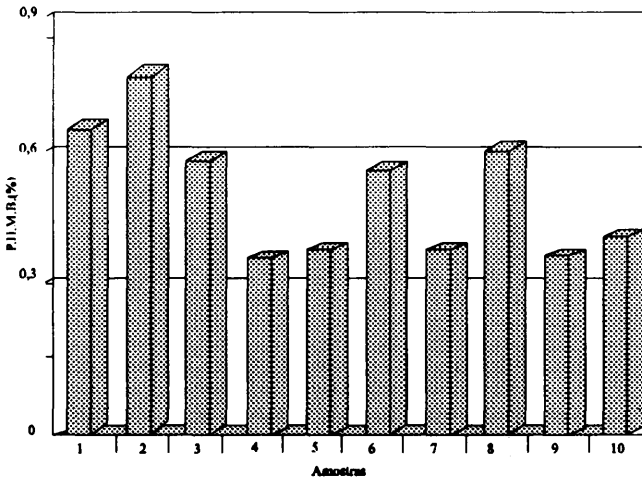


Figura 4 - Resíduo médio de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) na concentração de 33 ppm.

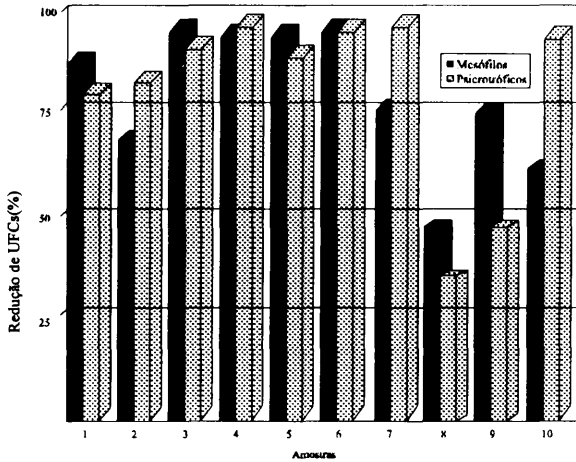


Figura 5 – Redução percentual das UFCs de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, em carcaças de frango tratadas com solução de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) na concentração de 50 ppm.

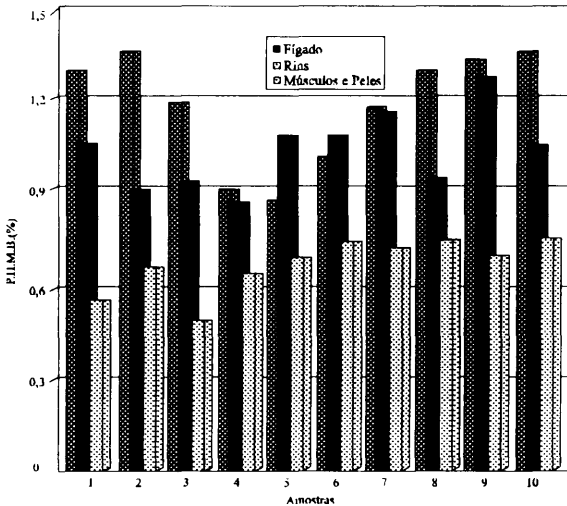


Figura 6 – Resíduos médios de polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) em vísceras e tecidos musculares de frangos dessedentados até 23 dias de idade com solução aquosa de P.H.M.B., na concentração de 25 ppm.

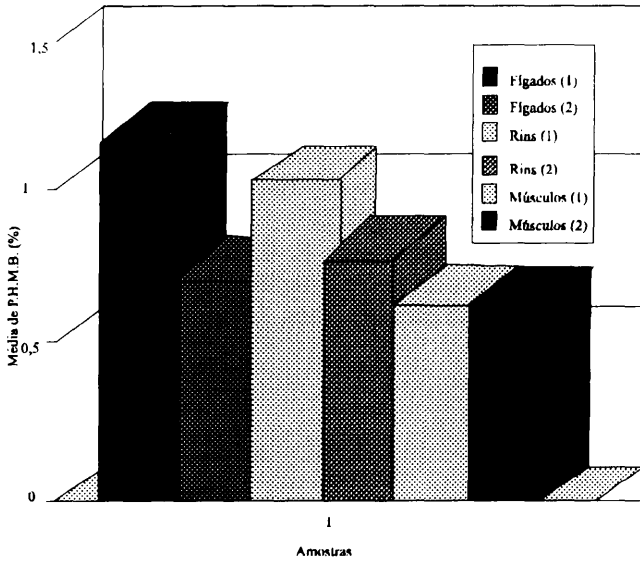


Figura 7 – Resíduo médio teórico de P.H.M.B. em vísceras e músculos – pele inclusa – de frangos dessedentados com solução aquosa de P.H.M.B. a 25 ppm, até os 23 dias de idade (1), e frangos não dessedentados com P.H.M.B. (2). (ICI-PL-Q-064, 25/03/94).

CONCLUSÕES

As soluções aquosas de cloridrato de polihexametileno biguanida, em baixas concentrações, mostraram-se altamente eficazes na redução da carga bacteriana patogênica e deteriorante de carcaças de frango tratadas com essas soluções, o que pode viabilizar o uso das mesmas como sanitizantes nos mais diversos setores industriais, inclusive nas indústrias alimentícias. Por sua vez, a técnica de análises dos resíduos de P.H.M.B, devido à atuação de interferentes, induz a resultados falsos positivos, inviabilizando este método como forma de monitoramento dessas substâncias em carcaças e vísceras de frangos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boardman, G. 1969. Imperial Chemical Industries Limited. A polymeric biguanide for industrial disinfection. Food technology in New Zealand. December, p. 412-25.

Food and Drug Administration . 1984. Bacteriological analytical manual, 6th ed., USA, Division of Microbiology Center for Foods Safety and Applied Nutrition.

- ICI-PL-Q-064.** 1994. Método de análise quantitativa de cloridrato de polihexametileno biguanida, 25/03/1994.
- May, O.W.** Polymeric antimicrobial agents. Disinfection, sterilization and preservation. Seymour S. Block. 4^a ed. Cap. 18. s.d.
- Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária.** 1991/92. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Métodos de análises microbiológicas para alimentos. 2^a Revisão. Brasília. DF.
- Pinheiro, S. R., S. A. L. Vasconcelos, F. H. Ito, J. S. Ferreira Neto & Z. M. Morais.** 1992. Influência da matéria orgânica na atividade microbactericida de cinco desinfetantes de uso pecuário. Bras. J. Vet. Res. Anim. Scil, São Paulo, 29 (1): 51-60.