

INFLUÊNCIA DA MATÉRIA ORGÂNICA NA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO COMERCIAL COM 2,5% DE CLORO ATIVO*

INFLUENCE OF ORGANIC SOIL ON THE MYCOBACTERICIDAL ACTIVITY OF THE COMMERCIAL SODIUM HYPOCHLORITE WITH 2.5% OF ACTIVE CHLORINE

AndreaCastillo GUERRERO¹; Sonia Regina PINHEIRO²; Zenáide Maria de MORAIS³; Silvio Arruda VASCONCELLOS⁴; Eumio Honma ITO⁴; José Soares FERREIRA NETO⁵

RESUMO

Foi investigada a maior diluição do hipoclorito de sódio comercial com 2,5% de cloro ativo (água de lavadeira) capaz de inativar o *Mycobacterium fortuitum* em presença de níveis variáveis de fezes de bovino como fonte de matéria orgânica. Os ensaios foram conduzidos de modo que o desinfetante atuasse durante 60 minutos à temperatura de 4 a 8°C. A neutralização da ação do desinfetante foi obtida com a solução de tiosulfato de sódio a 0,5% e tween-80 a 0,05% (v/v). Os microrganismos sobreviventes foram recuperados em meio de Lowenstein-Jensen. A quantificação das unidades formadoras de colônias (U.F.C.) foi analisada pelo Teste "U" de Mann-Whitney. Os resultados obtidos demonstraram que a presença de fezes bovinas prejudicou a atividade micobactericida do desinfetante ensaiado. Foi possível constatar-se que as diluições de trabalho capazes de determinar a redução de 70% do número de U.F.C. foram de 1:64 e 1:16, respectivamente, em ausência e presença de matéria orgânica. Em diluições de trabalho superiores ao valor de 1:64 a atividade micobactericida do hipoclorito de sódio foi muito irregular.

UNITERMOS: Desinfecção; Micobactéria; Hipoclorito de sódio

INTRODUÇÃO

Dentre os diversos grupos de desinfetantes químicos disponíveis para uso pecuário os produtos liberadores de cloro nascente têm tido grande aplicação, pois reúnem as características de baixa toxicidade, pequena ação corrosiva, baixo custo e grande disponibilidade, o que os recomenda inclusive para o tratamento da água de bebida e de materiais que possam entrar em contato com os alimentos^{1,4,6,9,13,15,23}.

COSTIGAN⁵ (1936) verificou que as soluções de hipocloritos com baixa alcalinidade, contendo 50 partes por milhão de cloro ativo foram capazes de destruir o *Mycobacterium tuberculosis* e que esta característica apresentava associação positiva com o aumento de temperatura na faixa de 50 a 60°C positivo.

SAURAT e LAUTIFIÉ¹⁹ (1960) estudaram a ação de desinfetantes químicos sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, concluindo que a cepa utilizada, o grau de umidade do meio e a presença de matéria orgânica afetavam os resultados dos ensaios. Dentre os produtos testados por estes autores, os

hipocloritos com 1,0% de cloro ativo foram os que apresentaram maior poder micobactericida.

SMITH²¹ (1968) citado por RUBIN¹⁷ (1983), confirmou o poder micobactericida do hipoclorito de sódio em presença de catarro e HOFFMAN et al.¹⁰ (1981) destacaram que dentre os fatores que influenciam a atividade bactericida dos compostos clorados, a presença da matéria orgânica como fezes, urina ou sangue assume uma importância capital pois estes consomem o cloro ativo e provocam uma redução da atividade germicida do desinfetante.

GÉLINAS e GOULET⁸ (1983) ressaltaram a grande inibição da ação bactericida do hipoclorito de sódio ocasionada pela presença de matéria orgânica, destacando também a importância do tipo de contaminante orgânico; no entanto, não investigaram a influência de fezes de animais como fonte de matéria orgânica.

WANG et al.²⁵ (1983) concluíram que a ação micobactericida do hipoclorito de sódio foi fortemente influenciada pela concentração do desinfetante, pelo número de micobactérias

1 - Médico Veterinário - Ministério da Agricultura da República Dominicana

2 - Professor Assistente - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

3 - Biólogo - Técnico Especializado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

4 - Professor Associado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

5 - Professor Doutor - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

* Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Trabalho conduzido com o apoio da FAPESP - Processo 90/2059-9.

e também pela presença da matéria orgânica, particularmente, durante a fase de interação desinfetante-bactéria.

VERA et al.²⁴ (1985) verificaram que os produtos clorados (Cal clorada e hipoclorito de cálcio) com 5,0% de cloro inativaram o **Mycobacterium bovis** em presença de 0,3 gramas de fezes bovina como fonte de matéria orgânica, após três horas de contato à temperatura de 22 - 24°C.

PINHEIRO¹⁶ (1990) estudou a influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes químicos de uso pecuário, constatando que o hipoclorito de sódio (água de lavadeira) com 2,5% de cloro ativo, diluído na proporção de 1:8 foi o melhor dos cinco produtos testados. Neste experimento a Autora trabalhou com **Mycobacterium fortuitum**, empregou uma hora de contato entre o microrganismo e o desinfetante, utilizou a faixa de temperatura de 4 a 8°C positivos e 0,5 gramas de fezes de bovino como fonte de matéria orgânica.

Tendo em vista a excelente atividade micobactericida obtida nas condições estabelecidas por PINHEIRO¹⁶ (1990), foi delineado o presente trabalho que se propôs a estender tais conclusões, determinando a maior diluição do hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo capaz de inativar o **Mycobacterium fortuitum** frente a níveis variáveis de fezes bovinas como fonte de matéria orgânica.

MATERIAL E MÉTODO

O microrganismo teste foi uma cultura de **Mycobacterium fortuitum** **, com sete dias de cultivo no meio de Lowenstein-Jensen diluído a 0,0005g/% (peso úmido)¹⁹ em solução salina estéril 0,85%.

A matéria orgânica tratada foi representada por fezes de bovinos provenientes de animais submetidos a controle de tuberculose, colhidas diretamente do reto dos mesmos, submetidos à ação do vapor fluente durante 30 minutos e armazenadas à temperatura de 20°C negativos em alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 gramas até o momento da utilização. A ausência de **Mycobacterium** sp nas fezes foi comprovada através da cultura em Lowenstein-Jensen e Stonebrink e Lesslie², após incubação em caldo de soja tripticase*** (TSB) a 37°C por seis horas¹⁴ e a descontaminação segundo a técnica de Petroff².

O carreador utilizado foi uma folha de papel de filtro do tipo xarope, com 50 cm, gramatura de 250 g/m, cortada em

formato circular e com um diâmetro de 9,5 cm, na qual foram desenhadas com grafite, aleatoriamente, três círculos com 2 cm de diâmetro.

O suporte para a condução dos ensaios foi uma placa de Petri com 9,5 cm de diâmetro (área interna de 70,882 cm²).

A solução neutralizante utilizada para sustar o efeito do desinfetante foi a solução de tiosulfato de sódio a 0,5% p/v acrescido de 0,05% v/v de Tween/80***²⁶.

O desinfetante empregado foi o hipoclorito de sódio comercial (água de lavadeira) com 2,5% de cloro ativo, diluído nas proporções de 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256. O diluente do desinfetante foi água não submetida a tratamento químico, bidestilada em equipamento de vidro, submetida à autoclavagem durante 15 minutos a 121°C e armazenada à temperatura de refrigeração.

A quantificação das unidades formadoras de colônias (U.F.C.) foi executada como preconizado por PINHEIRO¹⁶ (1990), demarcando-se uma área da superfície do meio de cultura, contando-se 6 cm a partir da extremidade inferior na superfície exposta, tendo a leitura obedecido o seguinte critério:

-nenhuma U.F.C.; menos de 50 U.F.C.; contagem efetiva do número de colônias; de 50 a 100 U.F.C.: 1+; de 101 a 200 U.F.C.: 2+; de 201 a 500 U.F.C.: 3+; acima de 500 U.F.C.: 4+.

A análise dos resultados obtidos foi efetuada através de teste não-paramétrico, para comparação de duas amostras independentes: Teste U de Mann-Whitney²⁰. O nível de significância adotado foi de 0,05. O coeficiente de variação das contagens de U.F.C. foi calculado através da fórmula indicada por SOUNIS²² (1972).

Em cada ensaio foram testadas 5 diluições diferentes de hipoclorito de sódio e um grupo controle no qual o produto químico foi substituído pelo placebo (solução salina estéril). Além destes grupos houve um controle onde a matéria orgânica foi substituída por solução salina estéril.

Sobre o carreador de papel de filtro foram colocados quatro mililitros da suspensão de **Mycobacterium fortuitum** 0,0005 g/%¹⁹, distribuídos uniformemente por toda a área exposta do carreador. A seguir foram colocadas as fezes de acordo com as quantidades pré-estabelecidas (0,5; 1,0 e 2,0 gramas) as quais foram distribuídas uniformemente por toda a superfície da placa. No grupo controle substituiu-se a matéria orgânica por solução salina estéril em volumes de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mililitros, respectivamente, segundo as diferentes quantida-

** Obtida junto ao Instituto Biológico de São Paulo

*** MERCK

des de matéria orgânica utilizadas.

As placas foram armazenadas a uma temperatura de 28°C durante 30 minutos. Uma vez concluído este período foram aplicados os 4 mililitros do hipoclorito de sódio nas respectivas concentrações.

O período de atuação do desinfetante foi de 60 minutos, nos quais as placas foram mantidas à temperatura de 4 a 8°C. A seguir, dos carreadores foram recortados três amostras circulares com 2,0 cm de diâmetro as quais foram maceradas com graal e pistilo/estéreis, e 10 mililitros da solução neutralizante; esta suspensão foi tamizada e submetida a uma nova diluição de razão de dez, modo a obter-se uma suspensão a 1:100²⁶. Esta foi centrifugada a 1000 G durante 20 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com 1 mililitro de solução salina estéril a 0,85%, e foram semeados cinco tubos com meio de cultura Lowenstein-Jensen³. Estes tubos foram incubados à temperatura de 37°C por um período de sete dias. Transcorridos os sete dias de incubação foi observada a presença de colônias e nos casos positivos, a confirmação da característica de álcool-ácido e a resistência do bacilo isolado foi obtida com a coloração de Ziehl-Neelsen³.

As leituras foram realizadas com sete dias de incubação a 37°C, em uma área calculada a partir de seis centímetros lineares medidos na superfície exposta do meio de cultura, registrando-se os números de Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) conforme os critérios apresentados a seguir:

- _____ = 0,0 colônias; () = contagem real; 1+ = 75,0 colônias; 1/2+ = 112,5 colônias; 2+ = 150,0 colônias; 2/3+ = 250,0 colônias; 3+ = 350 colônias; 3/4+ = 425,0 colônias; 4+ = 500,0 colônias.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão condensados nas Tab. 1 a 4 e que apresentam valores expressos em percentuais de redução do número de U.F.C. de *Mycobacterium fortuitum* por tratamento (diluição do desinfetante e presença de matéria orgânica) em relação aos respectivos controles em cada grupo experimental.

Tomando-se como valor mínimo desejável para a mensuração da ação micobacteriana de um desinfetante a redução de pelo menos 70% do número de colônias obtido nos respectivos controles, verifica-se que em ausência de matéria orgânica este limiar é obtido de maneira consistente até a diluição do hipoclorito de sódio de 1:64; no entanto, em presença de matéria orgânica isto só ocorre para o hipoclorito de sódio diluído na proporção de 1:16, frente a 0,5; 1,0 e 1,5 gramas de matéria orgânica (Tab. 1 a 3). Saliente-se, inclusive, que para

TABELA 1

Percentagem de redução de Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) de *Mycobacterium fortuitum* em relação ao grupo controle, segundo a concentração de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, a condição de tratamento com 0,5 g de fezes bovinas como fonte de matéria orgânica e o grupo experimental. São Paulo, 1991.

Grupo Experimental	Desinfetante Matéria Orgânica	1:16		1:32		1:64		1:128		1:256	
		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
1		100,00	96,00	100,00	73,00	84,30	38,00	89,50	38,00	32,40	18,00
2		100,00	98,20	76,00	88,00	70,00	78,20	70,00	76,30	33,00	60,50
3		100,00	98,60	67,00	96,10	82,50	81,70	81,90	69,50	18,90	39,00
4		100,00	99,50	96,40	81,70	82,30	63,40	95,20	48,70	70,00	14,60
5		100,00	96,50	99,00	98,80	85,00	87,00	82,00	72,50	24,00	29,20
Média Aritmética		100,00	97,76	87,68	87,56	80,82	69,66	84,12	61,00	35,66	32,26
Desvio Padrão			1,30	13,56	9,47	5,50	17,66	8,43	14,95	17,96	16,53
C.V.			1,32	15,47	10,80	6,80	25,35	10,02	24,54	50,36	51,23
* Decisão Estatística		S		NS		NS		S		NS	

CV= Coeficiente de Variabilidade de Pearson; * = Verificação da significância da hipótese de nulidade para o efeito da presença da matéria orgânica, para cada concentração de hipoclorito de sódio (Teste U de Mann-Whitney $\alpha=0,05$); S = Estatisticamente significativo; NS = Estatisticamente não significativo.

TABELA 2

Percentagem de redução de Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) de *Mycobacterium fortuitum* em relação ao grupo controle, segundo a concentração de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, a condição de tratamento com 1,0 g de fezes bovinas como fonte de matéria orgânica e o grupo experimental. São Paulo, 1991.

Grupo Experimental	Desinfetante Matéria Orgânica	1:16		1:32		1:64		1:128		1:256	
		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
1		100,00	75,00	99,20	45,80	86,00	160,00	36,40	17,60	58,80	0,00
2		100,00	98,00	99,80	82,30	98,00	182,00	96,40	75,20	85,00	66,40
3		99,70	90,70	92,70	64,20	80,20	164,70	55,80	60,70	55,80	9,50
4		100,00	72,20	98,40	72,20	84,60	72,20	100,00	50,00	78,50	14,80
5		100,00	96,80	97,50	74,80	79,00	70,00	83,50	67,00	82,30	40,00
Média Aritmética		99,94	86,54	97,52	67,86	85,56	69,70	74,42	54,10	72,08	26,14
Desvio Padrão			10,88	2,53	12,45	6,74	6,33	24,54	20,02	12,27	24,09
C.V.			12,57	2,59	18,34	7,87	9,08	32,98	37,00	17,05	92,15
* Decisão Estatística		S		S		S		S		S	

CV = Coeficiente de Variabilidade de Pearson; * = Verificação da significância da hipótese de nulidade para o efeito da presença da matéria orgânica, para cada concentração de hipoclorito de sódio (Teste U de Mann-Whitney $\alpha=0,05$); S = Estatisticamente significativo.

TABELA 3

Percentagem de redução de Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) de *Mycobacterium fortuitum* em relação ao grupo controle, segundo a concentração de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, a condição de tratamento com 1,5 g de fezes bovinas como fonte de matéria orgânica e o grupo experimental. São Paulo, 1991.

Grupo Experimental	Desinfetante Matéria Orgânica	1:16		1:32		1:64		1:128		1:256	
		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
1		100,00	99,00	100,00	98,80	93,20	75,80	96,00	45,00	75,60	19,30
2		100,00	81,00	99,00	63,40	92,80	80,00	68,20	5,00	3,50	21,90
3		100,00	99,00	80,00	81,00	93,00	69,60	62,20	11,30	71,30	7,50
4		100,00	89,60	97,00	75,30	80,20	75,30	60,50	28,70	90,00	4,00
5		99,80	87,80	93,30	70,70	81,70	63,40	65,20	39,00	98,30	29,20
Média Aritmética		99,96	91,42	93,86	77,84	88,18	72,82	70,42	25,80	67,74	16,38
Desvio Padrão		0,08	6,71	6,43	11,90	5,95	5,75	13,05	15,45	33,55	9,33
C.V.		0,08	7,33	6,85	15,28	6,71	7,89	18,53	59,88	49,53	56,95
* Decisão Estatística		S		S		S		S		NS	

CV = Coeficiente de Variabilidade de Pearson; * = Verificação da significância da hipótese de nulidade para o efeito da presença da matéria orgânica, para cada concentração de hipoclorito de sódio (Teste U de Mann-Whitney $\alpha = 0,05$); S = Estatisticamente signifiicante; NS = Estatisticamente não signifiicante.

TABELA 4

Percentagem de redução de Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) de *Mycobacterium fortuitum* em relação ao grupo controle, segundo a concentração de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, a condição de tratamento com 2,0 g de fezes bovinas como fonte de matéria orgânica e o grupo experimental. São Paulo, 1991.

Grupo Experimental	Desinfetante Matéria Orgânica	1:16		1:32		1:64		1:128		1:256	
		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
1		100,00	96,00	100,00	72,30	97,00	72,30	50,00	61,20	90,00	44,50
2		100,00	78,60	96,80	45,80	84,50	65,80	70,00	72,50	70,00	0,00
3		100,00	97,20	79,30	57,00	92,20	64,20	57,80	46,40	40,00	38,00
4		100,00	59,00	99,00	70,40	94,70	54,50	99,00	24,20	34,20	42,40
5		100,00	88,40	97,50	69,30	62,80	74,40	83,50	9,00	65,70	13,60
Média Aritmética		100,00	83,84	94,52	62,96	86,24	66,24	72,00	42,66	59,98	27,70
Desvio Padrão			39,68	7,64	10,12	12,45	7,01	17,61	23,33	20,48	17,72
C.V.			47,32	8,13	16,07	14,43	10,57	24,46	54,69	34,15	63,97
* Decisão Estatística		S		S		S		NS		NS	

CV = Coeficiente de Variabilidade de Pearson; * = Verificação da significância da hipótese de nulidade para o efeito da presença da matéria orgânica, para cada concentração de hipoclorito de sódio (Teste U de Mann-Whitney $\alpha = 0,05$); S = Estatisticamente signifiicante; NS = Estatisticamente não signifiicante.

a 2,0 gramas de matéria orgânica (Tab. 4), já é observado pelo menos um percentual de redução inferior a 70% na diluição do hipoclorito de sódio de 1:16 (grupo experimental 4).

As Tab. 1 a 4 possibilitam a análise da variação observada nos resultados obtidos com a metodologia experimental empregada. De fato, para as concentrações de hipoclorito de sódio de 1:128 e 1:256, são observados coeficientes de variação superiores a 30% com valores mais elevados quando em presença de matéria orgânica.

DISCUSSÃO

As Tab. 1 a 4 construídas com os resultados obtidos pelo cálculo dos percentuais de redução das contagens de U.F.C. em relação aos controles demonstraram que para ser mantido um mínimo de 70% de redução de microrganismos, a presença de matéria orgânica determina a necessidade de pelo menos quatro vezes mais desinfetante. Realmente, considerando-se o valor de 70% como o mínimo aceitável em termos de eficácia do produto químico, encontra-se para o hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo as diluições de trabalho de 1:64 e 1:16, respectivamente para as condições de ausência ou de presença de matéria orgânica.

Os resultados do presente trabalho concordam com os observados por PINHEIRO¹⁶ (1990) quando da avaliação do mesmo tipo de desinfetante na diluição de 1:8 frente a 0,5 grama de fezes de bovino como fonte de matéria orgânica. Do exposto, pode-se depreender que para este nível de componente orgânico a maior diluição de trabalho do hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo é a de 1:16. Tais observações são igualmente concordantes com as obtidas em outros ensaios^{3,6,7,11,12,18}, que também admitiram a existência de uma influência negativa da matéria orgânica sobre a atividade bactericida dos hipocloritos. Entretanto, cumpre ser salientado que tais afirmações discordam da teoria da atividade desinfetante das cloraminas que pressupõe a persistência do poder bactericida do cloro ligado aos compostos nitrogenados existentes nos diversos tipos de matéria orgânica⁶.

O elevado coeficiente de variação constatado nos ensaios que empregaram as mais altas diluições do hipoclorito de sódio sugere que a partir de um dado valor de concentração do desinfetante o seu efeito micobactericida começa a comportar-se de maneira muito irregular. O mesmo tipo de perfil foi obtido por PINHEIRO¹⁶ (1990) quando testou o efeito micobactericida de um iodóforo na diluição de trabalho de 1:250 v/v.

A irregularidade na atividade micobacteriana do desinfetante, constatada a partir do cálculo dos coeficientes de variação,

além de revelar associação com as maiores diluições do desinfetante químico, também apresenta relação com o aumento dos níveis de matéria orgânica, o que fica bastante evidente quando da observação dos valores indicados na Tab. 4 onde, frente a 2,0 gramas de matéria orgânica, é encontrado um coeficiente de variação de 47,32% para o hipoclorito de sódio diluído na proporção de 1:16.

A temperatura escolhida para a realização dos testes (4 a 8°C) é uma condição que coloca o produto em um nível crítico pois, simulando um valor vigente nos meses de inverno em regiões

de clima temperado, são obtidas conclusões que poderão ser melhoradas caso a avaliação venha a se realizar em temperaturas mais elevadas, usuais nas outras estações do ano em tais áreas e durante todo o ano em regiões de clima tropical e subtropical.

Os resultados obtidos demonstraram que quando da escolha do hipoclorito de sódio como elemento auxiliar em programas de controle da tuberculose bovina, o seu emprego a nível de instalações e de equipamentos zootécnicos deverá ser sempre precedido de uma completa higienização visando a remoção dos componentes orgânicos.

SUMMARY

It was evaluated the highest working dilution of the sodium hypochlorite solution (available as household and laundry bleach, with 2.5% of active chlorine) still effective in inactivating **Mycobacterium fortuitum** in the presence of different levels of bovine feces as organic soil. The experiments were conducted "in vitro" using filter paper as carriers. The time of contact was one hour at the temperature range of 4 to 8°C. The blocking of the disinfectant activity was achieved by the dilution using a solution of 0.5% sodium thiosulphate with 0.05% twenn-80 (v/v). The remaining microorganisms were cultivated in Lowenstein-Jensen culture medium and the number of colonies forming unities was statistically evaluated by the MannWhitneyTest. The results showed that the organic soil affected the disinfectant activity. The working dilutions calculated were 1:64 and 1:16, respectively, with and without organic soil. In working dilutions higher than 1:64 the regularity of the disinfectant action was very poor.

UNITERMS: Desinfection; Mycobacteria; Sodium hypochlorite

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ALTERTHUM, F.; TIMENETSKY, V. Antissépticos e desinfetantes. In: ZANINI, A.C.; OGA, S., ed. **Farmacologia aplicada**. 4. ed. São Paulo, Atheneu, 1989. p.583-99.
- 02-CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis**. Buenos aires, 1985. (Nota técnica, 27)
- 03-CHICK, H.; MARTIN, C.J. The principles involved in the standardization of disinfectants and the influence of organic matter-upon germicidae value. **J. Hyg.**, Lodon, v.8, p.655-97, 1908.
- 04-COSTA, D.E.M. Desinfetantes em saúde animal. **Bol. Def. sanit. anim.**, p.1-54, 1987. Número especial.
- 05-COSTIGAN, M.S. Effectiveness of hot hypochlorites of low alkalinity in destroying **Mycobacterium tuberculosis**. **J. Bacteriol.**, v.32, p.57-63, 1936.
- 06-DYCHDALA, G.R. Chlorine and Chlorine compounds. In: BLOCK, S.S., ed. **Disinfection sterilization and preservation**. 3 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983. p.157-82.
- 07-FINCH, W.E. **Disinfectants their values and uses**. London, Chapman & Hall, 1958. p.120-8.
- 08-GÉLINAS, P.; GOULET, J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. **J. appl. Bacteriol.**, v.54, p.243-7, 1983.
- 09-HEKMATI, M.; BRADLEY JUNIOR, R.L. Effect of milk constituents on the persistence of sodium hypochlorite sanitizer. **J. dairy Sci.**, v.62, p.47-8, 1979.
- 10-HOFFMAN, P.N.; DEATH, J.E.; COATES, D. The stability of sodium hypochlorite solutions. In: COLLINS, C.H.; ALLOWOOD, D.M.C.; BLOOMFIELD, S.F.; FOX, A., ed. **Disinfectants their use and evaluation of effectiveness**. New York, Academic press, 1981. (Society for Applied Bacteriology Technical Series, 16)

- 11-JONES, L.M.; BOOTH, N.H.; McDONALD, L.E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. p.620-43.
- 12-LINTON, A.H.; HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D., eds. **Disinfection in veterinary and farm animal practice**. Oxford, Black-well Scientific Publications, 1987. p.17-8.
- 13-MARKS, H.C.; WYSS, O.; STRANDSKOV, F.B. Studies on the mode of action of compounds containing available chlorine. **J. appl. Bacteriol.**, v.49, p.299-305, 1945.
- 14-MASAKI, S.; SHIMIZU, K.; CHO, N.; HIROSE, T. Isolation of mycobacteria from lymphonodes of pigs and their environment. **Jap. J. vet. Sci.**, v.44, p.213-21, 1982.
- 15-PELCZAR, M.; REIDR; CHAN, E.C.S. **Microbiologia: controle dos microrganismos, controle por agentes químicos**. São Paulo, Mc Graw Hill do Brasil, 1980. v.1, p.493-516.
- 16-PINHEIRO, S.R. **Influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes químicos de uso pecuário**. São Paulo, 1990. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 17-RUBIN, J. Agents for disinfection and control of tuberculosis. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 3. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983. p.414-21.
- 18-RUSSEL, A.D. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J., eds. **Principles and practices of disinfection, preservation and sterilisation**. London, Blackwell, 1982. p.107-33.
- 19-SOURAT, M.M.P.; LAUTIÉ, R. De l'action de quelques désinfectants sur le baccille tuberculeux. **Rev. Méd. vét.**, Toulouse, v.111, p.186-99, 1960.
- 20-SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica (para as ciências do comportamento)**. São Paulo, McGraw-Hill, 1975.
- 21-SMITH, 1968 apud RUBIN¹⁷, 1983. p.419.
- 22-SOUNIS, E. **Bioestatística: princípios fundamentais, metodologia estatística, aplicação às ciências biológicas**. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1972. p.230.
- 23-SUSAN, C.; MORGAN, J. Cleaning and disinfection of farm buildings. In: COLLINS, C.H.; ALLOWOOD, D.M.C.; BLOOMFIELD, S.F.; FOX, A., eds. **Disinfectants their use and evaluation of effectiveness**. New York, Academic Press, 1981. (Society for Applied Bacteriology Technical Series, 16)
- 24-VERA, A.; VOLKOVSKY, G.; SANCHEZ, I.; COTRINA, N. Acción de desinfectantes contra **M. bovis**: hidróxido de sódio, mezcla de este producto con formaldehido, productos clorados y ácido peracético. **Cienc. Tec. Agric. Vet.**, v.7, p.29-38, 1985.
- 25-WANG, W.L.; POWERS, B.W.; LUECHTEFELD, N.W.; MARTIN, J. Effects of disinfectants on **Campylobacter jejuni**. **Appl. environ. Microbiol.**, v.45, p.1202-5, 1983.
- 26-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Geneva, 1984. (WHO/VPH/84.4)

Recebido para publicação em 06/08/92
Aprovado para publicação em 05/02/93