

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Alessandra Oliveira de Abreu

**ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
COMPROVAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO ÁLCOOL ETÍLICO NA
FORMA DE GEL**

Rio de Janeiro

2009

Alessandra Oliveira de Abreu

**ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
COMPROVAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO ÁLCOOL ETÍLICO NA
FORMA DE GEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki
Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro

2009

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Abreu, Alessandra Oliveira de

Estudo para determinação de metodologia analítica para comprovação da eficácia antimicrobiana do álcool etílico na forma de gel. / Alessandra Oliveira de Abreu – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

85 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2009.

Orientadoras: Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki; Maria Helena Simões Villas Bôas.

1. Avaliação. 2. Anti-Infeciosos. 3. Estudos de Validação. 3. Etanol. 4. Desinfetantes. I. Título.

Study for determination of analytical methods to confirm antimicrobial efficacy of ethyl alcohol
in the form of gel.

Alessandra Oliveira de Abreu

**ESTUDO PARA DETERMINAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
COMPROVAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO ÁLCOOL ETÍLICO NA
FORMA DE GEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 31 / 03 / 2009

BANCA EXAMINADORA

Paola Carderelli Leite (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Cleide Aparecida Ferreira de Rezende (Doutora)
(Universidade Estácio de Sá)

André Luiz Souza dos Santos (Doutor)
(Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki (Doutora) – Orientadora – In memoriam
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Aos meus pais, Sonia Oliveira de Abreu e
Jorge Augusto de Abreu e ao meu irmão Alex
Sandro Oliveira de Abreu “in memoriam”, saudades...

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento inicial não poderia deixar de ser para minhas orientadoras, Profa. Dra. Maria Helena S. Villas Bôas e Profa. Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki.

À Profa. Dra. Maria Helena S. Villas Bôas, pelo carinho, pela amizade e pela paciência e por viabilizar a realização de um sonho muito querido e antigo. Agradeço pelo seu incansável e permanente encorajamento, pela disponibilidade dispensada em todas as situações e pelas suas sugestões que foram preciosas para a concretização deste trabalho.

À Profa. Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki cujo carinho, incentivo e dedicação transcenderam em muito as exigências do seu papel e da sua responsabilidade.

As duas, portanto, a minha eterna gratidão e amor.

Ao Prof. Dr. Antonio Eugênio C. C. de Almeida, pelo carinho e pela valiosa contribuição no meu percurso durante a minha graduação.

A todos os amigos do Setor de Saneantes, em especial a Aline e a Bruna pela amizade, carinho e ajuda nos momentos de dificuldade que eu encontrei. E pelas risadas, conversas animadas que tivemos também. Adoro vocês!

Ao Carlos Roberto, amigo-irmão, que me faz sentir uma pessoa feliz e privilegiada pela amizade verdadeira e grandiosa que existe entre nós.

Ao meu querido irmão Alex Sandro (in memorian), que tanto me incentivou a não desistir diante as adversidades na época da graduação e que partiu, antes do que a compreensão me permitisse entender. Você me faz falta demais. Obrigada por ter feito parte da minha vida.

Aos meus amigos, Cátia Cristina, Gláucia, Renata, Luiz, por todo o carinho, pela alegria que trazem à minha vida, por estarem sempre presentes (mesmo quando distantes), por aceitarem minha ausência e mesmo assim...Continuem grandes amigos!

Ao professor Sérgio, pela disponibilidade e atenção na orientação da análise estatística dos dados desta pesquisa.

Aos funcionários da coordenação de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde: Raquel, Pedro, Isac e Daniele, pela preocupação em atender sempre de forma eficiente, educada e atenciosa em todos os momentos em que foram necessários.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde por todos os ensinamentos passados.

Aos funcionários da Central de Esterilização e do Setor de Meios de Cultura, pela disponibilidade e presteza sempre que solicitados.

Aos meus pais a quem devo a existência, a formação e orientação de vida.

Aos meus queridos companheiros da BSGI, meus sinceros agradecimentos pelos constantes incentivos.

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim, mesmo que a distância;

E às inúmeras pessoas que contribuíram direta e indiretamente para meu desenvolvimento. Meu muito obrigada!

Por fim, agradeço a meu mestre, Dr. Daisaku Ikeda, por suas lições de vida.

*“A jornada que escolhemos
Não é de sossego nem de mágoas.
É o caminhar seguro e valente
Desfraldando a bandeira da esperança,
Do otimismo e da convicção!”*

*Não faz mal que seja pouco,
O que importa é que o avanço de hoje
Seja maior que o de ontem.
Que nossos passos de amanhã
Sejam mais largos que os de hoje.”*

(Daisaku Ikeda)

RESUMO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou em 20 de fevereiro de 2002 a RDC nº 46, determinando que o álcool etílico com graduações superiores a 54° GL ou 46° INPM, deveria ser comercializado unicamente em solução coloidal, na forma de gel e desnaturado. Porém organizações internacionais ainda não dispõem de metodologia padronizada para avaliação da atividade antimicrobiana destes produtos, principalmente devido a fatores interferentes como a volatilidade e a viscosidade do gel. Portanto o presente estudo teve como objetivo principal determinar uma metodologia que pudesse avaliar esta atividade. Foi realizada uma adaptação da metodologia preconizada pela “Association of Official Analytical Chemists” utilizada para avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes nas formas de “Spray” e Aerossol, onde lamínulas de vidro são utilizadas como carreadores. As adaptações realizadas se mostraram bastante satisfatórias, permitindo que fosse testado um produto à base de álcool etílico sob a forma de gel (produto B), aplicando-se diferentes volumes do mesmo. O volume de 100 µL do produto B (63° GL) foi capaz de eliminar *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Porém, quando o volume foi reduzido para 50 µL foi verificada a eficácia apenas contra *S. choleraesuis* ATCC 10708 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 e não para *S. aureus* ATCC 6538. A partir destes resultados foi estabelecido o volume mínimo de 100 µL a ser usado no método para qualquer produto. Porém, para garantir resultados confiáveis, foi realizado um estudo de pré-validação da metodologia desenvolvida, visando a validação do método e sua ampla utilização por diferentes laboratórios analíticos. A princípio foram avaliados apenas os seguintes parâmetros: especificidade, robustez e repetitividade. O método foi considerado robusto, de acordo com os parâmetros avaliados (instrumentos laboratoriais e o tempo de incubação do microrganismo), após aplicação da técnica de “pour-plate” e do teste estatístico ANOVA com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados estatísticos mostraram que não houve diferença entre os grupos estudados pela ANOVA, variando-se os instrumentos laboratoriais e o tempo de incubação. O método foi considerado robusto, pois manteve sua resposta em meio às variações deliberadas, dos parâmetros

analíticos, dentro do laboratório. Após os ensaios envolvendo alguns parâmetros de validação, o método desenvolvido foi utilizado para avaliação da atividade bactericida de produtos à base de álcool etílico na forma de gel em diferentes concentrações dispostos à venda. Os produtos C (77° GL), D (77° GL) e E (82° GL), apresentaram eficácia contra todos os microrganismos teste utilizados. No entanto, o produto A (54° GL), apresentou crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 muito acima do critério determinado pelo método. Para concluir o processo de validação do método, ainda será necessário realizar um estudo interlaboratorial envolvendo pelo menos três diferentes laboratórios analíticos.

Palavras-chave: 1.Avaliação Antimicrobiana 2.Validação 3.Metodologia analítica
4.Álcool etílico na forma de gel

ABSTRACT

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa (Brazilian Sanitary Surveillance Agency) published the guideline RDC No. 46 on the 20th February 2002, establishing that ethyl alcohol with degree greater than 54° GL (%V) or 46° INPM (%Wt), should be commercialized only in colloidal solutions, denaturized and in a gel form. However, international organizations do not, as yet, have a standard methodology to evaluate antimicrobial activity in these products, mainly due to difficulties related to gel volatility and viscosity. The present study, therefore, aims to establish a methodology to be able to evaluate such activity under these conditions. An adaptation of the methodology commended by the Association of Official Analytical Chemists was used for the evaluation of antimicrobial activity of disinfectants in the forms of sprays and aerosols, in which glass coverslips are used as carriers. The alterations proved to be satisfactory. The adapted methodology allowed different volumes of an ethyl alcohol based product in the form of a gel (product B) to be tested. A volume of 100 µL of product B (63° GL) was able to eliminate *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. However, when the volume was reduced to 50 µL it was efficient against *S. choleraesuis* ATCC 10708 and *P. aeruginosa* ATCC 15442 but not against *S. aureus* ATCC 6538. Based on these results a minimum volume of 100 µL was established to be used in the method for any product. Nevertheless, to guarantee reliable results, a pre-validation study of the methodology developed was carried out, with a view to validating the methodology and its broad application for different analytical laboratories. At first, only the following parameters were evaluated: specificity, robustness and repeatability. The method was considered robust according to the parameters evaluated (laboratory equipment and microorganism incubation time) after the application of the pour plate technique and the ANOVA statistical test with a significance level of 5% ($p < 0.05$). The statistical results with ANOVA showed no difference between the groups studied, with laboratory equipment and incubation time as variables. The method was considered robust since its response remained constant despite the deliberate variations made to analytical parameters in the

laboratory. After tests for validation parameters, the new method was used to evaluate bactericidal activity of commercial ethyl alcohol based products in the form of gel in different concentrations. The products C (77° GL), D (77° GL) and E (82° GL) presented efficacy against all microorganisms used in the tests. However, the product A (54° GL), presented a much greater growth of *S. aureus* ATCC 6538 than the criteria established for the method. In order to conclude the validation process of this method an inter-laboratory study involving at least three different analytical laboratories will have to be carried out.

Key-words: 1.Antimicrobial evaluation 2.Validation 3.Analytical methodology 4.Ethanol in the form of gel

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura molecular do etanol ou álcool etílico.....	23
Figura 2	Vítimas de queimaduras com álcool líquido.....	24
Figura 3	Etapa inicial da preparação do inóculo realizada a partir das culturas estocadas para o Método da Diluição de Uso.....	39
Figura 4	Esquema dos procedimentos empregados no preparo do inóculo, utilizado no ensaio para o Método da Diluição de Uso.....	40
Figura 5	Transferência dos cilindros entre tubos no Método da Diluição.....	41
Figura 6	Esquema da transferência dos cilindros entre tubos no Método da Diluição de Uso.....	42
Figura 7	Resumo dos procedimentos empregados no Método para Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerosol.....	48
Figura 8	Esquema do método, utilizando uma lamínula. Sendo que este procedimento foi repetido para as 60 lamínulas de vidro.....	50
Quadro 1	Resultados obtidos da contagem <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 utilizando-se diferentes instrumentos laboratoriais.....	66
Quadro 2	Resultados obtidos da contagem <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 variando-se o tempo de incubação do inóculo.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades químicas dos desinfetantes líquidos.....	18
Tabela 2	Parâmetros analíticos necessários para validação de acordo com o tipo de ensaio microbiológico, segundo a USP 30.....	31
Tabela 3	Perfil de resistência padrão para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 frente ao fenol	46
Tabela 4	Perfil de resistência padrão para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 frente ao fenol	46
Tabela 5	Perfil de resistência padrão para <i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708 frente ao fenol.....	47
Tabela 6	Resultados obtidos através do Método da Diluição de Uso utilizando-se álcool etílico a 70% na forma líquida manipulado no laboratório.....	56
Tabela 7	Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente ao fenol.....	57
Tabela 8	Resultados obtidos na Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol, utilizando-se álcool etílico a 70% manipulado no laboratório.....	58
Tabela 9	Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente ao fenol.....	59
Tabela 10	Resultados obtidos na Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol após diluição da cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	60

Tabela 11	Resultados obtidos do controle de resistência das culturas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 frente ao fenol.....	60
Tabela 12	Resultados obtidos dos experimentos iniciais utilizando diferentes instrumentos para aplicação de diferentes volumes do produto B (63° GL).....	62
Tabela 13	Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente ao fenol.....	63
Tabela 14	A avaliação estatística dos resultados obtidos através do Software MS Excel® variando-se os instrumentos laboratoriais.....	67
Tabela 15	A avaliação estatística dos resultados obtidos através do Software MS Excel® variando-se o tempo de incubação do inóculo.....	67
Tabela 16	Resultados obtidos utilizando o álcool etílico na forma de gel através do Método para Avaliação da Atividade Bactericida Adaptado.....	71
Tabela 17	Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente ao fenol.....	72

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABRASPEA	Associação Brasileira de Produtores e Envasadores de Álcool
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
DGHM	<i>German Society for Hygiene and Microbiology</i>
DISAD	Divisão Nacional de Produtos Saneantes Domissanitários
DL ₅₀	Dose Letal em 50% da população
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
GL	Gay-Lussac
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
L	Litro
mg/Kg	Miligrama por Kilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicilina
°C	Graus Celsius
POP	Procedimento Operacional Padrão
SBQ	Sociedade Brasileira de Queimaduras
SS	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
VRE	Enterococos resistentes à Vancomicina

ANOVA

Análise de Variância

UFC/mL

Unidades formadoras de Colônia por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOLÓGICOS.....	29
1.1.1 Parâmetros de validação aplicados aos ensaios microbiológicos qualitativos.....	30
1.1.1.1 <i>Especificidade</i>	30
1.1.2 Parâmetros de validação aplicados aos ensaios microbiológicos qualitativos.....	30
1.1.2.1 <i>Especificidade</i>	30
1.1.2.2 <i>Limite de Detecção</i>	31
1.1.2.3 <i>Robustez</i>	31
1.1.2.4 <i>Reprodutibilidade</i>	32
1.1.2.5 <i>Repetitividade</i>	32
1.1.2.5 <i>“Ruggedness”</i>	33
2 OBJETIVO GERAL.....	34
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3 METODOLOGIA.....	36
3.1 CEPAS BACTERIANAS.....	36
3.1.1 Manutenção dos microrganismos de referência para o Método da Diluição de Uso.....	36
3.1.2 Manutenção dos microrganismos de referência para o método da Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol e para o Método Adaptado para Avaliar a Atividade Bactericida do Álcool Etílico na Forma de Gel.....	36
3.2 CARREADORES.....	37
3.3 PRODUTOS	37
3.4 MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO.....	38
3.4.1 Controles de esterilidade.....	43
3.4.1.1 <i>Esterilidade do meio de subcultura</i>	43
3.4.1.2 <i>Esterilidade da água purificada</i>	43
3.4.1.3 <i>Esterilidade dos lotes de pipetas</i>	43
3.4.1.4 <i>Esterilidade dos carreadores</i>	44

3.4.2 Controle positivo.....	44
3.4.3 Controle de resistência do microrganismo.....	45
3.5 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE DESINFETANTES NAS FORMAS DE “SPRAY” E AEROSSOL.....	47
3.6 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO ÁLCOOL ETÍLICO NA FORMA DE GEL.....	49
3.6.1. Determinação da carga microbiana de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no cilindro de aço inoxidável.....	51
3.7 APLICAÇÃO DE PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS QUALITATIVOS.....	51
3.7.1 Especificidade	52
3.7.2 Repetitividade (“in-house”).....	53
3.7.3 Robustez.....	53
3.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO ADAPTADO USANDO-SE PRODUTOS DISPOSTOS À VENDA.....	55
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4 RESULTADOS.....	56
4.1 MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO.....	56
4.2 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE DESINFETANTES NAS FORMAS DE “SPRAY” E AEROSSOL.....	57
4.3 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE DESINFETANTES NA FORMA DE GEL.....	60
4.4 APLICAÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS QUALITATIVOS.....	64
4.4.1 Especificidade.....	64
4.4.2 Robustez.....	64
4.4.3. Repetitividade (“in-house”).....	69
4.1 PERFIL DOS PRODUTOS DISPOSTOS À VENDA QUANTO À EFICÁCIA.....	69
5 DISCUSSÃO.....	73
6 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A desinfecção é descrita como o processo que elimina muitos ou quase todos os microrganismos patogênicos de superfícies inanimadas com a exceção de endosporos bacterianos (RUTALA; WEBER, 1999), e os desinfetantes hospitalares são os agentes químicos amplamente utilizados para essa finalidade (RUSSEL, 1991). Em geral o pré-requisito para o sucesso da desinfecção é que esta atividade seja desenvolvida simultaneamente em diversas áreas. Assim, as superfícies de equipamentos, mobiliários, áreas hospitalares e roupa devem ser desinfetadas por agentes químicos apropriados para prevenir a disseminação dos microrganismos, além da antissepsia das mãos e o uso de uniformes adequados (BORNEFF; WERNER; DUPPRÉ, 1975). O emprego de produtos desinfetantes faz parte das práticas de controle de infecção, auxiliando na prevenção de infecções nosocomiais (McDONNELL; RUSSEL, 1999).

Os desinfetantes podem apresentar em suas formulações diferentes princípios ativos com diversos espectros de atividade (**Tabela 1**).

A seleção de um agente químico com ação antimicrobiana desejada tem sido uma das preocupações dos profissionais de saúde, considerando a diversidade de produtos existentes, a expansiva oferta de mercado, a variabilidade de orientações em termos de indicações de uso e, particularmente, no que se refere ao controle de qualidade dos mesmos (ANDRADE et al, 2007).

No Brasil, os desinfetantes estão submetidos às ações da Vigilância Sanitária através da seguinte legislação: Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976), regulamentada pelo o Decreto nº 79.094 de 05 de janeiro de 1977 (BRASIL, 1977a); Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977 (BRASIL, 1977b) e a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999 (BRASIL, 1999).

Tabela 1. Propriedades químicas dos desinfetantes líquidos^a.

Desinfetante	Ação		Diluição	Ação dos desinfetantes contra microrganismos							Outras características						Aplicação		
	Desinfetante	Esterilizante		Concentração	Inativação por matéria orgânica	Bactericida	Esporicida	Tuberculocida	Fungicida	Vírus Lipofílicos	Vírus hidrofílicos	Inflamável	Potencial explosão	Corrosivo	Irritante para a pele	Irritante respiratório	Irritante ocular	Limpeza de Superfície	Vidros sujos
Álcool (etílico isopropílico)	S	N	60-85%	+	+	-	+	+	+	+ ^b	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Cloro	S	N	100-1000 ppm	+	+	+/-	+/- ^c	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Glutaraldeído	S	S	2-5%	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Iódoforos	S	N	30-1,000ppm	-	+	-	+/-	+/-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Compostos fenólicos	S	N	0,5 - 5%	-	+	-	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Compostos de quartenário de amônio	S	N	0,5-1,5%	+	+	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

^a Para obter informações específicas como: tempo de validade, ação de limpeza, segurança em saúde e corrosão, consultar as especificações do fabricante destes produtos.

^b Álcool isopropílico é menos ativo que o álcool etílico contra vírus hidrofílicos.

^c No caso da micobactéria, o cloro tem mais efetividade em concentrações de 10.000 ppm.

Fonte: Adaptado de BARON et al,1995.

Na Lei nº 6.360/76, que dispõe sobre normas de vigilância sanitária, encontra-se:

“Art. 1º - Ficam sujeitos às normas de vigilância sanitária instituídas por esta Lei os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, definidos na Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973, bem como os produtos de higiene, os cosméticos, perfumes, saneantes domissanitários, produtos destinados à correção estética e outros adiante definidos.

(...)

Art. 3º - Para os efeitos desta Lei, além das definições estabelecidas nos incisos I, II, III, IV, V e VII do Art. 4º da Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973, são adotadas as seguintes:

(...)

VII - Saneantes Domissanitários: substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos e/ou públicos, em lugares de uso comum e no tratamento da água compreendendo:

(...)

c) desinfetantes - destinados a destruir, indiscriminada ou seletivamente, microorganismos, quando aplicados em objetos ou ambientes;

Em conformidade com as normas supracitadas, sujeitam-se às normas de vigilância sanitária, entre outros, os saneantes domissanitários, no qual se inclui o álcool etílico, porquanto ao ser utilizado para limpeza e desinfecção doméstica se enquadra no conceito de desinfetante, entendido como aquele destinado a destruir microorganismos quando aplicados em objetos inanimados ou ambientes.

A Lei Federal nº 6.437/77, dispõem sobre as infrações sanitárias no artigo 10º, incisos I, IV, XV, XVII, XVIII:

I - construir, instalar ou fazer funcionar, em qualquer parte do território nacional, laboratórios de produção de medicamentos, drogas, insumos, cosméticos, produtos de higiene, dietéticos, correlatos, ou quaisquer outros estabelecimentos que fabriquem alimentos, aditivos para alimentos, bebidas, embalagens, saneantes e demais produtos que interessem à saúde pública, sem registro, licença e autorizações do órgão sanitário competente ou contrariando as normas legais pertinentes:

Pena - advertência, interdição, cancelamento de autorização e de licença, e/ou multa.

(...)

IV - extrair, produzir, fabricar, transformar, preparar, manipular, purificar, fracionar, embalar ou reembalar, importar, exportar, armazenar, expedir, transportar, comprar, vender, ceder ou usar alimentos, produtos alimentícios, medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos, produtos dietéticos, de higiene, cosméticos, correlatos, embalagens, saneantes, utensílios e aparelhos que interessem à saúde pública ou individual, sem registro, licença, ou autorizações do órgão sanitário competente ou contrariando o disposto na legislação sanitária pertinente:

Pena - advertência, apreensão e inutilização, interdição, cancelamento do registro, e/ou multa.

(...)

XV - rotular alimentos e produtos alimentícios ou bebidas, bem como medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos, produtos dietéticos, de higiene, cosméticos, perfumes, correlatos, saneantes, de correção estética e quaisquer outros, contrariando as normas legais e regulamentares:

Pena - advertência, inutilização, interdição, e/ou multa.

(...)

XVII - reaproveitar vasilhames de saneantes, seus congêneres e de outros produtos capazes de serem nocivos à saúde, no envasilhamento de alimentos, bebidas, refrigerantes, produtos dietéticos, medicamentos, drogas, produtos de higiene, cosméticos e perfumes:

Pena - advertência, apreensão, inutilização, interdição, cancelamento do registro, e/ou multa.

(...)

XXVIII - fraudar, falsificar ou adulterar alimentos, inclusive bebidas, medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, dietéticos, saneantes e quaisquer outros que interessem à saúde pública:

Pena - advertência, apreensão, inutilização e/ou interdição do produto, suspensão de venda e/ou fabricação do produto, cancelamento do registro do produto, interdição parcial ou total do estabelecimento, cancelamento de autorização para funcionamento da empresa, cancelamento do alvará de licenciamento do estabelecimento.

A Lei nº 9.789/99, que criou o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceu em seu artigo 6º que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) tem por finalidade institucional “promover a saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária”, entre outros. E mais, o artigo 7º atribuiu as seguintes competências à Anvisa:

“Art. 7º Compete à Agência proceder à implementação e à execução do disposto nos incisos II a VII do art. 2º desta Lei, devendo:

I - coordenar o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária;

II - fomentar e realizar estudos e pesquisas no âmbito de suas atribuições;

III - estabelecer normas, propor, acompanhar e executar as políticas, as diretrizes e as ações de vigilância sanitária;

IV - estabelecer normas e padrões sobre limites de contaminantes, resíduos tóxicos, desinfetantes, metais pesados e outros que envolvam risco à saúde;

(...)

XV - proibir a fabricação, a importação, o armazenamento, a distribuição e a comercialização de produtos e insumos, em caso de violação da legislação pertinente ou de risco iminente à saúde;

(...)

XXIV - autuar e aplicar as penalidades previstas em lei”.

A legislação de caráter geral dos saneantes, a Resolução RDC nº184 de 22 de outubro de 2001, estabelece os procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários levando-se em conta a avaliação e o gerenciamento de risco, considerando parâmetros como a toxicidade das substâncias, a finalidade de uso do produto, a ocorrência de problemas anteriores, entre outros. Dessa forma, através do artigo 5º, classifica os produtos como de Risco I e de Risco II sendo que o último se refere àqueles que oferecem maior risco à população e devem ser registrados junto à Anvisa antes de serem comercializados. De acordo com § 2º da referida Resolução os produtos com atividade antimicrobiana, como os desinfetantes, pertencem à classe de Risco II, os quais devem atender a alguns requisitos como: não apresentarem efeitos comprovadamente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos; produtos com DL₅₀ oral para ratos, superiores a 200 mg/Kg de peso corpóreo para produtos líquidos e 500 mg/Kg de peso corpóreo para produtos sólidos, na diluição final de uso. Além disso, devem atender ao disposto em legislações específicas (BRASIL, 2001).

Os desinfetantes devem também atender ao disposto em legislações específicas. Para isso, faz-se necessário cumprir as normas para o registro dos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana constantes na Portaria publicada pela extinta Divisão Nacional de Produtos Saneantes Domissanitários (DISAD), a Portaria DISAD nº 15, de 23 de agosto de 1988, (BRASIL, 1988), e também as normas específicas da

Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007), que revoga alguns itens da Portaria DISAD nº 15/88, como as definições e as classificações dos produtos.

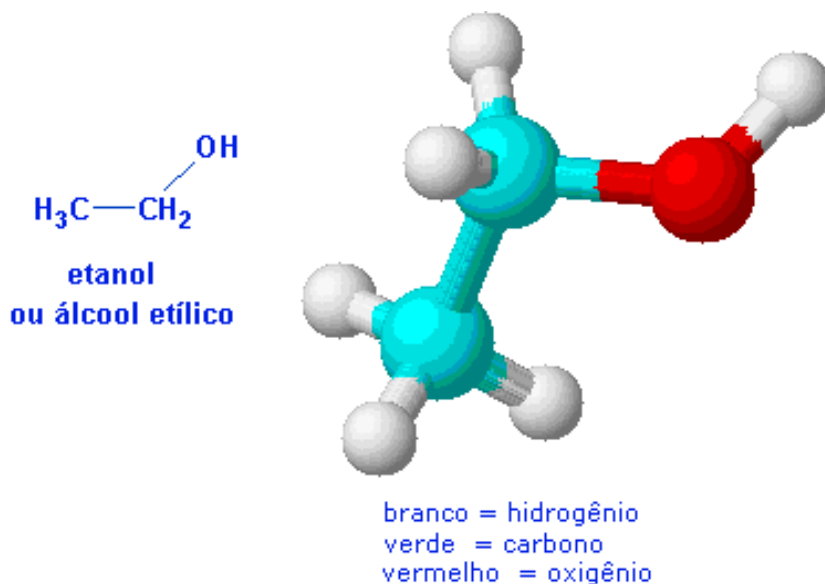
A Resolução RDC nº 14/2007 foi editada, principalmente, devido à necessidade de compatibilizar os regulamentos nacionais com os instrumentos harmonizados no Mercado Comum do Sul (Mercosul). Essa resolução tem como objetivo definir, classificar e regulamentar as condições para registro e rotulagem dos produtos com ação antimicrobiana a serem comercializados no Brasil. Este regulamento técnico compreende os produtos com ação antimicrobiana destinados ao uso em objetos, sobre superfícies inanimadas e ambientes, em domicílios, em indústrias, em hospitais, em locais de manipulação de alimentos, em estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde e em locais ou estabelecimentos públicos ou privados. Os produtos com ação antimicrobiana estão classificados de acordo com o âmbito de aplicação em: uso geral (produtos para uso domiciliar e em ambientes públicos), uso hospitalar (produtos para uso exclusivo em hospitais e estabelecimentos relacionados com atendimento à saúde), uso em indústria alimentícia e afins (produtos destinados a serem utilizados em locais dedicados à produção/elaboração, fracionamento ou manipulação de alimentos) e uso específico (produtos destinados a serem utilizados com fim específico, segundo as indicações de rótulo). Segundo essa resolução, o desinfetante é definido como “produto que mata todos os microrganismos patogênicos mais não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas” (BRASIL, 2007).

Particularmente em relação aos álcoois é oportuno destacar que são amplamente utilizados nas práticas em saúde como anti-séptico na pele de pacientes, na higienização das mãos de profissionais de saúde e como desinfetante de artigos e superfícies (ANDRADE et al, 2007). Além disso, são utilizados em domicílios, porém para consumo doméstico é proibida a venda de álcool líquido através do substitutivo ao Projeto de Lei 692/07 (DLG, 2007).

Do ponto de vista químico, os álcoois são constituídos por um grupo hidroxila, ligado a um radical alquila. O álcool etílico ou etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (**Figura 1**) e o isopropílico (2-propanol) apresentam reconhecida aplicabilidade na área da saúde (BLOCK, 2001, ANDRADE et al, 2007). O álcool etílico, um dos principais álcoois com

atividade antimicrobiana é incolor, inflamável e de odor característico. Pode ser obtido através da fermentação dos açúcares, fornecendo após a destilação, o álcool comum a 96° GL (Gay-Lussac) que corresponde à mistura de 96% de etanol e 4% de água, em volume. Deste álcool é obtido o álcool 99° GL por destilação azeotrópica com ciclohexano. A partir de então surgiram duas expressões bastante usadas: álcool anidro e álcool desnaturado (ou denaturado). O primeiro, também conhecido como álcool absoluto, é o álcool isento de água. O segundo é o álcool comum ao qual adiciona-se substâncias com odor ou sabor desagradáveis (denaturante), para evitar o uso indevido pelo consumidor final (SANTOS, 2004).

Figura 1. Estrutura molecular do etanol ou álcool etílico.



Fonte: disponível em <http://www.uces.br/.../textos_interativos_06.htm>

Apesar dos álcoois possuírem muitos aspectos desejados para a formulação de um desinfetante ou anti-séptico, pouco é conhecido sobre o modo específico de ação dos mesmos, porém baseado em um aumento da eficácia em presença de água acredita-se que cause danos à membrana e rápida desnaturação de proteínas, com subsequente interferência no metabolismo e lise celular. Os álcoois, para possuírem

atividade bactericida, têm que ser diluídos em água, numa faixa de 60% a 90% p/p, sendo a concentração de 70% p/p a mais indicada em função do baixo custo e alta atividade (LARSON, 1995). Eles têm excelente atividade germicida “in vitro” contra Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo patógenos multirresistentes como MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e VRE – enterococos resistentes à vancomicina, e vários fungos. Certos vírus envelopados (lipofílicos) são susceptíveis aos álcoois quando testados “in vitro” (herpes simples, vírus da imunodeficiência humana, vírus influenza, vírus sincicial respiratório e vírus vaccínia).

Os álcoois não possuem atividade contra esporos, oocistos de protozoários e certos vírus não envelopados (não lipofílicos). O vírus da hepatite B é um vírus envelopado menos susceptível ao álcool, mas consegue ser inativado pelo álcool a 60-70%, o que provavelmente também ocorre com o vírus da hepatite C (KAWAGOE, 1994).

Para Larson (1995) a maior desvantagem do álcool utilizado para antissepsia da pele é o seu efeito desidratante. Uma segunda desvantagem é a sua volatilidade e inflamabilidade e conseqüentemente cuidados em relação ao seu armazenamento devem ser tomados para que acidentes sejam evitados.

De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), no Brasil, cerca de 150 mil pessoas por ano são vítimas de queimaduras provocadas por acidentes com álcool líquido, sendo que um terço desse total são crianças (**Figura 2**).

Figura 2. Vítimas de queimaduras com álcool líquido.



Fonte: disponível em <<http://www.pgr.mpf.gov.br/pgr/saude/textos/alcool.htm>>

O artigo 5º, § 2º, da Resolução RDC nº184, de 22 de outubro de 2001, estabelece os procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários e classifica os produtos com atividade antimicrobiana para efeito de registro como de Risco II. Esses produtos devem atender alguns requisitos como: não apresentarem efeitos comprovadamente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos; produtos com DL₅₀ oral para ratos, superiores a 200 mg/Kg de peso corpóreo para produtos líquidos e 500 mg/Kg de peso corpóreo para produtos sólidos, na diluição final de uso. Além disso, devem atender ao disposto em legislações específicas.

Segundo a Portaria DISAD nº 15/88, VII, “Todos os produtos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana somente serão registrados e autorizados para uso mediante a comprovação de sua eficácia aos fins propostos, através de análise prévia realizada com o produto acabado e nas diluições de uso indicadas pelo fabricante. Os exames serão realizados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ministério da Saúde, ou laboratórios oficiais credenciados para este fim, obedecidos os métodos e procedimentos do INCQS/Fiocruz”.

O principal propósito de avaliar a eficácia de um desinfetante é verificar se o produto cumpre o objetivo a que se propõe. Um dos problemas ao se testar a eficácia está na escolha do método a ser utilizado, visto que desinfetantes e anti-sépticos têm sido avaliados desde os primórdios da bacteriologia, porém não existe ainda um método geral, internacionalmente aceito (HUGO, 1978). Os inúmeros métodos diferem de um país para outro, se baseiam em diferentes princípios e podem ser classificados em três categorias: testes “in vitro” ou testes preliminares, testes práticos e testes de campo (REYBROUCK, 1975, ROMÃO, 1985). A eficácia dos desinfetantes testada em diferentes países por diferentes métodos leva a diferentes resultados e conseqüentemente uma determinada formulação pode vir a ser registrada em um país e não ser aceita em outro (REYBROUCK, 1975).

Atualmente no Brasil a metodologia ainda adotada, apesar da edição da Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007), para avaliação da

atividade antimicrobiana segue as determinações da “Association of Official Analytical Chemist” (AOAC) (SINGLETON, 2000), sendo utilizado o Método da Diluição de Uso para todos os desinfetantes na forma líquida, classificados de acordo com o local de aplicação, como de uso geral, para indústria alimentícia, para lactários e hospitalares para superfície e artigos não críticos.

A Anvisa, criada pela Lei nº 9782/99, fundamentada em estudos e dados científicos obtidos pela SBQ publicou a Resolução RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002, considerando os riscos oferecidos à saúde pública decorrentes de acidentes por queimaduras e ingestão, principalmente em crianças, em virtude da apresentação na forma líquida do álcool etílico, e encontrado à venda por atacadistas e varejistas do álcool etílico hidratado e anidro, em todas as graduações. Segundo essa Resolução, o álcool etílico com graduações superiores a 54º GL ou 46º INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas) deve ser comercializado unicamente em solução coloidal na forma de gel desnaturada e no volume máximo de 500 g em embalagens resistentes (BRASIL, 2002).

A Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990, a Lei Orgânica da Saúde que regulamenta o Sistema Único de Saúde (SUS) define em seu artigo 6º, § 1º, I, que por Vigilância Sanitária entende-se o conjunto de ações capaz de prevenir, diminuir ou eliminar riscos à saúde, abrangendo o “controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionam com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo” (BRASIL, 1990). Sendo assim, a medida tomada pela Anvisa, por meio da Resolução RDC nº 46/02 realiza o sentido das disposições constitucionais, uma vez que o risco de agravos à saúde deve ser reduzido pela ação do Estado, mediante políticas sociais e econômicas e, da sua atuação como órgão responsável pela saúde pública.

Segundo informação divulgada pela SBQ, nos primeiros meses de validade da RDC nº 46/02 foi identificada uma redução entre 60% e 65% nos acidentes com álcool líquido, principalmente envolvendo crianças. O álcool em gel é considerado mais seguro, pois não é altamente inflamável e não propaga o fogo rapidamente (ANVISA, 2003).

Essa redução significa também um menor custo para o Estado com tratamento, uma vez que acidentes com álcool líquido provocam graves sequelas estéticas, psicológicas e em alguns casos funcionais, levando 3% dos pacientes internados a óbitos. Segundo a SBQ, o custo diário do tratamento de um paciente com lesões graves é de R\$ 1.200 a R\$ 1.500, sem levar em conta a reabilitação e os custos indiretos (ANVISA, 2003).

Quando a Anvisa editou a RDC nº 46, em 2002, os fabricantes de álcool líquido tiveram o prazo de seis meses para se adaptarem as novas exigências. A solução encontrada foi transformar a forma física do álcool, até então na forma líquida, em um gel e alterar a sua propriedade organoléptica, deixando-o com um gosto amargo que provocasse repulsão ao paladar. Isto foi possível através da adição de um carbômero para torná-lo mais espesso e da adição do desnaturante (SANTOS, 2004). No entanto, um grupo de fabricantes de álcool afiliados a Associação Brasileira de Produtores e Envasadores de Álcool (ABRASPEA) recorreu a Justiça e foi concedida uma liminar, em favor deste, permitindo novamente a comercialização do álcool líquido em concentrações acima de 54° GL (46° INPM), provocando um retrocesso e fazendo com que o número de acidentes voltasse a crescer. Mas, surpreendentemente, foi aprovada em 31 de outubro de 2007, pela Comissão de Defesa do Consumidor do Senado a proibição da venda de álcool líquido para consumo doméstico, prevista em substitutivo do deputado Barbosa Neto (PDT-PR) ao Projeto de Lei 692/07. O substitutivo permite a venda de álcool líquido apenas em farmácias e drogarias, até o volume de 50 mL. Na prática, o produto só poderia ser adquirido por entidades como laboratórios científicos e consultórios médicos. O substitutivo aprovado legaliza a exigência feita em 2002 pela Anvisa de que o produto fosse vendido na forma de gel. O projeto, que tramita em caráter conclusivo, será encaminhado para as comissões de Seguridade Social e Família; e de Constituição e Justiça e de Cidadania, para se transformar em lei (DLG, 2007).

No comércio existiam produtos à base de álcool etílico, na concentração de 70% p/p, vendidos como desinfetantes hospitalares para superfícies fixas, que hoje são substituídos por formulações na forma de gel. Segundo considerações da Anvisa (BRASIL, 2002), quando esses produtos possuem finalidades de higienização ou

desinfecção, conforme a Lei nº 6.360/76, são considerados saneantes. E quando a concentração do álcool estiver entre 68% e 72% p/p, trata-se de um produto saneante com ação antimicrobiana e para ser registrado deverá comprovar a sua eficácia contra os microrganismos especificados para a sua finalidade de uso.

Produtos à base de álcool na forma de gel foram introduzidos recentemente em hospitais de todo o mundo como anti-sépticos para mãos (KRAMER et al, 2002, MACDONALD, 2004) porém, existe ainda muita controvérsia sobre a eficácia desses produtos. Alguns autores o elegem como excelente devido ao ótimo espectro de ação, a falta de necessidade de lavagens com água, a possível facilidade de acesso (ao lado dos leitos) e a rápida ação (PAULSON et al, 1999, PITTET, 2001). Outros discutem que as aplicações sucessivas do produto nas mãos provocam um efeito cumulativo indesejável, promovendo a formação de uma camada espessa rica em resíduos e matéria orgânica (incluindo microrganismos vivos) que tendem a interferir na eficácia desse tipo de produto (PRESSLY, 2000, KRAMER et al, 2002), sendo inclusive recomendado nos rótulos que o usuário deverá lavar as mãos com água e sabão após 10 a 15 aplicações.

Organizações internacionais ainda não dispõem de metodologia padronizada para produtos na forma de gel, principalmente por estes produtos possuírem fatores interferentes como a volatilidade e a viscosidade do gel. No Brasil existem poucos estudos que ajudem a esclarecer aspectos como a concentração de álcool na forma de gel mais indicada para desinfecção e antissepsia, os métodos que avaliem a atividade antimicrobiana e os métodos que determinem o teor do princípio ativo (álcool etílico) presente nas diferentes formulações dispostas à venda.

A publicação da RDC 14/02 e o fato de não haver um método definido para verificar a eficácia do álcool na forma de gel, como desinfetante, foram fatores determinantes para o desenvolvimento de uma técnica microbiológica que pudesse demonstrar a atividade antimicrobiana desse tipo de produto. Porém, a determinação de um método analítico acarreta em outra etapa integrante do sistema da qualidade, que corresponde à validação. Validação, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2000) é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos

pretendidos foram atendidos. A validação de métodos de ensaios é de fundamental importância para comprovar que o método não normalizado desenvolvido é capaz de obter resultados tecnicamente válidos e inter-comparáveis.

1.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOLÓGICOS

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado fazer” (USP 30, 2007). A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas e biológicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida para registro de novos produtos pelos órgãos reguladores do Brasil e de outros países (RIBANI et al, 2004).

A preparação de um plano de validação começa pela definição dos critérios que serão usados para avaliar o desempenho do método, sendo que determinado grupo de critérios nem sempre serão aplicados a todos os métodos, processos e procedimentos (BUDOWLE et al, 2008).

Segundo a United State Pharmacopeia (USP 30, 2007) existem três importantes tipos de testes microbiológicos para determinações específicas. Estes incluem testes para determinar se microrganismos estão presentes em uma amostra, testes para quantificar o número de microrganismos e testes elaborados para identificar microrganismos. Nos testes qualitativos é verificada a presença ou ausência de microrganismos através da turvação do meio de cultura líquido, e o principal exemplo deste é o teste de esterilidade.

De acordo com a USP 30 (2007), a validação de um método microbiológico é o processo pelo qual experimentalmente é estabelecido que o desempenho característico do novo método apresenta de modo a satisfazer os requisitos para a aplicação pretendida em comparação ao método tradicional. A validação de métodos

microbiológicos compartilha alguns parâmetros tradicionalmente aplicados aos métodos analíticos de ensaios químicos (**Tabela 2**).

1.1.1 Parâmetros de validação aplicados aos ensaios microbiológicos qualitativos

1.1.1.1 *Especificidade*

A especificidade de um método qualitativo microbiológico é a habilidade de detectar uma faixa de microrganismos que deve estar presente no teste. Isto está diretamente relacionado à promoção do crescimento do meio de cultura para o método qualitativo que demonstra presença ou ausência de microrganismo (USP 30, 2007).

1.1.2 Parâmetros de validação aplicados aos ensaios microbiológicos qualitativos

1.1.2.1 *Especificidade*

A especificidade de um método qualitativo microbiológico é a habilidade de detectar uma faixa de microrganismos que deve estar presente no teste. Isto está diretamente relacionado à promoção do crescimento do meio de cultura para o método qualitativo que demonstra presença ou ausência de microrganismo (USP 30, 2007).

Tabela 2. Parâmetros analíticos necessários para validação de acordo com o tipo de ensaio microbiológico, segundo a USP 30.

Parâmetros	Ensaio Qualitativo	Ensaio Quantitativo
<i>Acurácia</i>	Não	Sim
<i>Precisão</i>	Não	Sim
<i>Especificidade</i>	Sim	Sim
<i>Limite de detecção</i>	Sim	Sim
<i>Limite de quantificação</i>	Não	Sim
<i>Linearidade</i>	Não	Sim
<i>Faixa de trabalho</i>	Não	Sim
<i>Robustez</i>	Sim	Sim
<i>Repetitividade</i>	Sim	Sim
<i>Ruggedness</i>	Sim	Sim

1.1.2.2 Limite de Detecção

O limite de detecção é o menor número de microrganismos em uma amostra que pode ser detectado sob determinadas condições experimentais. Um teste de limite microbiológico determina a presença ou ausência de microrganismos, por exemplo, ausência de *Salmonella* spp em 10g (USP 30, 2007).

1.1.2.3 Robustez

Segundo a USP 30 (2007) a robustez é definida como medida da capacidade do método não ser afetado por pequenas, porém deliberadas variações em alguns

parâmetros do método, fornecendo uma indicação da confiabilidade de seu uso. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. As modificações introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas, equipamentos, etc.

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. A definição de robustez é um exemplo de divergência. A “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) utiliza o mesmo conceito de robustez para a palavra “ruggedness”. A USP também utiliza o termo “ruggedness” para robustez, mas com uma definição diferente que lembra a reprodutibilidade (RIBANI et al, 2004).

1.1.2.4 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é a proximidade de concordância entre os resultados de medições sucessivas do mesmo analito sob condições similares, mas não necessariamente condições idênticas (BUDOWLE et al, 2008). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias, procedimentos do CODEX, etc (RIBANI et al, 2004).

1.1.2.5 Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição,

chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Por outro lado, a Anvisa utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade (RIBANI et al, 2004).

1.1.2.5 “*Ruggedness*”

É o nível de precisão dos resultados do teste obtidos pela análise da mesma amostra sob variadas condições normais do teste, como diferentes analistas, instrumentos, lotes de reagentes, e laboratórios. A “*ruggedness*” pode ser definida como a resistência intrínseca que exerce influência através de variáveis operacionais e do meio ambiente nos resultados do método microbiológico (USP 30, 2007).

2 OBJETIVO GERAL

Os saneantes domissanitários com ação antimicrobiana constituem uma categoria de produtos, sujeita ao regime de vigilância sanitária, que têm como objetivos principais promover a desinfecção ou esterilização de superfícies, objetos inanimados, em ambientes domésticos, coletivos e hospitalares. Considerando a ampla utilização do álcool como um produto desinfetante e a publicação da Resolução RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002 determinando que o álcool etílico com graduações superiores a 54° GL ou 46° INPM devem ser comercializados unicamente em soluções coloidais na forma de gel, se faz necessária a determinação de um método para avaliar a atividade antimicrobiana do álcool na forma de gel levando-se em conta o direito do consumidor em proteger seus interesses econômicos, a vida, a saúde e a segurança contra os riscos provocados por práticas no fornecimento de produtos considerados nocivos à saúde.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar a atividade antimicrobiana de uma formulação de álcool etílico a 70% (v/v), na forma líquida manipulado em nosso laboratório através do método da Diluição de Uso;
- avaliar a atividade antimicrobiana de uma formulação de álcool etílico a 70% (v/v), na forma líquida manipulado em nosso laboratório através do método para a Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol;
- avaliar a atividade antimicrobiana do álcool etílico na forma de gel adaptando a metodologia de avaliação da atividade antimicrobiana aplicada para produtos em “Spray” e aerossol;

- determinar o volume mínimo, de álcool etílico na forma de gel em diferentes concentrações, que ainda apresenta atividade antimicrobiana;
- realizar estudos que permitam a validação do método analítico desenvolvido para comprovação da eficácia do álcool etílico na forma de gel, para que este possa ser utilizado oficialmente no INCQS.

3 METODOLOGIA

3.1 CEPAS BACTERIANAS

Neste trabalho foram utilizadas as cepas de referência de *Staphylococcus aureus* INCQS nº 00039 (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* INCQS nº 00028 (ATCC 10708) e *Pseudomonas aeruginosa* INCQS nº 00025 (ATCC 15442), preconizadas nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) (BELOIAN, 1990), fornecidas pelo Laboratório de Microrganismos de Referência do INCQS.

3.1.1 Manutenção dos microrganismos de referência para o Método da Diluição de Uso

As cepas de referência foram crescidas em ágar nutriente inclinado e após incubação por 48 h a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ estocadas em geladeira a 4°C por um mês, quando eram substituídas por novos crescimentos dos microrganismos obtidos com repiques mensais da cultura. As culturas foram renovadas semestralmente através da abertura de novas ampolas contendo microrganismos liofilizados. Os microrganismos liofilizados presentes nessas ampolas foram reconstituídos de acordo com as recomendações do “American Type Culture Collection” (ATCC, 2008).

3.1.2 Manutenção dos microrganismos de referência para o método da Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol e para o Método Adaptado para Avaliar a Atividade Bactericida do Álcool Etilíco na Forma de Gel

As cepas de referência foram crescidas em ágar nutriente inclinado e após incubação por 24 h a $36 \pm 1^\circ \text{C}$, estocadas em geladeira a 4°C por um mês quando eram substituídas por novos crescimentos dos microrganismos obtidos com repiques mensais da cultura. As culturas foram renovadas semestralmente através da abertura de novas ampolas contendo os microrganismos liofilizados, que foram reconstituídos segundo recomendações da AOAC (SINGLETON, 2000).

3.2 CARREADORES

Para o Método da Diluição de Uso foram utilizados cilindros estéreis de aço inoxidável tipo 304, SS18-8, polidos, adquiridos da Fischer Scientific. Para o Método da Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol, e para o Método Adaptado para Avaliação da Atividade Bactericida do Álcool Etílico na Forma de Gel foram utilizadas lamínulas de vidro para microscopia medindo de 24 x 24 mm, não corrosiva, espessura 0,13 – 0,16 mm (GlassTécnica).

3.3 PRODUTOS

➤ Álcool Etílico na Forma Líquida

A cada experimento de avaliação da atividade antimicrobiana do álcool etílico na forma líquida foi preparado no próprio laboratório 1L de álcool etílico a 70% (v/v), a partir do álcool comercial a 92,8 INPM diluído com água destilada purificada estéril. Nesse trabalho o álcool manipulado no laboratório foi identificado como **produto F**.

➤ Álcool Etílico na Forma de Gel

Os experimentos para a avaliação da atividade antimicrobiana foram conduzidos empregando-se produtos adquiridos no comércio, apresentando diferentes concentrações. Esses foram identificados como produtos A, B, C, D e E, e estão descritos a seguir:

- Produtos {
- A. Alcool etílico a 54° GL (46° INPM)
 - B. Alcool etílico a 63° GL (65° INPM)
 - C. Alcool etílico a 77° GL (70° INPM)
 - D. Alcool etílico a 77° GL (70° INPM)
 - E. Alcool etílico a 82° GL (75° INPM)

O Produto D foi o único álcool etílico na forma de gel, encontrado no comércio, que possuía registro no Ministério da Saúde do Brasil.

3.4 MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO

Esse método foi utilizado para comprovar a eficácia do álcool etílico a 70% (v/v) manipulado no laboratório. O Método da Diluição de Uso foi realizado segundo a AOAC (BELOIAN, 1990) e o POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b) que estabelecem a metodologia a ser adotada para a avaliação da atividade bactericida de desinfetantes na forma líquida.

A partir das culturas estocadas foram realizados 3 repiques consecutivos. Estes foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas em 10 mL de Caldo Nutriente para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, para *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. O 4º repique consecutivo, a ser utilizado no ensaio, foi preparado através da inoculação de no mínimo 7 tubos contendo 10 mL de caldo nutriente incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas (**Figura 3**). Após o tempo de incubação, as culturas testes foram agitadas e reunidas em um frasco estéril, e distribuídas em alíquotas de 20 mL em 6 tubos 25 x 150 mm estéreis (**Figura 4**). Foram então transferidos 11 cilindros de aço inox, com auxílio do gancho de transferência para

cada 10 mL da cultura teste de 48 h, onde permaneceram submersos por 15 minutos à temperatura ambiente (**Figura 4**). Após esse tempo de contato, utilizando-se o gancho flambado, os 11 cilindros foram cuidadosamente dispostos verticalmente em placa de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro Whatman nº 2, e as placas foram levadas à estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 40 minutos (**Figura 5**).

Figura 3. Etapa inicial da preparação do inóculo realizada a partir das culturas estocadas para o Método da Diluição de Uso - POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

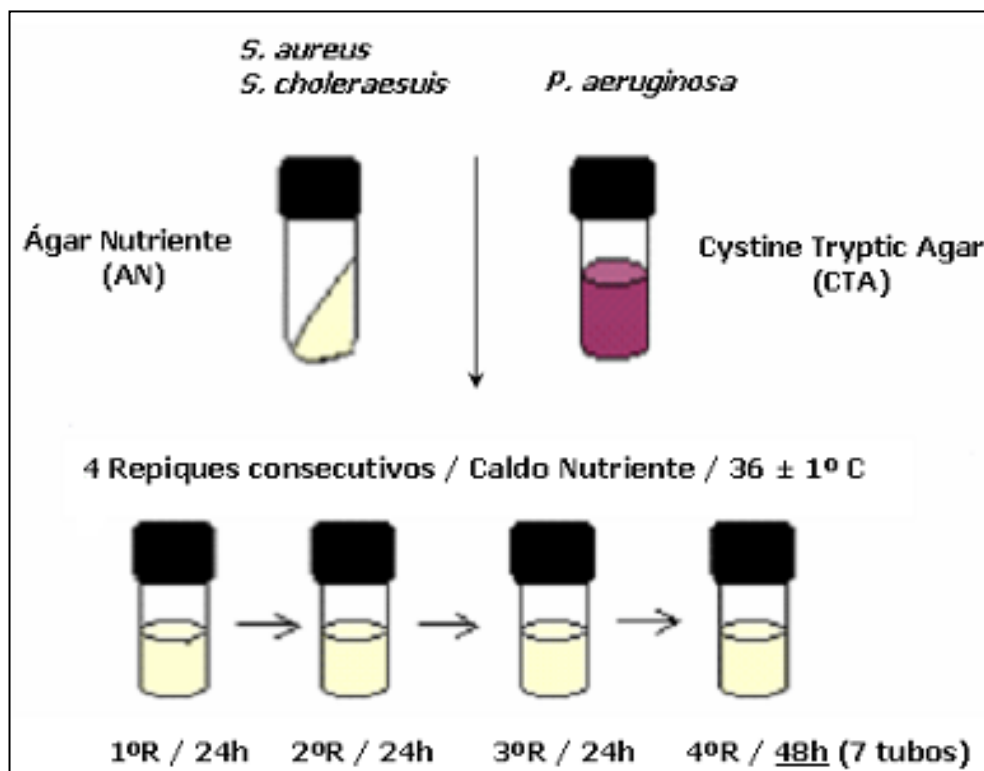


Figura 4. Esquema dos procedimentos empregados no preparo do inóculo, utilizado no ensaio do Método da Diluição de Uso - POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b) a partir do 4º repique após incubação a 36 ± 1 °C por 48 h.

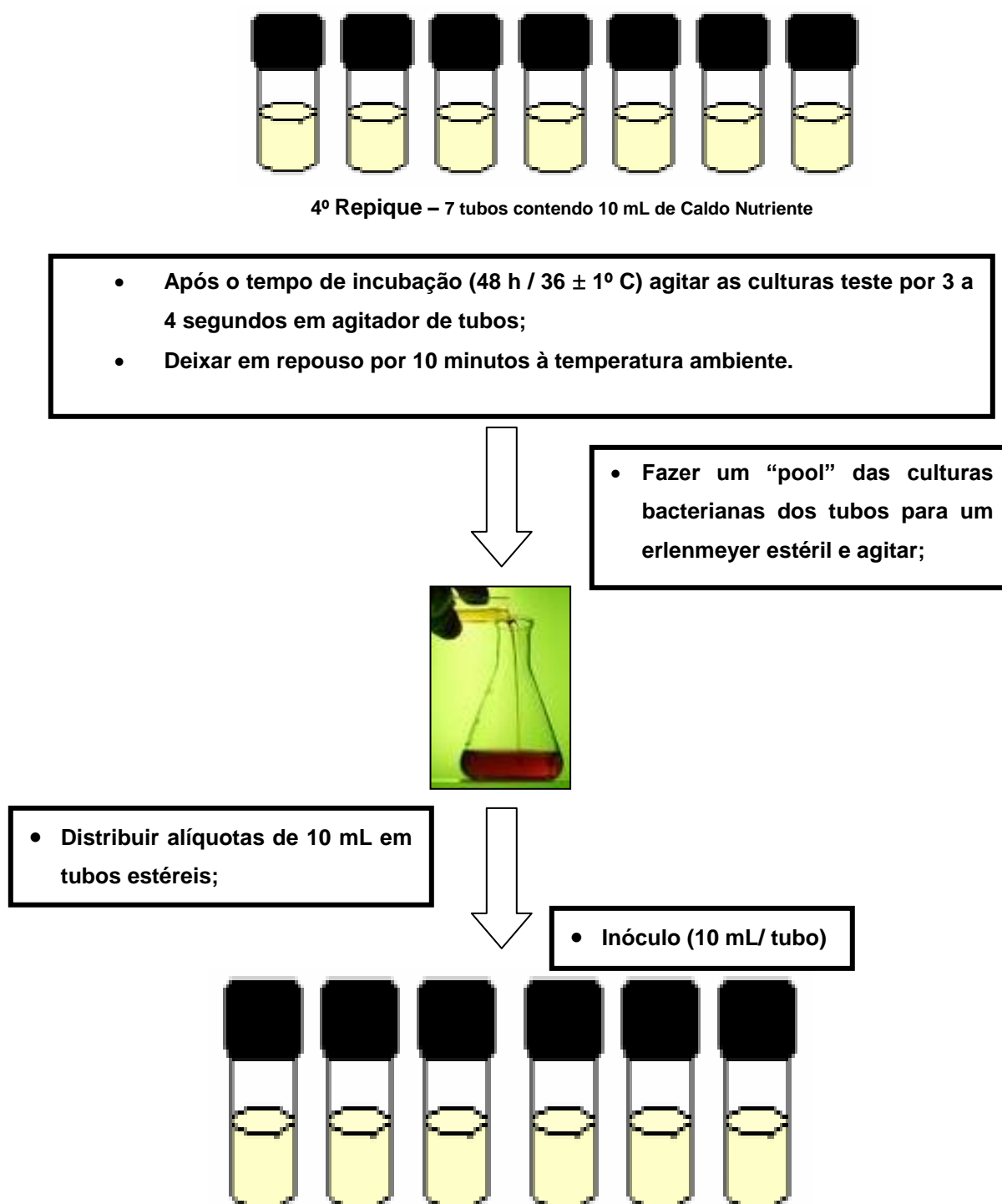
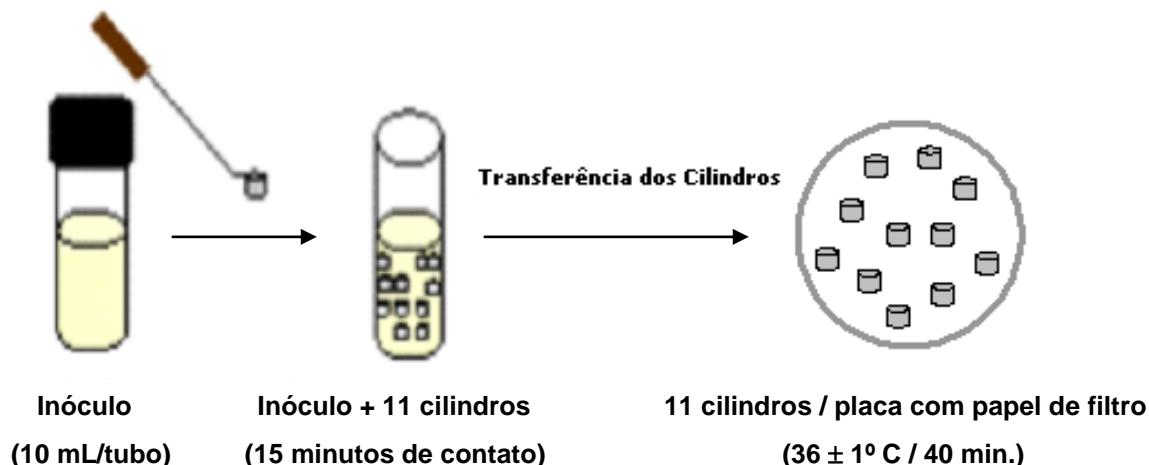


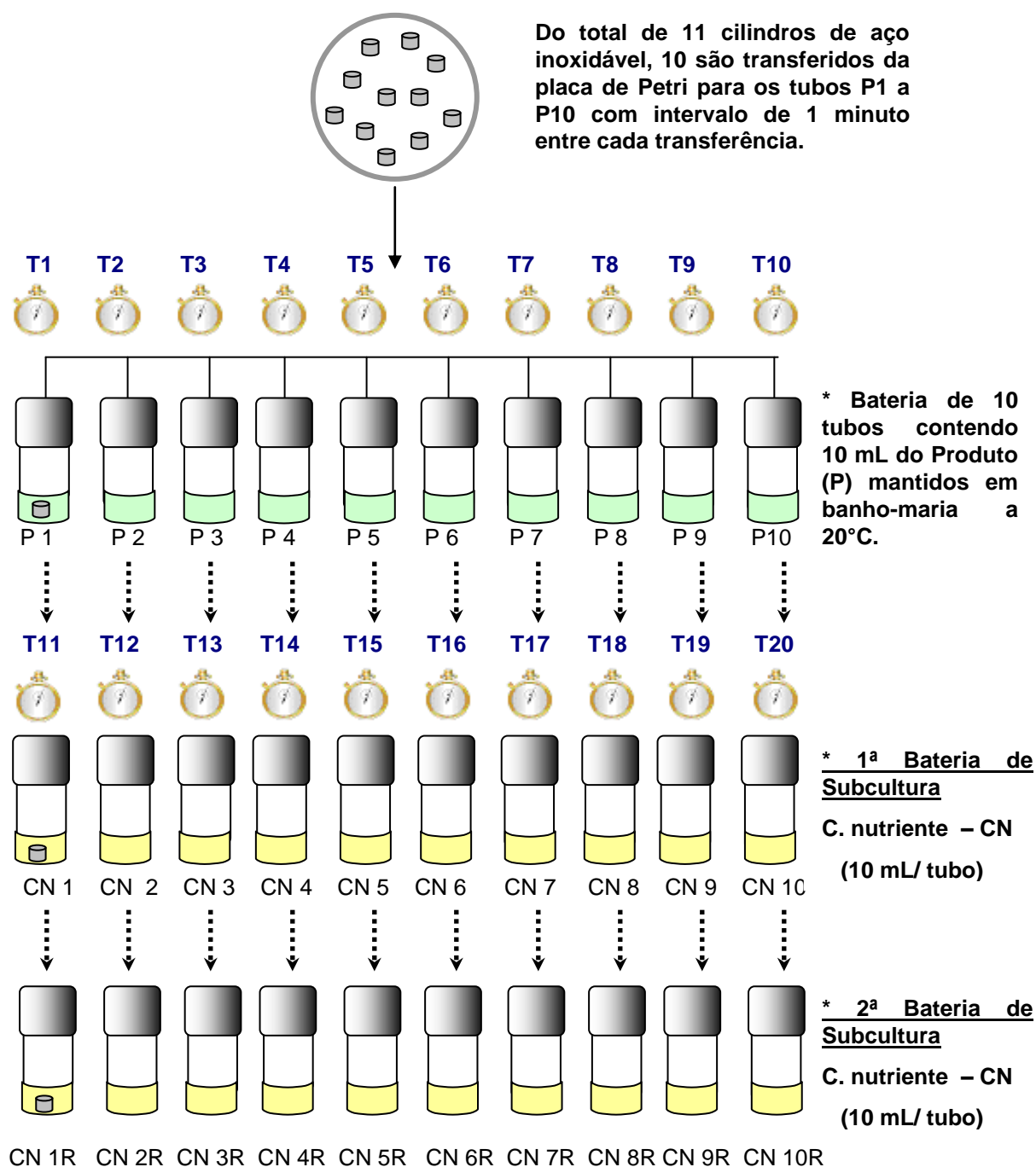
Figura 5. Transferência dos cilindros entre tubos no Método da Diluição - POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).



Cada um dos cilindros foi transferido assepticamente e cronometradamente, com intervalo de 1 minuto, para cada um dos 10 tubos contendo 10 mL do produto à temperatura de 20°C. Após o tempo de exposição de 10 minutos, os cilindros foram transferidos para os 10 tubos contendo 10 mL de caldo nutriente. Após 10 minutos, a contar da transferência do último cilindro para o tubo com o caldo nutriente, foram novamente transferidos para tubos contendo 10 mL do mesmo meio de subcultura e os 20 tubos de meio de cultura foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Esse procedimento foi realizado utilizando-se no total 60 cilindros de aço inoxidável perfazendo 120 tubos contendo o meio de subcultura e que foram incubados (**Figura 6**).

Para leitura do ensaio foi observada a ausência ou a presença de crescimento, após incubação, através da turvação do meio de cultura. O produto, para ser considerado satisfatório, deveria ser capaz de matar o microrganismo teste em 59 dos 60 cilindros utilizados, o que confere um nível de confiança de 95%. O ensaio foi repetido de acordo com os critérios preconizados no POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

Figura 6. Esquema da transferência dos cilindros entre tubos utilizados no Método da Diluição de Uso - POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b). T indica o tempo de transferência, T1 corresponde ao momento que o cronômetro marca o tempo 1 minuto, quando o 1º cilindro é transferido para o 1º tubo contendo o produto em estudo (P1); após um minuto (T2) outro cilindro é transferido para o 2º tubo contendo o produto e assim sucessivamente. O último cilindro é transferido no tempo T10 ao tubo P10 e no minuto seguinte o 1º cilindro, que se encontra no tubo P1 que terá totalizado 10 minutos de contato com o produto, é transferido no tempo T11 para o 1º tubo contendo o meio de cultura (CN 1). No tempo T12 o 2º cilindro é transferido do tubo T12 para o tubo CN2 e assim sucessivamente.



3.4.1 Controles de esterilidade

Todo material envolvido no ensaio foi testado quanto sua esterilidade, evitando a ocorrência de resultado falso-positivo. Os controles realizados nos ensaios estão descritos abaixo:

3.4.1.1 Esterilidade do meio de subcultura

A esterilidade dos meios de subcultura foi verificada através da incubação, a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas, de um tubo do mesmo lote do meio de subcultura utilizado no ensaio, e não deve ser observado crescimento microbiano (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

3.4.1.2 Esterilidade da água purificada

Neste procedimento foi adicionado 0,2 mL da água purificada estéril, usada para diluir o produto F, a um tubo contendo o meio de subcultura utilizado no ensaio e incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas, e não deve ser observado crescimento microbiano. (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

3.4.1.3 Esterilidade dos lotes de pipetas

Conforme o POP INCQS nº 65.3210.007 foi separada uma pipeta de cada lote utilizado no ensaio e com o auxílio de um pipetador automático realizada a aspiração do meio de subcultura até acima da marcação da graduação, permitindo logo em seguida,

a saída do líquido para o mesmo tubo. Este procedimento foi repetido 3 vezes. O tubo foi incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas, e não deve ser observado crescimento microbiano (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

3.4.1.4 *Esterilidade dos carreadores*

Um cilindro estéril, do lote empregado no ensaio, foi transferido para um tubo contendo o meio de subcultura utilizado no ensaio e incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas, e não deve ser observado crescimento microbiano (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

3.4.2 Controle positivo

Os controles positivos são obtidos pela inoculação de cepas microbianas aos meios de cultura e aos meios de cultura acrescidos do produto, permitindo verificar tanto a adequação dos meios de cultura em promover o crescimento de microrganismos, como verificar a presença de atividade inibitória do produto sobre o crescimento microbiano e a eficiência do sistema inativador.

Destinam-se a evitar a ocorrência de um resultado falso-negativo, ou seja, uma cultura produto contaminado ser considerado estéril pelo fato do meio de cultura não permitir o desenvolvimento de contaminantes, ou devido à presença de substâncias inibidoras do crescimento que não foram adequadamente inativadas.

Os controles positivos foram obtidos através da verificação da viabilidade do meio de subcultura. Um cilindro contaminado e seco foi transferido para um tubo contendo o mesmo lote do meio de subcultura utilizado no ensaio. Este foi incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas. Após esse tempo de incubação a evidência de crescimento é observada através da turvação do meio de subcultura (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

3.4.3 Controle de resistência do microrganismo

As culturas teste foram verificadas quanto à resistência ao fenol, como descrito no POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b). A partir da solução estoque de fenol a 5% (1:20) foram preparadas soluções a 1:60 e 1:70 para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (**Tabela 3**), 1:80 e 1:90 para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (**Tabela 4**) e 1:90 e 1:100 para *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 (**Tabela 5**), diretamente nos tubos, utilizando água purificada estéril. Os tubos contendo as soluções de fenol e os tubos com as culturas teste foram colocados em banho de água a 20°C. Foi adicionado 0,5 mL da cultura teste ao tubo contendo a maior concentração da solução de fenol, de acordo com a solução preparada, conforme o microrganismo utilizado (1:60 – *S. aureus*, 1:80 - *P. aeruginosa* e 1:90 – *S. choleraesuis*), e após o intervalo de 1 minuto foi realizado o mesmo procedimento com o tubo contendo a menor diluição do fenol. Após cada adição o tubo foi agitado delicadamente e recolocado no banho de água a 20°C. Após exatamente 5 minutos de contato da primeira semente foi transferido uma alçada, com auxílio de uma alça de transferência de 4 mm de diâmetro, da mistura da mistura da maior concentração de fenol com a cultura teste para um tubo contendo 10 mL de caldo nutriente. Após 1 minuto foi realizada a mesma operação com o tubo contendo a mistura da solução de menor concentração com a cultura. Esta operação foi repetida para os tempos de contato correspondentes a 10 e 15 minutos. Os tubos foram agitados e incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

Tabela 3. Perfil de resistência padrão para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente ao fenol (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

Fenol	Tempo de Contato (min)		
	5'	10'	15'
1:60	(P) ou (N)	(P) ou (N)	(N)
1:70	(P)	(P)	(P)

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 4. Perfil de resistência padrão para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 frente ao fenol (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

Fenol	Tempo de Contato (min)		
	5'	10'	15'
1:80	(P) ou (N)	(P) ou (N)	(N)
1:90	(P)	(P)	(P)

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 5. Perfil de resistência padrão para *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 frente ao fenol (MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

Fenol	Tempo de Contato (min)		
	5'	10'	15'
1:90	(P) ou (N)	(P) ou (N)	(N)
1:100	(P)	(P)	(P) ou (N)

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

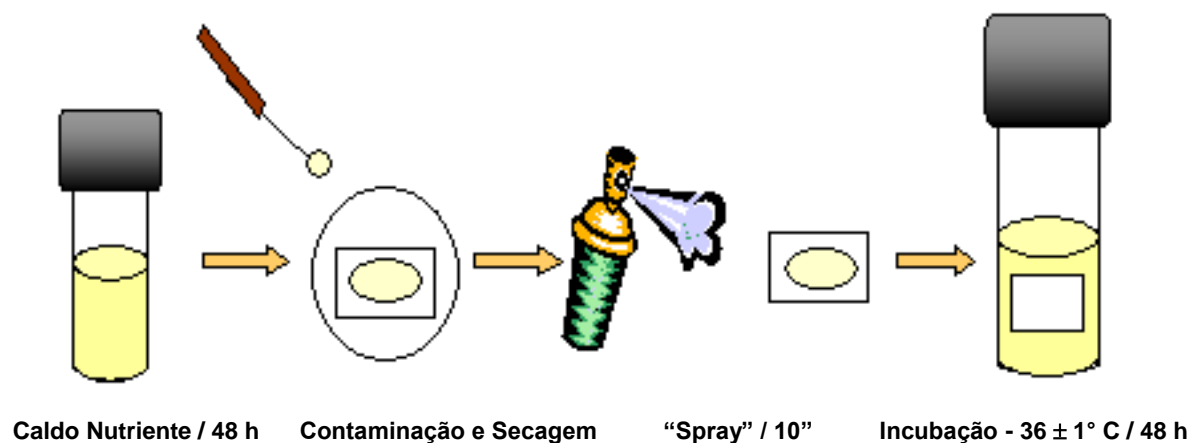
3.5 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE DESINFETANTES NAS FORMAS DE “SPRAY” E AEROSSOL

Este método foi utilizado com objetivo de se testar a eficácia do álcool etílico a 70% (v/v), na forma líquida manipulado no laboratório acondicionado em embalagem “Spray”. Esse método foi posteriormente adaptado para avaliar a eficácia do álcool etílico sob a forma de gel. O método foi realizado segundo a AOAC (SINGLETON, 2000) e o POP INCQS nº 65.3210.019, empregado para Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol (MANUAL DA QUALIDADE, 2006a).

Resumidamente, a partir das culturas estocadas, foram realizados no mínimo 3 e no máximo 15 repiques diários consecutivos de 24 horas a $36 \pm 1^{\circ}$ C em caldo sintético para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, e em caldo nutriente para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Para realizar o ensaio, foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 de 48 horas incubadas a $36 \pm 1^{\circ}$ C em caldo nutriente e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 de 24 horas incubadas a $36 \pm 1^{\circ}$ C em caldo nutriente. As culturas foram agitadas e, com uma pipeta capilar ou alça de transferência

estéreis, foram transferidos 0,01 mL da cultura teste para a superfície de uma lamínula, que foram espalhados uniformemente sobre toda a área, deixando as bordas livres. A lamínula foi colocada em uma placa de Petri forrada com 2 folhas de papel de filtro Whatman nº 2 e levadas para estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 30 – 40 minutos. Após a incubação, a lamínula foi retirada da placa de Petri com auxílio de uma pinça flambada, e o produto foi aplicado por 10 segundos mantendo-se uma distância de 30 centímetros entre o produto e a lamínula. Foi aguardado o tempo de contato de 10 minutos para cada lamínula, onde o excesso de líquido aplicado foi drenado, e as lamínulas foram transferidas, em intervalos de 1 minuto entre cada transferência, para tubos de 32 x 200 mm contendo 20 mL de caldo nutriente. Caso o meio de cultura apresentasse turvação após 30 minutos, a lamínula correspondente ao tubo que apresentou turvação seria transferida para outro tubo contendo caldo nutriente. Esse procedimento foi repetido para 60 lamínulas. Todos os 60 tubos contendo meio de cultura foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas (**Figura 7**).

Figura 7. Resumo dos procedimentos empregados no Método para Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol.



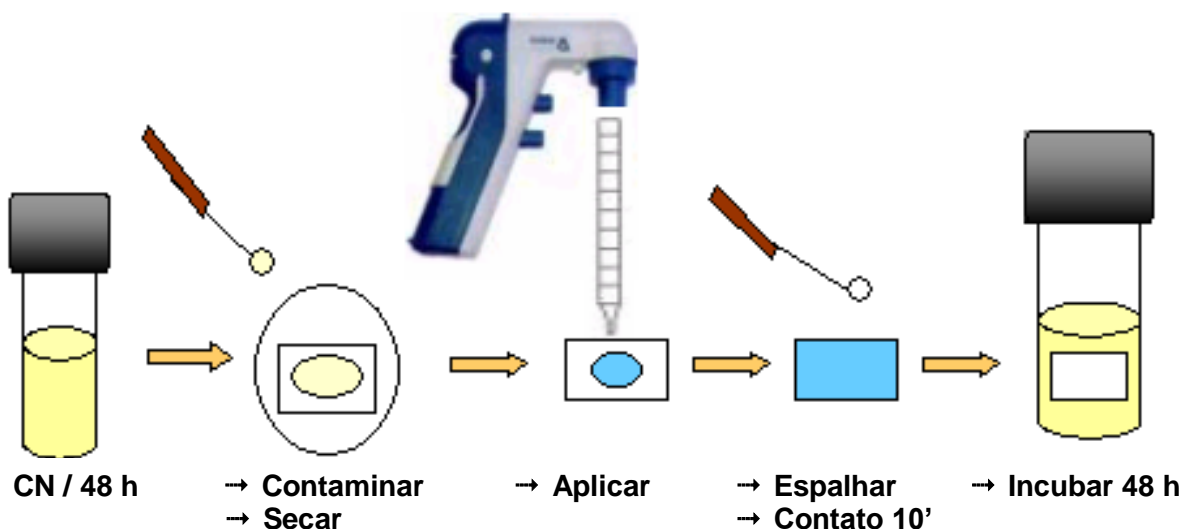
Foram realizados os controles de viabilidade do meio de cultura, esterilidade do meio de cultura e esterilidade das lamínulas, conforme descrito no método da diluição de uso. Após a incubação, nos tubos contendo as lamínulas, observamos a ausência ou presença de crescimento através da turvação do meio de cultura. O produto para ser considerado satisfatório, deveria ser capaz de matar os microrganismos teste sobre 59 das 60 lamínulas utilizadas, o que confere um nível de confiança de 95%. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas. O ensaio foi repetido de acordo com os critérios preconizados no POP INCQS nº 65.3210.019 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006a).

3.6 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DO ÁLCOOL ETÍLICO NA FORMA DE GEL

Este método foi desenvolvido a partir de algumas adaptações realizadas no Método para Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol. A partir das culturas estocadas, foram realizados no mínimo 3 e no máximo 15 repiques diários consecutivos de 24 horas a $36 \pm 1^\circ$ C em caldo nutriente para os microrganismos teste *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Para realizar o ensaio, foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 de 48 horas incubadas a $36 \pm 1^\circ$ C em caldo nutriente e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 de 24 horas incubadas a $36 \pm 1^\circ$ C em caldo nutriente. As culturas foram agitadas e com uma pipeta capilar ou alça de transferência estéril, transferimos 0,01 mL da cultura teste para a superfície de uma lamínula que foram imediatamente espalhadas uniformemente, sobre toda a área, deixando as bordas livres. A lamínula foi colocada em uma placa de Petri, forrada com 2 folhas de papel de filtro Whatman nº 2, e levada para estufa por 30 – 40 minutos a $36 \pm 1^\circ$ C. Após incubação, foi aplicado o produto B (63º GL) sobre cada lamínula, com o auxílio de uma micropipeta. Essa micropipeta não permitiu realizar a medição de forma

uniforme devido à viscosidade do produto na forma de gel, assim não conseguimos realizar a medição de forma precisa. Por isso foi substituída pela pipeta graduada de 1 mL, a qual foi utilizada para a determinação do volume mínimo bactericida a ser aplicado sobre a lamínula contaminada. Após o tempo de contato de 10 minutos as lamínulas foram transferidas, em intervalos de 1 minuto entre cada transferência, para tubos de 32 x 200 mm contendo 20 mL de caldo nutriente. Caso o meio de cultura apresentasse turvação após 30 minutos, a lamínula correspondente ao tubo que apresentou turvação seria transferida para outro tubo contendo caldo nutriente. Esse procedimento foi repetido para 60 lamínulas. Todos os 60 tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas (**Figura 8**).

Figura 8. Esquema do método, utilizando uma lamínula. Sendo que este procedimento foi repetido para as 60 lamínulas de vidro.



Os controles realizados foram viabilidade do meio de cultura, esterilidade do meio de cultura e esterilidade dos carreadores (lamínulas), conforme descrito no método da diluição de uso. Observamos a ausência ou presença de crescimento, após incubação, nos tubos contendo as lamínulas através da turvação do meio de cultura. Foi considerado o mesmo critério de aceitação utilizado para produtos na forma líquida, ou seja, o produto para ser considerado satisfatório, deveria ser capaz de matar os microrganismos teste sobre 59 das 60 lamínulas utilizadas, o que confere um nível de confiança de 95%. O ensaio foi repetido de acordo com os critérios preconizados no POP INCQS nº 65.3210.019 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006a).

3.6.1. Determinação da carga microbiana de *S. aureus* ATCC 6538 no cilindro de aço inoxidável

Com o objetivo de verificar a carga microbiana do inóculo utilizado no ensaio foram realizadas diluições decimais do 4º repique de *S. aureus* ATCC 6538, incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 48 horas em caldo nutriente, que foram plaqueadas em duplicata em meio TSA, através da técnica de “pour-plate”. Foi também determinada a carga microbiana presente no cilindro de aço inoxidável, utilizando-se 3 desses carreadores contaminados e secos, que foram sonicados em solução salina estéril. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas em caldo nutriente, que foram plaqueadas em duplicata em meio TSA, através da técnica de “pour-plate” com o objetivo de usar a mesma carga microbiana sobre as lamínulas de vidro utilizadas na técnica para produtos na forma de “Spray” e aerossol.

3.7 APLICAÇÃO DE PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS QUALITATIVOS

Essa etapa do trabalho visa a realização de um estudo de validação da metodologia (teste qualitativo) desenvolvida de modo a torná-la segura para ser aplicada nos laboratórios analíticos, portanto a princípio foram avaliados apenas os seguintes parâmetros: especificidade, robustez e repetitividade (USP 30, 2007).

3.7.1 Especificidade

A especificidade de um método microbiológico qualitativo é a habilidade de detectar o crescimento do microrganismo. Esta propriedade está diretamente relacionada ao meio de cultura utilizado, onde foi observada a presença ou ausência do microrganismo de acordo com a turvação do meio de cultura. Para a confirmação do microrganismo teste utilizado foram realizados os seguintes procedimentos:

- *Staphylococcus aureus*

O crescimento bacteriano foi semeado em placas de Petri contendo ágar soja tríptica e em ágar seletivo manitol salgado, e as placas foram incubadas por 24 horas a $36 \pm 1^\circ \text{C}$. Após a incubação foi observada a morfologia colonial e realizada a bacterioscopia corando pelo Método de Gram. A prova da coagulase também foi realizada.

- *Salmonella choleraesuis*

O crescimento bacteriano foi semeado em placas de Petri contendo ágar soja tríptica e em meio seletivo ágar *Salmonella-Shigella* (SS), e as placas foram incubadas por 24 horas a $36 \pm 1^\circ$ C. Após a incubação foi observada a morfologia colonial e realizada a bacterioscopia corando pelo Método de Gram. A sorologia com soro polivalente também foi realizada.

- *Pseudomonas aeruginosa*

O crescimento bacteriano foi semeado em placas de Petri contendo ágar soja tríptica e em ágar seletivo cetrimida, e as placas foram incubadas por 24 horas a $36 \pm 1^\circ$ C. Após a incubação foi observada a morfologia colonial e realizada a bacterioscopia corando pelo Método de Gram. A prova da oxidase também foi realizada.

3.7.2 Repetitividade (“in-house”)

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e mesmo local. Nesse trabalho o procedimento de análise foi repetido no mínimo três vezes onde foram mantidas as mesmas condições de medição: mesmo produto, analista, condições ambientais, instrumentos, microrganismos.

3.7.3 Robustez

É a medida da capacidade do método não ser afetado por pequenas, porém deliberadas variações em alguns parâmetros do método, e fornece uma indicação da confiabilidade de seu uso. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. As modificações introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas, equipamentos, etc. Nessa avaliação foram usados três diferentes instrumentos laboratoriais: a micropipeta de 1000 μL marca Gilson, a alça de transferência de 4 mm de diâmetro interno descartável e a alça calibrada de platina de 4 mm de diâmetro interno de platina. Estes instrumentos foram utilizados visando verificar a possível interferência dos mesmos, durante a aplicação do método na etapa referente ao inóculo, e para isso uma cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 incubada por 48 horas a 36 ± 1 °C foi utilizada. O inóculo tomado usando-se os três instrumentos foi transferido para diferentes tubos contendo solução salina estéril, posteriormente foi determinado o número de unidades formadoras de colônia/mL pela técnica do "pour-plate" em "Plate Count Agar" (PCA). Após a determinação do número de unidades formadoras de colônia foram calculadas as médias de cada grupo e em seguida os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, para verificar se existiriam diferenças entre os grupos formados de acordo com o instrumento laboratorial utilizado.

Como, de acordo com o método para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes nas formas de "spray" e aerossol, a cultura bacteriana poderia sofrer repiques consecutivos por até 15 dias, foram comparadas as contagens de UFC obtidas com diferentes instrumentos laboratoriais nos dias 4, 10 e 15, visando verificar se existiria alteração do inóculo relacionada ao tempo de incubação. Após a determinação do número de unidades formadoras de colônia foram calculadas as médias de cada grupo, e posteriormente, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, para verificar se existiriam diferenças entre os grupos formados de acordo com o tempo de incubação utilizado.

Outro parâmetro alterado foram os analistas. Três analistas realizaram a metodologia ora desenvolvida, em dias diferentes, sendo que cada um preparou a cultura teste e realizou todo o ensaio propriamente dito.

3.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO ADAPTADO USANDO-SE PRODUTOS DISPOSTOS À VENDA

Após os ensaios envolvendo parâmetros de validação, o método desenvolvido foi utilizado para Avaliação da Atividade Bactericida de produtos à base de álcool etílico na forma de gel nas concentrações de 82° GL (1 produto), 77° GL (2 produtos, um com registro na Anvisa) e 54° GL (1 produto).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aplicou-se a análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, utilizando função específica do programa Microsoft® Excel 2000 para análise dos resultados obtidos variando-se os instrumentos laboratoriais e o tempo de incubação do inóculo.

4 RESULTADOS

4.1 MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO

Esse método foi utilizado para confirmarmos a eficácia do produto F, que foi considerado eficaz frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, tendo sido capaz de eliminar os microrganismos teste sobre os 60 cilindros (**Tabela 6**). Todos os controles como os perfis de resistência dos microrganismos frente ao fenol (**Tabela 7**), esterilidade dos lotes de pipetas, esterilidade da água destilada estéril, esterilidade dos cilindros de aço inoxidável, esterilidade do meio de cultura e viabilidade do lote de meio de cultura apresentaram-se dentro dos padrões desejados (**Tabela 6**).

Os resultados obtidos através deste método nos deram segurança para testar o álcool etílico a 70% na forma líquida (produto F), utilizando a metodologia para produtos em “Spray” e Aerossol.

Tabela 6. Resultados obtidos através do Método da Diluição de Uso utilizando-se álcool etílico a 70% manipulado no laboratório (Produto F).

Microrganismo	Total de Carreadores Positivos		Controles		Resultado
	Ensaio		Esterilidade	Viabilidade	
	I	II			
<i>S. aureus</i>	0	0	C	C	S
<i>S. choleraesuis</i>	0	0	C	C	S
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	C	C	S

(C) Conforme; (S) Satisfatório.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 7. Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente às soluções de fenol.

Microrganismo	Produto	Fenol	ENSAIO I			ENSAIO II		
			Tempo de Contato (min.)			Tempo de Contato (min.)		
			5'	10'	15'	5'	10'	15'
<i>S. aureus</i>	F	1:60	P	P	N	P	N	N
		1:70	P	P	P	P	P	P
<i>S. choleraesuis</i>	F	1:90	P	P	N	P	P	N
		1:100	P	P	P	P	P	P
<i>P. aeruginosa</i>	F	1:80	P	P	N	P	P	N
		1:90	P	P	P	P	P	P

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

4.2 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE DESINFETANTES NAS FORMAS DE “SPRAY” E AEROSSOL

Antes de começarmos os experimentos usando o álcool etílico na forma gel, resolvemos testar este método com o álcool etílico 70% (v/v), pois este seria o método que sofreria adaptações para avaliar a eficácia de produtos sob a forma de gel. O produto manipulado foi considerado eficaz quando testado frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. Porém o mesmo resultado não foi obtido com *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, que apresentou crescimento acima do permitido em três experimentos repetidos (**Tabela 8**). Todos os controles como perfil de resistência dos microrganismos frente ao fenol (**Tabela 9**), esterilidade dos lotes de pipetas, esterilidade das lamínulas, esterilidade do meio de cultura e viabilidade do lote de meio de cultura foram considerados dentro dos padrões desejados estabelecidos pelo método (**Tabela 8**). Com o objetivo de adequarmos o inóculo, procedemos a contagem da carga microbiana presente em cada cilindro, usado no Método da Diluição de Uso, contaminado com uma cultura de 48 h de

Staphylococcus aureus ATCC 6538 através da técnica de “pour-plate”. Em paralelo, também realizamos a contagem do número de unidades formadoras de colônia presentes na cultura de *S. aureus* de 48 h. Obtivemos carga microbiana média por cilindros de $5,5 \times 10^4$ UFC/mL (média referente a contagem sobre 3 cilindros) e na contagem da cultura teste de 48 h obtivemos $1,04 \times 10^8$ UFC/mL. Diluímos a cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, a ser usada nos experimentos seguintes, para cerca de 10^4 UFC/ mL. Com essa padronização realizamos novamente os experimentos e obtivemos como resultado a eficácia apresentada pelo álcool etílico manipulado (**Tabela 10**). Todos os controles como os perfis de resistência dos microrganismos frente à solução de fenol (**Tabela 11**), esterilidade dos lotes de pipetas, esterilidade das lamínulas, esterilidade do meio de cultura e viabilidade do lote de meio de cultura foram considerados dentro dos padrões estabelecidos pelo método (**Tabela 10**). Determinamos assim a carga microbiana do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 que deverá ser usada nos experimentos subsequentes com o álcool etílico na forma gel.

Após os resultados satisfatórios deste método, iniciamos a adaptação desta metodologia para avaliar a eficácia do álcool etílico sob a forma de gel.

Tabela 8. Resultados obtidos na Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol, utilizando-se álcool etílico a 70% manipulado no laboratório (produto F).

Microrganismo	Total de Carreadores			Controles		Resultado
	Positivos			Esterilidade	Viabilidade	
	Ensaio					
I	II	III				
<i>S. aureus</i>	2	4	2	C	C	I
<i>S. choleraesius</i>	0	0	NR	C	C	S
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	NR	C	C	S

(C) Conforme; (NR) Não realizado; (S) Satisfatório; (I) Insatisfatório.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 9. Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente às soluções de fenol.

Microrganismo	Produto	Fenol	ENSAIO I			ENSAIO II			ENSAIO III		
			<i>Tempo de Contato (min.)</i>			<i>Tempo de Contato (min.)</i>			<i>Tempo de Contato (min.)</i>		
			5'	10'	15'	5'	10'	15'	5'	10'	15'
<i>S. aureus</i>	F	1:60	P	P	N	P	P	N	P	N	N
		1:70	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>S. choleraesuis</i>	F	1:90	P	P	N	P	P	N	NR	NR	NR
		1:100	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>P. aeruginosa</i>	F	1:80	P	P	N	P	P	N	NR	NR	NR
		1:90	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano; (NR) Não realizado.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 10. Resultados obtidos na Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol após diluição da cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Microorganismo	Total de Carreadores Positivos		Controles		Resultado
	Ensaio		Esterilidade	Viabilidade	
	I	II			
<i>S. aureus</i>	0	0	C	C	S

(C) Conforme; (S) Satisfatório.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 11. Resultados obtidos do controle de resistência da cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente ao fenol.

Microorganismo	Produto	Fenol	ENSAIO I			ENSAIO II		
			Tempo de Contato (min.)			Tempo de Contato (min.)		
			5'	10'	15'	5'	10'	15'
<i>S. aureus</i>	F	1:60	P	P	N	P	P	N
		1:70	P	P	P	P	P	P

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

4.3 MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE DESINFETANTES NA FORMA DE GEL

Após os resultados satisfatórios do método para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes nas formas de “Spray” e Aerossol usando-se o produto F, adaptamos esta metodologia para avaliar a eficácia do álcool etílico sob a forma de gel. Inicialmente, os experimentos foram realizados com o auxílio de uma micropipeta, utilizando os volumes de 500, 250 e 150 μ L para o álcool etílico sob a forma de gel. Obtivemos resultado satisfatório, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, com o

produto B na concentração de 63° GL (**Tabela 13**). Porém, com a necessidade da determinação do volume mínimo a ser aplicado do produto que ainda mantivesse a atividade bactericida e a dificuldade na pipetagem com a micropipeta, devido à viscosidade do produto na forma de gel, substituímos a micropipeta pela pipeta graduada de 1 mL. Assim, conseguimos realizar os ensaios com volumes menores (100 e 50 µL). O produto B (63° GL), utilizando o volume de 100 µL, foi eficaz contra todos os microrganismos, enquanto que com o volume de 50 µL foi eficaz apenas contra *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, não sendo capaz de eliminar *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (**Tabela 12**). A partir desse resultado foi estabelecido o volume mínimo de 100 µL para ser usado em qualquer aplicação do método adaptado. Esse volume parece garantir a segurança domiciliar e hospitalar da aplicação do produto. Todos os controles como perfis de resistência dos microrganismos frente às soluções de fenol (**Tabela 13**), esterilidade dos lotes de pipetas, esterilidade das lamínulas, esterilidade do meio de cultura e viabilidade do lote de meio de cultura foram considerados dentro dos padrões estabelecidos pelo método (**Tabela 12**).

Tabela 12. Resultados obtidos dos experimentos iniciais utilizando diferentes instrumentos para aplicação de diferentes volumes do produto B (63° GL).

Microrganismo	Instrumento	Volume aplicado	Total de Carreadores Positivos			Controles		Resultado
			Ensaio			Esterilidade	Viabilidade	
			I	II	III			
<i>S. aureus</i>	Micropipeta	500 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>S. aureus</i>	Micropipeta	250 µL	2	8	NR	C	C	I
<i>S. aureus</i>	Pipeta 1 mL	250 µL	1	0	1	C	C	S
<i>S. aureus</i>	Pipeta 1 mL	150 µL	1	1	NR	C	C	S
<i>S. aureus</i>	Pipeta 1 mL	100 µL	0	1	1	C	C	S
<i>S. aureus</i>	Pipeta 1 mL	50 µL	3	3	4	C	C	I
<i>S. choleraesuis</i>	Pipeta 1 mL	100 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>S. choleraesuis</i>	Pipeta 1 mL	50 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>P. aeruginosa</i>	Pipeta 1 mL	100 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>P. aeruginosa</i>	Pipeta 1 mL	50 µL	0	0	NR	C	C	S

(NR) Não realizado; (C) Conforme; (S) Satisfatório; (I) Insatisfatório.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 13. Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente ao fenol.

Microrganismo	Produto	Volume	Instrumento	Fenol	ENSAIO I			ENSAIO II			ENSAIO III		
					Tempo de Contato (min.)			Tempo de Contato (min.)			Tempo de Contato (min.)		
					5'	10'	15'	5'	10'	15'	5'	10'	15'
<i>S. aureus</i>	B	500 µL	Micropipeta	1:60	N	N	N	P	P	N	NR	NR	NR
				1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	B	250 µL	Micropipeta	1:60	P	P	N	P	N	N	NR	NR	NR
				1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	B	250 µL	Pipeta 1 mL	1:60	N	N	N	P	N	N	NR	NR	NR
				1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	B	150 µL	Pipeta 1 mL	1:60	P	N	N	N	N	N	NR	NR	NR
				1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	B	100 µL	Pipeta 1 mL	1:60	P	N	N	P	N	N	NR	NR	NR
				1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	B	50 µL	Pipeta 1 mL	1:60	N	N	N	P	N	N	N	N	N
				1:70	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>S. choleraesuis</i>	B	50 µL	Pipeta 1 mL	1:90	P	P	N	P	P	N	NR	NR	NR
				1:100	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>P. aeruginosa</i>	B	50 µL	Pipeta 1 mL	1:80	N	N	N	P	N	N	NR	NR	NR
				1:90	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano; (NR) Não realizado.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

4.4 APLICAÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS QUALITATIVOS

Nesse trabalho somente foram avaliados os parâmetros especificidade, robustez e repetitividade.

4.4.1 Especificidade

A confirmação da presença dos diferentes microrganismos teste utilizados em todos os ensaios foi realizada pela observação das características morfo-tintoriais através da coloração de Gram, pelo crescimento em meios de cultura seletivos, pela observação das características das colônias sobre meios de cultura na forma sólida e de provas bioquímicas específicas desses microrganismos. Todos os resultados estavam de acordo com as características dos microrganismos pesquisados.

4.4.2 Robustez

A robustez do método foi avaliada pela variação de parâmetros como a preparação do inóculo, a aplicação do produto e os analistas.

Através da técnica de “pour-plate” determinou-se o número de microrganismos viáveis utilizando-se a cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 repicado com cada um dos instrumentos laboratoriais descritos anteriormente com o objetivo de avaliar a possibilidade de haver alguma interferência durante a aplicação do método na etapa referente ao repique do microrganismo. Foi considerada para contagem das colônias em placa e para a aplicação do método estatístico a diluição 10^{-4} (**Quadro 1**). Com este resultado, foi possível calcular as médias e assim submetê-los à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, para verificar se existiam

diferenças entre os grupos formados de acordo com o instrumento utilizado. Após a aplicação da análise de variância (ANOVA) foi observado que o valor do F calculado é menor que o F crítico mostrando não existir diferenças significativas entre os instrumentos laboratoriais utilizados (**Tabela 14**).

Outro parâmetro estudado foi a comparação das contagens de UFC obtidas em diferentes dias de incubação, através da técnica de “pour-plate”. Foi considerada para contagem das colônias em placa e para a aplicação do método estatístico a diluição 10^{-7} (**Quadro 2**). Com este resultado, foi possível calcular as médias e assim submetê-los à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, para verificar se existiam diferenças entre os grupos formados variando-se o tempo de incubação do inóculo. Após a aplicação da análise de variância (ANOVA) foi observado que o valor do F calculado é menor que o F crítico mostrando não existir diferenças significativas entre o tempo de incubação utilizado (**Tabela 15**).

Os ensaios foram realizados por três analistas diferentes em dias diferentes. Através dos resultados foi possível observar que dias diferentes bem como analistas diferentes não promoveram diferenças nos resultados das análises. O método foi considerado robusto, pois manteve sua resposta em meio às variações deliberadas e aos parâmetros analíticos dentro do laboratório.

Quadro 1. Resultados obtidos da contagem *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 utilizando-se diferentes instrumentos laboratoriais. A – Alça Descartável; B – Micropipeta e C – Alça Calibrada.

A	ALÇA DESCARTÁVEL	Diluições	Número de Placas (PCA)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
		10^{-3}	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
		10^{-4}	234	257	259	259	270	271	280	285	
		10^{-5}	22	22	24	25	26	26	38	46	

B	MICROPIPETA	Diluições	Número de Placas (PCA)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
		10^{-3}	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
		10^{-4}	153	176	176	183	186	190	196	201	
		10^{-5}	10	13	18	18	18	19	22	23	

C	ALÇA CALIBRADA	Diluições	Número de Placas (PCA)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
		10^{-3}	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
		10^{-4}	149	159	174	178	182	183	212	213	
		10^{-5}	9	11	13	16	18	19	19	20	

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 14. A avaliação estatística dos resultados obtidos através do Software MS Excel® variando-se os instrumentos laboratoriais.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	6393,833	7	913,4048	0,397759	0,889925	2,657195
Dentro dos grupos	36742	16	2296,375			
Total	43135,83	23				

SQ: Soma dos Quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: Média dos Quadrados.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 15. A avaliação estatística dos resultados obtidos através do Software MS Excel® variando-se o tempo de incubação do inóculo.

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	4603,467	9	511,4963	0,774095	0,64165	2,392817
Dentro dos grupos	13215,33	20	660,7667			
Total	17818,8	29				

SQ: Soma dos Quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: Média dos Quadrados.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Quadro 2. Resultados obtidos da contagem *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 variando-se o tempo de incubação do inóculo. A – Alça Descartável; B – Micropipeta e C – Alça Calibrada.

A

ALÇA DESCARTÁVEL	4º REPIQUE	Diluições	Nº UFC				10º REPIQUE	Diluições	Nº UFC				15º REPIQUE	Diluições	Nº UFC			
			A1	B1	A2	B2			A1	B1	A2	B2			A1	B1	A2	B2
		10 ⁻⁶	INC.	INC.	INC.	INC.		10 ⁻⁶	INC.	INC.	>300	>300		10 ⁻⁶	INC.	INC.	>300	>300
		10 ⁻⁷	75	85	41	67		10 ⁻⁷	73	86	56	48		10 ⁻⁷	87	76	116	95
		10 ⁻⁸	8	6	8	7		10 ⁻⁸	9	6	11	14		10 ⁻⁸	10	9	18	14
		10 ⁻⁹	1	0	0	0		10 ⁻⁹	0	0	0	1		10 ⁻⁹	1	0	0	2

B

MICROPIPETA	4º REPIQUE	Diluições	Nº UFC		Nº UFC		10º REPIQUE	Diluições	Nº UFC		Nº UFC		15º REPIQUE	Diluições	Nº UFC		Nº UFC	
			A1	B1	A2	B2			A1	B1	A2	B2			A1	B1	A2	B2
		10 ⁻⁶	INC.	INC.	INC.	INC.		10 ⁻⁶	INC.	INC.	>300	>300		10 ⁻⁶	INC.	INC.	>300	>300
		10 ⁻⁷	53	66	64	58		10 ⁻⁷	115	149	47	53		10 ⁻⁷	104	112	90	109
		10 ⁻⁸	6	4	2	3		10 ⁻⁸	14	8	2	4		10 ⁻⁸	10	22	33	10
		10 ⁻⁹	0	1	0	0		10 ⁻⁹	1	1	1	2		10 ⁻⁹	3	10	0	0

C

ALÇA CALIBRADA	4º REPIQUE	Diluições	Nº UFC				10º REPIQUE	Diluições	Nº UFC				15º REPIQUE	Diluições	Nº UFC			
			A1	B1	A2	B2			A1	B1	A2	B2			A1	B1	A2	B2
		10 ⁻⁶	INC.	INC.	INC.	INC.		10 ⁻⁶	INC.	INC.	>300	>300		10 ⁻⁶	INC.	INC.	>300	>300
		10 ⁻⁷	56	64	76	72		10 ⁻⁷	97	80	71	70		10 ⁻⁷	INC.	INC.	55	77
		10 ⁻⁸	8	9	6	7		10 ⁻⁸	4	8	5	4		10 ⁻⁸	INC.	INC.	7	9
		10 ⁻⁹	1	0	0	0		10 ⁻⁹	0	1	1	2		10 ⁻⁹	169	159	0	0

4.4.3. Repetitividade (“in-house”)

Nesse trabalho o procedimento de análise foi repetido no mínimo três vezes onde foram mantidas as mesmas condições de medição: mesmo produto, analista, condições ambientais, instrumentos e microrganismos. Todos os resultados foram concordantes quanto ao número de carreadores que apresentaram crescimento microbiano para os três microrganismos empregados (**Tabela 12**).

4.1 PERFIL DOS PRODUTOS DISPOSTOS À VENDA QUANTO À EFICÁCIA

Após os ensaios envolvendo parâmetros de validação, o método desenvolvido foi utilizado para avaliação da atividade bactericida de produtos à base de álcool etílico na forma de gel nas diferentes concentrações dispostos à venda.

Os produtos C e E, nas concentrações de 77° GL e 82° GL, utilizando o volume de 50 µL foram eficazes contra todos os microrganismos. Foi testado também o produto D na concentração de 77° GL, único que apresentava registro no Ministério da Saúde, utilizando o volume de 50 µL, que foi eficaz apenas contra *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, não sendo capaz de eliminar *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, porém aumentando o volume para 100 µL, este foi capaz de eliminar o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Foram realizados experimentos utilizando-se um produto na concentração de 54° GL (produto A) apenas para verificar sua atividade sobre os microrganismos teste, não possuindo a necessidade de apresentar ação antimicrobiana, uma vez que este não apresenta concentração entre 68% e 72% p/p (BRASIL, 2002). Como resultado, utilizando o volume de 50 µL o produto A apresentou crescimento para todos os microrganismos, muito acima do critério determinado pelo método. Os resultados anteriormente citados podem ser observados na **Tabela 16**. Todos os controles como perfil de resistência dos

microrganismos frente ao fenol (**Tabela 17**), esterilidade dos lotes de pipetas, esterilidade das lamínulas, esterilidade do meio de cultura e viabilidade do lote de meio de cultura foram considerados dentro dos padrões desejados.

Tabela 16. Resultados obtidos utilizando o álcool etílico na forma de gel através do Método para Avaliação da Atividade Bactericida Adaptado.

Microrganismo	Produto	Volume aplicado	Total de Carreadores positivos			Controles		Resultado
			Ensaio			Esterilidade	Viabilidade	
			I	II	III			
<i>S. aureus</i>	A	50 µL	20	NR	NR	C	C	I
<i>S. choleraesuis</i>	A	50 µL	9	NR	NR	C	C	I
<i>P. aeruginosa</i>	A	50 µL	7	NR	NR	C	C	I
<i>S. aureus</i>	C	50 µL	2	1	NR	C	C	I
<i>S. aureus</i>	C	100 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>S. choleraesuis</i>	C	50 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>P. aeruginosa</i>	C	50 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>S. aureus</i>	D	50 µL	2	1	2	C	C	I
<i>S. aureus</i>	D	100 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>S. choleraesuis</i>	D	50 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>P. aeruginosa</i>	D	50 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>S. aureus</i>	E	50 µL	0	1	NR	C	C	S
<i>S. choleraesuis</i>	E	50 µL	0	0	NR	C	C	S
<i>P. aeruginosa</i>	E	50 µL	0	0	NR	C	C	S

(NR) Não realizado; (C) Conforme; (S) Satisfatório; (I) Insatisfatório.

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Tabela 17. Resultados obtidos do controle de resistência das culturas teste frente ao fenol.

Microrganismo	Produto	Volume	Fenol	ENSAIO I			ENSAIO II			ENSAIO III		
				Tempo de Contato (min.)			Tempo de Contato (min.)			Tempo de Contato (min.)		
				5'	10'	15'	5'	10'	15'	5'	10'	15'
<i>S. aureus</i>	A	50 µL	1:60	P	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
			1:70	P	P	P	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>S. choleraesuis</i>	A	50 µL	1:90	P	P	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
			1:100	P	P	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>P. aeruginosa</i>	A	50 µL	1:80	N	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	NR
			1:90	P	P	P	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	C	50 µL	1:60	P	N	N	N	N	N	NR	NR	NR
			1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. choleraesuis</i>	C	50 µL	1:90	P	P	N	P	P	N	NR	NR	NR
			1:100	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>P. aeruginosa</i>	C	50 µL	1:80	N	N	N	N	N	N	NR	NR	NR
			1:90	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	E	50 µL	1:60	P	N	N	P	P	N	NR	NR	NR
			1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. choleraesuis</i>	E	50 µL	1:90	P	P	N	P	P	N	NR	NR	NR
			1:100	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>P. aeruginosa</i>	E	50 µL	1:80	N	N	N	N	N	N	NR	NR	NR
			1:90	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	D	50 µL	1:60	P	N	N	P	P	N	P	N	N
			1:70	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>S. choleraesuis</i>	D	50 µL	1:90	P	P	N	P	N	N	NR	NR	NR
			1:100	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>P. aeruginosa</i>	D	50 µL	1:80	P	N	N	N	N	N	NR	NR	NR
			1:90	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR
<i>S. aureus</i>	D	100 µL	1:60	P	P	N	N	N	N	NR	NR	NR
			1:70	P	P	P	P	P	P	NR	NR	NR

(P) Presença de crescimento bacteriano; (N) Ausência de crescimento bacteriano; (NR) Não realizado.

Fonte: elaborada pelo próprio autor

5 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi desenvolver uma metodologia analítica que pudesse ser utilizada para verificação da eficácia antimicrobiana do álcool etílico na forma de gel. Este desenvolvimento se constituiu numa demanda da Anvisa desde a publicação da RDC nº 46/2002 (BRASIL, 2002).

Em 1988, no Brasil, foram adotados os métodos preconizados pela AOAC, como métodos oficiais na avaliação microbiológica de desinfetantes, visando qualificar esses produtos para efeito de registro e comercialização (BRASIL, 1988). Muitos desinfetantes de uso hospitalar, na ocasião, foram desqualificados por não atingirem os padrões microbiológicos necessários. Desde então, os fabricantes começaram a alterar a formulação e a embalagem de seus produtos desinfetantes, bem como a melhorar o esclarecimento para seu uso, atendendo às novas exigências. Numa etapa intermediária deste programa, alguns produtos, com a formulação já alterada, apesar de qualificados microbiologicamente, foram considerados tóxicos. Assim, flexibilizaram-se alguns padrões microbiológicos sem o comprometimento da qualidade do produto. Essa avaliação não foi divulgada e discutida, por razões diversas para os produtos desinfetantes de uso doméstico em sua grande variedade, como ocorreu com os desinfetantes hospitalares, acarretando o surgimento de novos desinfetantes domésticos coexistindo com outros mais antigos ou tradicionais (TIMENETSKY, 1990).

É sabido que os desinfetantes classificados como de uso geral, conforme a RDC 14/07 (BRASIL, 2007) tanto para uso domiciliar e para ambientes públicos, denominados também como desinfetantes domésticos por Timenetsky (1990), por questões inerentes à sua comercialização, são escolhidos pelo consumidor com base em critérios arbitrários e/ou subjetivos e, conseqüentemente, empregados erroneamente. Embora esses produtos não possuam os mesmos objetivos que os de uso hospitalar, devem, do mesmo modo, possuir atividade antimicrobiana e atender aos respectivos padrões microbiológicos, que por sua vez são mais flexíveis do que os de uso hospitalar (domésticos — avaliados com 2 espécies

bacterianas; hospitalares — avaliados com 5 espécies bacterianas e uma fúngica, conforme o ambiente hospitalar).

A determinação da venda do álcool na forma de gel deve-se à grave necessidade de uma ação sanitária frente ao volume de acidentes envolvendo o álcool etílico. Dados da Anvisa (2002) estimam que ocorram aproximadamente 150 mil queimaduras por ano e deste total, 45 mil em crianças entre zero e 12 anos.

Como não existem métodos específicos para avaliar a eficácia de produtos sob a forma de gel, foram realizadas neste estudo adaptações a partir de métodos utilizados para avaliar a eficácia de produtos na forma líquida. Para isso, primeiramente, comprovamos a eficácia do produto F (álcool etílico a 70% (v/v) manipulado no laboratório). Esta comprovação foi realizada através da aplicação do método da Diluição de Uso segundo o POP INCQS nº 65.3210.007 (BELOIAN, 1990; MANUAL DA QUALIDADE, 2006b).

A partir dos resultados satisfatórios com este produto foi realizado um ensaio utilizando a metodologia para produtos em “Spray” e Aerossol segundo o POP INCQS nº 65.3210.019 (SINGLETON, 2000, MANUAL DA QUALIDADE, 2006a), uma vez que esta seria adaptada para avaliar a eficácia de produtos à base de álcool sob a forma de gel. Esta metodologia foi escolhida para ser adaptada, por ser a única preconizada pela AOAC que demonstrava a possibilidade de ser aplicada a produtos sob a forma de gel, principalmente devido à reprodução das condições mais freqüentes de uso e pela utilização de lamínulas como carreadores que permitiriam o contato do produto teste com toda a sua superfície, o que não poderia ser observado caso fossem utilizados os cilindros de aço inoxidável, levando conseqüentemente à ineficiência do método quando fossem utilizados produtos viscosos.

Após os resultados satisfatórios do método para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes nas formas de “Spray” e Aerossol usando-se o produto F, adaptamos esta metodologia para avaliar a eficácia do álcool etílico sob a forma de gel. Inicialmente, os experimentos foram realizados com o auxílio de uma micropipeta, que posteriormente foi substituída por pipeta graduada de 1 mL, utilizando os volumes de 500, 250 e 150 µL para o álcool etílico sob a forma de gel. Obtivemos resultado satisfatório, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, com o produto B na concentração de 63° GL. O produto B (63° GL), utilizando o volume de

100 µL, foi eficaz contra todos os microrganismos, enquanto que com o volume de 50 µL foi eficaz apenas contra *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, não sendo capaz de eliminar *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A partir desse resultado foi estabelecido o volume mínimo de 100 µL para ser usado em qualquer aplicação do método adaptado. Esse volume parece garantir a segurança domiciliar e hospitalar da aplicação do produto.

Foi verificada na literatura, a existência de apenas um teste de superfície Europeu que utiliza como carreadores fragmentos quadrados de aço inox polidos, mas que apresenta algumas alterações metodológicas em relação ao método proposto, principalmente em relação à definição da eficácia, que se baseia na redução de > 4log do microrganismo teste (MORETTO et al, 2009).

Um agente químico antimicrobiano ideal é aquele que possui sua ação mantida sob diversas condições, tais como a solubilidade, a estabilidade e o tempo de contato com o microrganismo. Entre os principais grupos de desinfetantes e anti-sépticos destacam-se os álcoois e os compostos quaternários de amônio, cuja ação deve-se à desnaturação de proteínas presentes nas células, e os halogênios, cuja ação se baseia na oxidação de substâncias celulares vitais. Diversas técnicas laboratoriais são utilizadas para avaliar o poder antimicrobiano de agentes químicos, possibilitando a escolha apropriada desses produtos (PEREIRA et al, 2008).

No Brasil, produtos à base de álcool gel têm sido amplamente utilizados como anti-sépticos de mãos em serviços de saúde. E os profissionais dos Estados Unidos, apesar de não possuírem tradição na utilização do álcool nos serviços de assistência à saúde, vêm, paulatinamente, se rendendo aos estudos que comprovam sua eficiência. Os álcoois tendem a ressecar a superfície da pele devido à remoção dos lipídios e têm uma excelente atividade contra todos os grupos de microrganismos, exceto contra os esporos. O álcool, nas concentrações apropriadas, representa um anti-séptico de baixo custo, extremamente rápido e eficaz para reduzir o número de microrganismos encontrados na pele. Nos últimos anos, algumas preparações comerciais foram efetuadas, associando o álcool etílico ou isopropílico com emolientes para minimizar o efeito do ressecamento da pele que é o álcool gel. Esta associação, segundo alguns autores, prolonga sua atividade bactericida, por retardamento de sua evaporação. Os primeiros álcoois géis que

surgiram no mercado tiveram seu uso limitado devido ao alto custo, o que não ocorre mais, uma vez que o preço do álcool a 70% e o álcool gel se equivalem (BURG et al, 2007).

Recentemente Kaier et al (2009) relataram o impacto negativo no aparecimento e disseminação de cepas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido pela aplicação de medidas preventivas como a anti-sepsia das mãos com utilização de um produto à base de álcool. Estas formulações para uso em locais de atenção a saúde devem conter no mínimo 80% de etanol ou 75% de álcool isopropílico como ingredientes ativos de acordo com recentes recomendações baseadas em evidências da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006).

Apesar do uso de produtos à base de álcool gel ser incentivado em escolas, serviços de saúde, domicílios e outros locais onde possa acontecer a infecção cruzada entre crianças. Esta recomendação deve ser associada a alguns cuidados, de modo a impedir a ingestão destes produtos por adultos e mesmo crianças (MAY, 2009). Na RDC nº 46, publicada em 2002, os produtos comercializados sob a forma de gel contendo altas concentrações de álcool etílico devem obrigatoriamente conter um desnaturante, visando impedir a utilização destes produtos para outros fins.

Os produtos à base de álcool para anti-sepsia das mãos, devido a forte atividade antimicrobiana, ação rápida, fácil aplicação e boa tolerância para a pele são mais recomendados para preparação pré-operatória da equipe operatória segundo Suchomel et al (2009) do que preparações à base de água como povidine, clorhexidina, ou compostos quaternários de amônio.

Segundo o Inmetro (2003), com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar: métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, e ampliações e modificações de métodos normalizados. De acordo com Inmetro (2001), método normalizado é aquele desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações, cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão; e método não normalizado é aquele desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados.

A validação é frequentemente usada para demonstrar confiança em um teste ou processo. Contudo, o processo de validação nem sempre é bem definido ou devidamente descrito em um contexto. Neste trabalho, que aborda o uso do álcool na forma de gel como biocida, foram aplicados apenas alguns parâmetros de validação como a especificidade, robustez e repetitividade, segundo as orientações encontradas na USP 30 (2007).

O método adaptado foi considerado robusto, pois manteve sua resposta em meio às variações deliberadas e aos parâmetros analíticos dentro do laboratório, específico e todos os resultados foram concordantes o que o enquadra dentro dos critérios de repetitividade. Porém, pode-se considerar esta etapa do estudo como sendo preliminar à validação completa, que envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial visando verificar como a metodologia se comporta quando aplicada em diferentes laboratórios. Para que assim, a metodologia possa ser aceita como uma metodologia oficial e utilizada nos laboratórios analíticos.

Também é sabido que os testes "in vitro" conferem apenas a atividade antimicrobiana de um produto desinfetante, mas não a real capacidade de desinfecção de um ambiente que, por sua vez, pode ter diversos fatores interferentes, alguns até imprevisíveis, prejudicando a atividade antimicrobiana de um composto ativo. Por esta razão os testes padronizados não são discutíveis, e não existe um único método de avaliação microbiológica que considere todas as variáveis no contexto geral de desinfecção. O uso de cepas bacterianas padrões e representativas também é questionado pois, do mesmo modo, não representam as condições reais num processo de desinfecção (TIMENETSKY, 1990).

6 CONCLUSÕES

1. O álcool etílico a 70%, manipulado em laboratório (Produto F) foi considerado eficaz tanto nas avaliações realizadas pelo Método da Diluição de Uso como pelo Método para Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol.
2. A utilização da micropipeta inviabilizou a realização do Método para Avaliação da Atividade Bactericida de Produto na Forma de Gel, devido à viscosidade do mesmo.
3. Foi determinada a quantidade mínima necessária de 100 μL do produto/lamínula para que o mesmo ainda apresente atividade antimicrobiana. Esse volume parece garantir a segurança domiciliar da aplicação do produto.
4. As adaptações realizadas do Método para Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol se mostraram satisfatórias, permitindo a avaliação da eficácia da atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do álcool etílico sob a forma de gel.
5. Os parâmetros de validação estudados asseguraram a qualidade do método analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.
6. Os produtos C (77° GL), D (77° GL) e E (82° GL) à base de álcool etílico na forma de gel, apresentaram eficácia contra todos os microrganismos testados.

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO 9000 - Sistema de gestão da qualidade – Fundamentos e Vocabulário, 2000. Disponível em: <<http://www.moscoso.org/pub/info/books/emule/NBR%209000%20-%20Sistemas%20de%20gestao%20da%20qualidade%20-%20Fundamentos%20e%20vocabulario.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2008.

ANDRADE, D. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. **Revista Medicina**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 2, p. 250-254, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Menos acidentes com o uso de álcool gel. **Boletim Informativo**, n. 31, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2002. O Álcool na forma de gel é ou não um saneante? **Notícias da ANVISA**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticia/2002/130302.htm>>. Acesso em: 05 set. 2007.

ATCC. American Type Culture Collection. The Global Bioresource Center. **How to Revive Cultures**. Disponível em: <http://www.atcc.org/HowtoReviveCultures/tabid/695/Default.aspx>. Acesso em: 20 out. 2008.

BARON, E. J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, Massachussets, USA, p. 88, 1995.

BELOIAN, A. Disinfectants. In: **Official Methods of Analysis**. 15 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, cap. 6, 1990.

BLOCK, S. S. Definition of terms. In: **Disinfection, sterilization, and preservation**. Phyladelphia: Lippincott Williams & Williams (ed), 5. ed, p. 19, 2001.

BORNEFF, J.; WERNER, H. P.; DUPPRÉ, M. Investigations on the efficacy of surface disinfection and surface cleaning procedures. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v. 160, p. 579-589, 1975.

BRASIL. Decreto nº 79.094 de 5 de Janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976, que submete as sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneante e outros. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 114-141, 7 jan. 1977a.

BRASIL. Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância a que ficam submetidos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 90-102, 24 set. 1976.

BRASIL. Lei nº 6.437 de 20 de agosto de 1977. Configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 193-200, 24 ago. 1977b.

BRASIL. Portaria DISAD nº 15 de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. Estabelecer o prazo até as respectivas revalidações dos registros para que os produtos aqui abrangidos e anteriormente registrados se adequem ao novo regulamento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p17041-3, 5 set. 1988, Seção I.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <<http://www.saude.inf.br/legisl/lei8080.htm>>. Acesso em: 30 set. 2007.

BRASIL. Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 1-6, 27 jan. 1999.

BRASIL. Resolução RDC nº 184, de 22 de outubro de 2001. O registro de Produtos Saneantes Domissanitários e Afins, de Uso Domiciliar, Institucional e Profissional é efetuado levando-se em conta a avaliação e o gerenciamento do risco. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 23 de out. de 2001, Seção I.

BRASIL. Resolução RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico para o álcool etílico hidratado em todas as graduações e álcool etílico anidro, comercializado por atacadistas e varejistas. A industrialização, exposição à venda ou entrega ao consumo, em todas as suas fases, do álcool etílico hidratado em todas as graduações e do álcool etílico anidro estão sujeitas a diferentes concentrações, condições e finalidades como substância ou produto. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, p. 38-39, 21 de fev. 2002, Seção I.

BRASIL. Resolução RDC nº 14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 mar. 2007. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 30 set. 2007.

BUDOWLE, B. et al. Criteria for Validation of Methods in Microbial Forensics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, p. 5599-5607, 2008.

BURG, G. et al. Estudo da eficácia de um novo produto à base de álcool gel utilizado na anti-sepsia em um serviço de nefrologia. **Revista Medicina**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 2, p. 236-242, 2007. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/revista/2007/vol40n2/ao_estudo_eficacia_nov_produto_alcool_gel.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2009.

DLG. Diário Legislativo. Defesa do Consumidor aprova restrições ao álcool líquido. Disponível em: <<http://www.portaldocomercio.org.br/dlg/scr/not/not.asp?D2=15622&D1=7>>. Acesso em: 02 nov. 2007.

HUGO, W. B. Early Studies in the Evaluation of Disinfectants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 4, n. 6, p. 489-494, 1978.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGECRE - Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rev. 08, 2003. Disponível em: <www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2008.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-DQUAL - Orientações para adoção da NBR ISO/IEC 17025 pelos laboratórios e credenciados e postulantes ao credenciamento**. Rev. 06, 2001. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/infotec/publicacoes/Acredita%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2007

KAIER, K. et al. The impact of antimicrobial drug consumption and alcohol-based hand rub use on the emergence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing strains: a time-series analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 609-614, 2009.

KAWAGOE, J. A. **Higiene das mãos**: comparação da eficácia antimicrobiana do álcool – fórmula gel e líquida – nas mãos com matéria orgânica. São Paulo: USP, 1994. 127 p. Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Setor de Enfermagem, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/7139/tde-17112006-095710/>>. Acesso em: 29 ago. 2007.

KRAMER, A. et al. Limited efficacy of alcohol-based hand gels. **Lancet**, v. 359, p.1489-1490, 2002.

LARSON, E.L. APIC Guideline for hand washing and hand antisepsis in health-care settings. **American Journal of Infection Control**, v. 23, p. 251-269, 1995.

MACDONALD, A. et al. Performance feedback of hand hygiene, using alcohol gel as the skin decontaminant, reduces the number of inpatients newly affected by MRSA and antibiotic costs. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, p. 56-63, 2004.

MANUAL DA QUALIDADE. Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol. Rev. 06. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006a. Seção 10. 15 p. (65.3210.019).

MANUAL DA QUALIDADE. Método da Diluição de Uso. Rev. 08. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006b. Seção 10. 21 p. (65.3210.007).

MAY, C. The risks to children of alcohol-based hand gels. **Paediatric Nursing Journal**, v. 21, n. 1, p. 36-37, 2009.

McDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Journal Clinical Microbiology**, v. 12, p. 147-179, 1999.

MORETRO, T. et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1005-1012, 2009.

PAULSON, D. S. et al. A close look at alcohol gel as an antimicrobial sanitizing agent. **American Journal of Infection Control**, v. 27, p. 322-328, 1999.

PEREIRA, N. G. et al. Avaliação da atividade bactericida de desinfetantes químicos e produto anti-séptico contra *Escherichia coli*. **Revista Científica da FAMINAS**, Muriaé, v. 4, supl. 1, 2008. Disponível em: <http://www.faminas.edu.br/enicv/arquivos/trabalhos_anteriores/enic4/cbs/CBS_079_080_enic4.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2009.

PITTET, D. Improving adherence to hand hygiene practice: a multidisciplinary approach. **Emerging Infection Diseases Journal**, v. 7, p. 234-240, 2001.

PRESSLY, K. B. Alcohol gel artifact. **American Journal of Infection Control**, v. 28, p. 322-323, 2000.

REYBROUCK, G. **A theoretical approach of disinfectant testing**. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkund, Infektionskrankheiten unH Hygiene, I. Abteilung Originale, Reihe, v.160, p. 342-367, 1975.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n5/a17v27n5.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2008.

ROMÃO, C. M. C. P. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana em três estágios de dois produtos comerciais utilizados em desinfecção hospitalar no Brasil**. Rio de Janeiro: URFJ, 1985. 67 p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro.

RUSSEL, A. D. **Principles of antimicrobial activity**. In: Disinfection, sterilization, and preservation. Pennsylvania. USA. v. 29, p.1162, 1991.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Infection control: the role of disinfection and sterilization. **Journal Hospital Infection**, 43 (Supplement): S43-S55,1999.

SANTOS, C. A. P. Álcool gel: A Revolução. **Household & Cosméticos**, 2004. Disponível em: <http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/20020409/89_90.asp>. Acesso em: 15 ago. 2007.

SINGLETON, E. Disinfectants. In: **Official Methods of Analysis**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 17 ed., 2000.

SUCHOMEL, M.; GNANT, G.; WEINLICH, M.; ROTTER, M. Surgical hand disinfection using alcohol: the effects of alcohol type, mode and duration of application. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, p. 228-233, 2009.

TIMENETSKY, J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. **Rev. Saúde Pública**, S. Paulo, v. 24, n. 1, p. 47-50, 1990. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v24n1/08.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2009.

UNITED STATE PHARMACOPEIA. General information, **Validation of Alternative Microbiological**. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. 2007. cap. 1233, 13 p.

WHO. WHO guidelines on hand hygiene in health-care (advanced draft). Geneva: World Health Organization, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/patientsafety/information_centre/Last_April_versionHH_Guidelines%5b3%5d.pdf>