

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

Rodrigo Rollin Pinheiro

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS NO CONTROLE DE QUALIDADE
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SANEANTES DOMISSANITÁRIOS**

Rio de Janeiro

2012

Rodrigo Rollin Pinheiro

APLICAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS NO CONTROLE DE QUALIDADE
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SANEANTES DOMISSANITÁRIOS

Dissertação de mestrado 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
obtenção do Título de Mestre em Vigilância
Sanitária

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas
Marta de Campos Neves

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Pinheiro, Rodrigo Rollin

Aplicação de Diferentes Métodos no Controle de Qualidade da Atividade Antimicrobiana de Saneantes Domissanitários./Rodrigo Rollin Pinheiro.- Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

118 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Boas e Marta dos Campos Neves

1. Atividade Antimicrobiana. 2. Diluição de Uso. 3. Comitê Europeu de Normalização. 4. Desinfetantes. 5. Vigilância Sanitária.

Rodrigo Rollin Pinheiro

APLICAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS NO CONTROLE DE QUALIDADE
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SANEANTES DOMISSANITÁRIOS

Dissertação de mestrado 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 obtenção do Título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Célia Maria Carvalho Pereira Romão (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Sergio Eduardo Longo Fracalanza (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Vera Carolina Bordallo Bittencourt (Doutor)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marta de Campos Neves (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A meus pais e meus irmãos, por todo o suporte e apoio que sempre me dão.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho científico nunca é realizado sozinho. Por isso, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma participaram dessa realização:

- À minha orientadora Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas, por quem tenho muita admiração, por todo o incentivo, ajuda, ensinamentos e compreensão. Muito obrigado pela amizade e confiança durante a realização desse trabalho.
- À Dra. Neide Miyazaki (*in memoriam*), que apesar de não tido a oportunidade de participar da realização do trabalho, foi de grande importância para a idealização inicial do projeto, além de ter aceitado a orientação no projeto de mestrado.
- Aos amigos que fiz no Setor Saneantes por toda a amizade, ajuda, ótima companhia e excelente ambiente de trabalho. Obrigado Marta de Campos Neves, Daniella Cristina Rodrigues, Aline da Silva Soares Souto, Cristina e Priscila por estarem sempre dispostas a ajudar, e em especial Bruna Peres Sabagh pela grande ajuda e companhia nos ensaios.
- À Célia Maria Carvalho Pereira Romão pela colaboração como pesquisadora e revisora deste trabalho.
- À Verônica Viana Vieira, João, Livia e Paulo pela fundamental ajuda na identificação dos microrganismos.
- Aos funcionários da Central de Esterilização e do Setor de Meios de Cultura, pela disponibilidade e presteza sempre que solicitados, e em especial à amiga Cátia Cristina S. do Nascimento por todas as soluções e meios TSA, ajuda essencial para a realização do trabalho.
- Aos funcionários da Coordenação de Pós-Graduação.
- Ao Setor Saneantes do Departamento de Química pelas análises químicas dos produtos utilizados nesse trabalho.
- Ao meus pais Walter e Sonia e meus irmãos Eduardo e Renata que sempre me apoiaram em minhas decisões e me dão todo o suporte para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

- À minha namorada Luna, por todo o amor, carinho, dedicação e paciência, sempre me incentivando e dividindo todos os momentos.
- A CAPES pelo apoio financeiro.
- A todos do INCQS que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

RESUMO

Microrganismos estão presentes em grande escala no ambiente domiciliar e público. Diversos relatos na literatura já demonstraram a existência de bactérias em várias superfícies em domicílios, como pias, geladeiras, toalhas e outros objetos, e em locais de livre circulação, como aeroportos, academias de ginástica, ônibus e banheiros públicos. Com a crescente atenção voltada para a contaminação e risco de infecções causadas por alimentos e produtos manufaturados contaminados, houve um aumento do uso de desinfetantes pelo público em geral, levando a maior comercialização e circulação desses produtos. No Brasil, com a criação do Mercosul, a presença de desinfetantes provenientes de outros países se acentuou, havendo a necessidade de harmonização das normas técnicas. Por essa razão, a legislação brasileira foi alterada em 2007, com a publicação da RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007, que estabeleceu que para avaliação da qualidade dos produtos desinfetantes poderiam ser aceitas as metodologias preconizadas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ou pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN). Dessa forma, surgiu a necessidade do Brasil se preparar para essa mudança na legislação, implantando as metodologias preconizadas pelo CEN. Assim, visando a preparação do único laboratório federal oficial do Brasil, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, esse trabalho teve como objetivo principal implantar as metodologias baseadas nas normas do CEN para a avaliação da atividade antibacteriana de desinfetantes de uso institucional. Foi avaliado também o comportamento de bactérias isoladas do ambiente domiciliar através da aplicação em paralelo dos métodos da AOAC e do CEN. Os resultados obtidos permitiram a padronização da fase 1 e da fase 2, etapa 1 da metodologia preconizada pelo CEN, assim como os passos iniciais da fase 2, etapa 2. Como resultados observamos que o álcool etílico 70% e o produto A, à base de compostos quaternários de amônio, foram considerados satisfatórios frente a todos os microrganismos testados (de referência e os isolados domiciliares) nas duas metodologias, enquanto o produto B não foi capaz de eliminar *S. aureus* pelo método da Diluição de Uso. Durante a realização do estudo foram encontrados produtos desinfetantes dispostos à venda apresentando contaminação microbiana. Essas bactérias contaminantes foram identificadas e evidenciaram a presença no mercado brasileiro de produtos com graves desvios de qualidade. Esses dados são inclusive corroborados por relatos presentes na literatura. Estudos complementares são necessários para que seja realizada a total padronização da fase 2, etapa 2 da metodologia preconizada pelo CEN e para a avaliação de desinfetantes à base de outros princípios ativos.

Palavras-chave: Atividade Antimicrobiana; Diluição de Uso; Comitê Europeu de Normalização; Desinfetantes; Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Microorganisms are widely distributed in households and public environments. Several reports in the literature have just demonstrated the existence of bacteria in many households surfaces, as sinks, refrigerators, towels and other objects, and in free circulation places, as airports, gyms, buses and public bathrooms. Greater attention on contamination and infection risk caused by contaminated food and manufactured products led to increasing use of disinfectants by general population and, consequently, more commercialization and circulation of these products. In Brazil, with the foundation of “Mercosul”, the presence of disinfectants from other countries increased, leading to the necessity of technical standards harmonization. For this reason, Brazilian legislation changed in 2007 with the publication of RDC nº 14, from February 28, 2007, which established that the methodologies recommended by *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) or European Committee of Normalization (CEN) could be accepted for the quality evaluation of disinfectants. Therefore, Brazil needs to be prepared for this law change, implementing CEN methodologies. So, in order to prepare the only official federal laboratory in Brazil, “Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde”, this study aimed to implement the CEN methods for antimicrobial activity evaluation of institutional use disinfectants. It was also evaluated the behavior of environment bacteria isolated from households, through application of both AOAC and CEN methods in parallel. The results obtained allowed the standardization of phase 1 and phase 2 step 1, as well as the first steps of phase 2 step 2. It was also observed that ethyl alcohol 70% and product A, based on ammonium quaternary compounds, were considered satisfactory against all microorganisms tested (reference ones and households isolates) in both methods, while product B was not able to eliminate *S. aureus* by Use-Dilution method. During the study, it was found disinfectant products ready for sale presenting microbial contamination. These bacteria were identified and evidenced the presence of products with serious quality deviations in Brazilian market. These data are corroborated with reports in literature. Complementary studies are required for the complete standardization of phase 2, step 2 from CEN methodology, and for the evaluation of disinfectants based on others actives.

Key-words: Antimicrobial Activity; Use-Dilution; European Committee Standardization; Disinfectants; Sanitary Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ordem decrescente de resistência dos microrganismos aos métodos e soluções germicidas.....20
FIGURA 2	Etapa inicial da preparação do inóculo realizado a partir das culturas estocadas para o Método da Diluição de Uso (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).....40
FIGURA 3	Esquema dos procedimentos empregados no preparo do inóculo utilizado no Método da Diluição de Uso, a partir do 4º repique após incubação a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48h (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).....41
FIGURA 4	Etapa de contaminação e transferência dos cilindros segundo o Método da Diluição (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).....42
FIGURA 5	Esquema da transferência dos cilindros entre tubos utilizados no método da Diluição de Uso (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).....43
FIGURA 6	Padronização do inóculo inicial através da utilização conjunta de técnica espectrofotométrica (leitura da DO) e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).....49
FIGURA 7	Preparação e ajuste da suspensão teste (N) e da suspensão de validação (Nv).....50
FIGURA 8	Esquema do teste de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes EN 1040 (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005)....52

FIGURA 9	Esquema do controle A do teste (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005).....	53
FIGURA 10	Esquema do controle B do teste (EUROPENA STANDARD 1040, 2005).....	54
FIGURA 11	Esquema do controle C do teste (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005).....	55
FIGURA 12a	Esquema de realização do teste EN 1040 demonstrando passo a passo a realização dos controles.....	56
FIGURA 12b	Esquema de realização do teste EN 1040.....	57
FIGURA 13	Esquema representativo do teste da fase 2 passo 2.....	63
FIGURA 14	Esquema representativo do controle de água da fase 2 passo 2.....	64
FIGURA 15	Esquema representativo do controle do neutralizante da fase 2 passo 2.....	65
FIGURA 16	Esquema representativo do teste de neutralização da fase 2 passo 2.....	66
FIGURA 17	Padronização do inóculo de <i>S. aureus</i> através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.....	74
FIGURA 18	Padronização do inóculo de <i>P. aeruginosa</i> através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.....	74

FIGURA 19	Padronização do inóculo de <i>E. coli</i> através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.....75
FIGURA 20	Padronização do inóculo de <i>E. hirae</i> através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.....75
FIGURA 21	Padronização do inóculo de <i>E. cloacae</i> (cozinha) através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.....76
FIGURA 22	Padronização do inóculo de <i>E. cloacae</i> (banheiro) através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.....76
FIGURA 23	Formulário de registro dos resultados dos teste preconizados pelo CEN.....78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Exemplos de princípios ativos de produtos desinfetantes.....	19
TABELA 2	Produtos escolhidos para a realização das metodologias de avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
TABELA 3	Microrganismos utilizados nos testes para avaliação da atividade antimicrobiana preconizados pela <i>Association of Official Analytical Chemists</i> (AOAC) e pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN).....	38
TABELA 4	Etapas da metodologia preconizada pelo CEN.....	46
TABELA 5	Características observadas durante o isolamento e a cultura dos microrganismos oriundos da cozinha, do banheiro e dos produtos contaminados.....	68
TABELA 6	Microrganismos identificados pelo VITEK 2.....	69
TABELA 7	Avaliação do teor de princípio ativo dos produtos A, B, C, D e E. Todos os produtos eram à base de quaternários de amônio.....	70
TABELA 8	Avaliação da atividade antimicrobiana do álcool 70% pelo método da Diluição de Uso.....	71
TABELA 9	Avaliação da atividade antimicrobiana do produto A pelo método da Diluição de Uso.....	72
TABELA 10	Avaliação da atividade antimicrobiana do produto B pelo método da Diluição de Uso.....	73

TABELA 11	Soluções neutralizantes testadas e seus respectivos resultados para a fase 1 da metodologia preconizada pelo CEN.....	77
TABELA 12	Avaliação da atividade antimicrobiana do álcool etílico 70% pelo método EN 1040 do CEN (Fase 1).....	79
TABELA 13	Atividade antimicrobiana do álcool etílico avaliada pela Fase 1 da metodologia do CEN, especificando todas as concentrações utilizadas.....	79
TABELA 14	Avaliação da atividade antimicrobiana do produto A pelo método EN 1040 do CEN (Fase1).....	80
TABELA 15	Avaliação da atividade antimicrobiana do produto B pelo método EN 1040 do CEN (Fase1).....	81
TABELA 16	Avaliação da atividade antimicrobiana do álcool etílico 70% pelo método EN 1276 do CEN (Fase 2, Etapa 1).....	83
TABELA 17	Atividade antimicrobiana do álcool etílico avaliada pela Fase 2, Etapa 1 da metodologia do CEN, especificando todas as concentrações utilizadas.....	83
TABELA 18	Avaliação da atividade antimicrobiana do produto A pelo método EN 1276 do CEN (Fase 2, Etapa1).....	84
TABELA 19	Atividade antimicrobiana do produto A avaliada pela Fase 2, Etapa 1 da metodologia do CEN, especificando todas as concentrações utilizadas.....	85
TABELA 20	Avaliação da atividade antimicrobiana do produto B pelo método EN 1276 do CEN (Fase 2, Etapa1).....	86

TABELA 21	Teste preliminar da fase 2, etapa 2 usando-se <i>E. coli</i> , nas condições estabelecidas pela norma EN 13697.....	87
TABELA 22	Teste preliminar da fase 2, etapa 2 usando-se <i>E. coli</i> , com adição da etapa de sonicação ao procedimento.....	88
TABELA 23	Teste preliminar da fase 2, etapa 2, com adição de solução neutralizante 20% mais concentrada e caldo Letheen como alternativas ao desprendimento das bactérias dos discos.....	89

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CEN	Comitê Europeu de Normalização
CL	Caldo Letheen
CN	Caldo Nutriente
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidade ótica
DU	Diluição de Uso
EN	Norma Europeia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Medida de força centrífuga
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
KOH	Hidróxido de Potássio
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
N	Suspensão teste
Nc	Controle com água purificada da Fase 2, etapa 2 (CEN)
NC	Controle da neutralização da Fase 2, etapa 2 (CEN)
Nd	Teste da Fase 2, etapa 2 (CEN)
nm	Nanômetros
NT	Teste da neutralização da Fase 2, etapa 2 (CEN)
NTS	Controle do desprendimento das células dos discos
Nv	Suspensão de validação
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TSA	Agar Soja Tríplica
TSB	Caldo Soja Tríplica
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 CARACTERÍSTICAS DOS DESINFETANTES.....	18
1.2 LEGISLAÇÃO DOS SANEANTES COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	22
1.3 MÉTODOS DA DILUIÇÃO DE USO E DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO.....	26
1.4 MICRORGANISMOS NO AMBIENTE DOMICILIAR E PÚBLICO.....	28
1.5 JUSTIFICATIVA.....	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 METODOLOGIA	34
3.1 PRODUTOS UTILIZADOS.....	34
3.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DO AMBIENTE DOMICILIAR.....	35
3.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS CONTAMINANTES DOS DESINFETANTES.....	36
3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS.....	36
3.5 CEPAS BACTERIANAS.....	37
3.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE DESINFETANTES DE USO GERAL PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO.....	37
3.6.1 Manutenção dos microrganismos de referência.....	37
3.6.2 Cilindros carreadores.....	39
3.6.3 Metodologia.....	39
3.6.4 Leitura e avaliação dos resultados.....	44
3.6.5 Controles.....	44
3.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PRODUTOS DESINFETANTES DESTINADOS A DESINFECÇÃO DE SUPERFÍCIES EM AMBIENTES DOMÉSTICO, INSTITUCIONAL E INDUSTRIAL SEGUNDO O COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO.....	46
3.7.1 Manutenção dos microrganismos de referência.....	47
3.7.2 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida Básica de Desinfetantes Químicos e Antissépticos – Fase 1 (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005).....	48

3.7.2.1 Repiques.....	48
3.7.2.2 Padronização do inóculo inicial.....	48
3.7.2.3 Realização do teste.....	49
3.7.2.4 Controles.....	52
3.7.2.5 Leitura e avaliação dos resultados.....	58
3.7.3 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida Básica de Desinfetantes Químicos e Antissépticos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 1 (EUROPEAN STANDARD 1276, 2009).....	60
3.7.4 Teste Quantitativo em Superfície Não Porosa para Avaliação da Atividade Bactericida e/ou Fungicida de Desinfetantes Químicos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 2 (EUROPEAN STANDARD 13697, 2001).....	61
3.7.4.1 Tratamento inicial dos carreadores de microrganismos.....	61
3.7.4.2 Preparação do inoculo inicial.....	61
3.7.4.3 Contaminação dos discos.....	62
3.7.4.4 Teste propriamente dito.....	62
3.7.4.5 Controle com água purificada.....	63
3.7.4.6 Controle do neutralizante.....	64
3.7.4.7 Teste de neutralização.....	65
3.7.4.8 Controle do desprendimento das células dos discos.....	66
3.7.4.9 Cálculos e avaliação dos resultados.....	67
4 RESULTADOS	68
4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	68
4.2 ANÁLISE QUÍMICA DOS PRODUTOS DESINFETANTES.....	69
4.3 TESTES REALIZADOS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	69
4.4 AVALIAÇÃO DOS DESINFETANTES PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO.....	70
4.4.1 Álcool etílico 70%.....	71
4.4.2 Produto A.....	71
4.4.3 Produto B.....	72
4.5 METODOLOGIAS DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO.....	73
4.5.1 Padronização inicial do inóculo	73

4.5.2 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida Básica de Desinfetantes Químicos e Antissépticos – Fase 1 (EN 1040).....	77
4.5.2.1 Álcool etílico 70%.....	78
4.5.2.2 Produto A.....	80
4.5.2.3 Produto B.....	81
4.5.3 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida Básica de Desinfetantes Químicos e Antissépticos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 1 (EN 1276).....	82
4.5.3.1 Álcool etílico 70%.....	82
4.5.3.2 Produto A.....	84
4.5.3.3 Produto B.....	85
4.5.4 Teste Quantitativo em Superfície Não Porosa para Avaliação da Atividade Bactericida e/ou Fungicida de Desinfetantes Químicos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 2 (EN 13697).....	86
5 DISCUSSÃO.....	90
6 CONCLUSÕES.....	97
PERSPECTIVAS.....	98
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICE A - FORMULÁRIOS DOS ENSAIOS DE DILUIÇÃO DE USO....	110
APÊNDICE B - FORMULÁRIOS DOS TESTES DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO – FASE 1.....	112
APÊNDICE C - FORMULÁRIOS DOS TESTES DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO – FASE 2 ETAPA 1.....	115
APÊNDICE D – RESULTADOS DOS TESTES DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELOS MÉTODOS DA DILUIÇÃO DE USO E DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO.....	118

1 INTRODUÇÃO

Saneantes domissanitários são substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos e/ou públicos, em lugares de uso comum e no tratamento de água. Essas substâncias compreendem inseticidas, raticidas, detergentes e desinfetantes (BRASIL, 1976).

Dentre os saneantes, destacam-se os produtos desinfetantes que são amplamente utilizados nos mais diversos ambientes, como domiciliar, industrial, institucional e de assistência à saúde. Os desinfetantes são definidos como produtos que matam todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas (BRASIL, 2007).

1.1 CARACTERÍSTICAS DOS DESINFETANTES

Algumas características são consideradas extremamente relevantes para o uso e aplicação de um desinfetante. Como exemplos, esses produtos devem possuir um amplo espectro de ação; serem ativos na presença de matéria orgânica; serem compatíveis com sabões, detergentes e outros produtos químicos; possuírem baixa toxicidade (não devem ser irritantes para o usuário); serem compatíveis com diversos tipos de materiais (não serem corrosivos em superfícies metálicas e não devem causar deterioração de borrachas, plásticos e outros materiais); serem inodoros ou de odor agradável; estáveis à temperatura ambiente; econômicos; não poluentes; estáveis em concentração original ou quando diluídos (BLOCK, 2001).

No mercado, existe uma grande diversidade e oferta de produtos com diferentes princípios ativos (**Tabela 1**).

Tabela 1

Exemplos de princípios ativos de produtos desinfetantes.

Grupo Químico	Exemplos
Álcoois	Etanol Isopropanol
Aldeídos	Glutaraldeído Formaldeído*
Agentes liberadores de halogênios	Compostos de cloro Compostos de iodo
Peroxigênios	Peróxido de hidrogênio Ácido peracético
Compostos fenólicos	Fenol Cresol
Compostos à base de quaternário de amônio	Cetrimida Cloreto de benzalcônio

* proibido para uso

Fonte: (Adaptado de MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

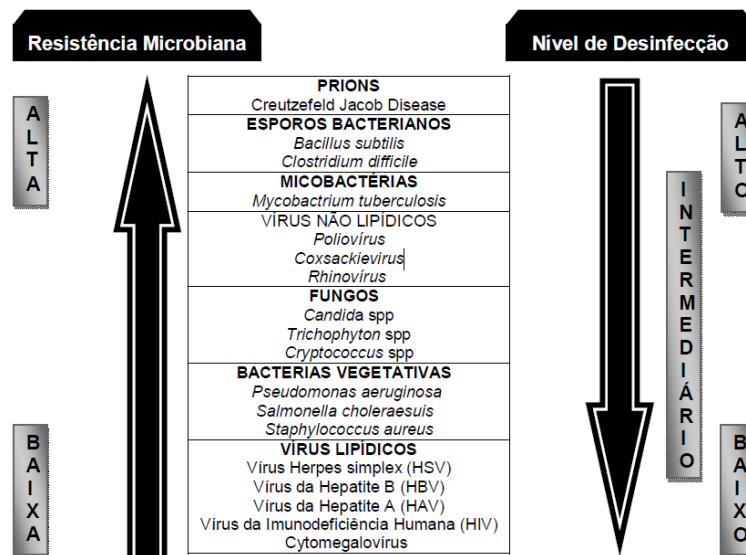
Os mecanismos de ação através dos quais esses ativos afetam a viabilidade celular de microrganismos são objetos de diversos estudos na literatura. Estudos apontam que o álcool etílico atua principalmente causando danos na membrana plasmática e desnaturação de proteínas; o glutaraldeído causa danos na parede celular e na função de diversas enzimas celulares; os compostos de cloro afetam o DNA e a respiração celular; os compostos de iodo afetam enzimas, nucleotídeos e ácidos graxos; o peróxido de hidrogênio age como um oxidante, liberando radicais livres que afetam componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas e DNA; já os compostos quaternários de amônio agem na parede celular e membrana plasmática (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Um aspecto essencial para a obtenção de uma desinfecção eficaz é a utilização de produtos desinfetantes de forma adequada, ou seja, obedecendo às instruções do fabricante e implantando um planejamento de aplicação dos produtos. Contudo, é comum os desinfetantes serem utilizados na concentração incorreta (não recomendada), ou haver a mistura de mais de um produto desinfetante, levando a formas de manipulação incorretas que podem afetar a atividade antimicrobiana do

produto. A escolha do princípio ativo mais adequado para cada área é um passo muito importante para a desinfecção (RUTALA, 1996).

Entretanto, o sucesso da desinfecção não depende somente das características do produto e da forma como é utilizado, mas também das características dos microrganismos presentes no local. A **Figura 1** mostra os diferentes níveis de resistência dos microrganismos às substâncias microbicidas.

Figura 1 - Ordem decrescente de resistência dos microrganismos aos métodos e soluções germicidas



Fonte: (FAVERO, BOND. In: BLOCK, 1991).

Assim, para um processo de desinfecção eficaz, é necessário levar em consideração uma série de fatores relacionados ao produto a ser utilizado (concentração, tempo de exposição), ao local onde será aplicado (presença de matéria orgânica, acesso do produto) e aos microrganismos presentes (carga microbiana, tipo de microrganismo). Em 2007, Ioannou, Hanlon e Denyer demonstraram através de estudos em laboratório que diversos fatores, como a concentração do produto, tempo de exposição e carga microbiana, podem alterar o sucesso da desinfecção frente a *Staphylococcus aureus* ao usar produtos à base de quaternário de amônio (IOANNOU; HANLON; DENYER, 2007).

Os desinfetantes são amplamente utilizados nos hospitais e em outras áreas de atendimento à saúde, sendo uma importante ferramenta nas práticas de controle e prevenção de infecções. No ambiente hospitalar, o uso correto de agentes antimicrobianos para a prevenção de infecções é um tema frequente. Estudos na literatura relatam que uma das causas de infecções hospitalares está relacionada à inadequada desinfecção dos artigos utilizados nos procedimentos hospitalares e anti-sepsia de pacientes e funcionários do hospital. Lanini e colaboradores (2011), por exemplo, investigaram a origem de uma infecção hospitalar causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse trabalho, foi demonstrado que uma das possíveis vias de contaminação era o dispensador de sabonete localizado no acesso à unidade de tratamento intensivo, contaminado pela bactéria, evidenciando a importância de manter as superfícies, objetos e materiais adequadamente limpos e desinfetados, visando evitar o carreamento de microrganismos potencialmente patogênicos para pacientes com a saúde mais debilitada. Nesse estudo, também foi possível observar a importância da anti-sepsia de visitantes, enfermeiros e médicos, a fim de prevenir a transmissão de possíveis patógenos aos pacientes (LANINI et al., 2011). Shimono e colaboradores (2008) encontraram contaminação de broncoscópios por *P. aeruginosa* após um surto dessa bactéria. Quando os broncoscópios foram devidamente desinfetados, os casos de infecção por *P. aeruginosa* começaram a diminuir. Takahashi e colaboradores (2004) analisaram um surto de *Serratia marcescens* num hospital do Japão e associaram as infecções à presença da bactéria em dispensadores de sabonete líquido e nebulizadores.

Os ambientes destinados a tratamentos dentários também merecem atenção. Os objetos utilizados pelos dentistas nas consultas odontológicas, assim como os implantes e placas inseridas na arcada dentária dos pacientes são superfícies capazes de carrear microrganismos e por isso necessitam de uma desinfecção correta antes do contato com o paciente. Hoje em dia, com o aumento do uso de implantes para substituir a perda de dentes, é crescente a ocorrência de infecções da mucosa oral (RENVERT; ROOS-JANSACKER; CLAFFEY, 2008). Estudos demonstraram que o uso de soluções antimicrobianas, como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, clorexidina, ácido cítrico e solução à base de álcool etílico são capazes de reduzir significativamente o número de bactérias vivas aderidas em

implantes de titânio, sendo viável a utilização devido ao baixo custo e fácil manuseio dessas substâncias (GOSAU et al., 2010).

Nesse contexto, um grande desafio de um processo de desinfecção é a eliminação de biofilmes bacterianos. Os biofilmes são uma forma de organização das células bacterianas capaz de conferir maior resistência aos fatores adversos do ambiente. Já foi demonstrada a presença dessa estrutura em diversos locais, como encanamentos, equipamentos em indústrias, instrumentos médicos, sistemas de ventilação e aparelhos de ar-condicionado (COSTERTON; STEWART, 2001). Atualmente, os biofilmes são responsáveis por 100 mil mortes anuais nos Estados Unidos e 80% das infecções microbianas (DAVIES, 2003, KLEVENS, 2007). Diversos estudos já demonstraram que os microrganismos, quando estruturados em biofilmes, são consideravelmente mais resistentes aos produtos desinfetantes. Quando expostos a produtos à base de cloro, por exemplo, apresentam células vivas após 60 minutos de contato (DAVIES, 2003). Em tubos, conseguem recolonizar o local mesmo após fluxo contínuo com múltiplos biocidas durante 7 dias (ANDERSON et al., 1990a). Além disso, microrganismos presentes em biofilmes já demonstraram ser capazes de sobreviver em recipiente com solução de iodo por até 15 meses (PANLILIO et al., 1992). Epstein e colaboradores (2011) estudaram biofilme de *Bacillus subtilis* e a sua resistência a desinfetantes, e observaram que a eficácia do etanol em eliminar o biofilme depende da concentração utilizada.

1.2 LEGISLAÇÃO DOS SANEANTES COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Devido à importância do uso de produtos desinfetantes e à grande variedade de produtos existente, é essencial haver um arcabouço legal, que possa garantir a qualidade desses produtos através da avaliação de parâmetros relacionados à eficácia, à segurança da aplicação e à garantia da qualidade desses produtos (ANDRADE et al., 2007). No Brasil, os desinfetantes estão submetidos às ações de Vigilância Sanitária através da 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), que dispõe sobre normas de vigilância sanitária, onde os saneantes

domissanitários são enquadrados como produtos a serem fiscalizados pela Vigilância Sanitária.

Em relação às infrações sanitárias, há a Lei Federal nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, evidenciando as penas aplicadas nos casos em que as normas estabelecidas para esses produtos não são cumpridas (BRASIL, 1977b).

Já a Lei nº 9.782, de 23 de fevereiro de 1999, 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 (BRASIL, 1999).

Assim, estas leis funcionam como ferramentas para que a Vigilância Sanitária possa fiscalizar esses produtos produzidos no Brasil ou no exterior, assim como tomar providências quando algum produto não se adeque a essa legislação.

Além dessas leis gerais, existem legislações específicas, cujas exigências devem ser cumpridas. A RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010 (BRASIL, 2010b) 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 e 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 refere-se àqueles que oferecem maior risco à população e devem ser registrados junto à Anvisa antes de serem comercializados. De acordo com parágrafo 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.

A RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007) classifica os desinfetantes por âmbito de aplicação, compreendendo uso geral, uso em indústria alimentícia e afins, uso hospitalar e uso específico (BRASIL, 2007).

Os produtos com ação antimicrobiana de uso geral abrangem os produtos de uso doméstico, institucional ou industrial, destinados a serem aplicados sobre

objetos, superfícies inanimadas e ambientes. Estes são classificados em desodorizantes (produtos que têm em sua composição substância com atividade antimicrobiana capaz de controlar odores desagradáveis), sanitizantes (agentes/produtos que reduzem o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde) e desinfetantes (BRASIL, 2007).

Os produtos com ação antimicrobiana para indústria alimentícia e afins abrangem aqueles para uso em objetos, equipamentos e superfícies inanimadas e ambientes onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, utilizados em cozinhas, indústrias alimentícias, laticínios, frigoríficos, restaurantes e demais locais produtores ou manipuladores de alimentos. Estes são classificados em sanitizantes e desinfetantes (BRASIL, 2007).

Os produtos com ação antimicrobiana de uso hospitalar abrangem os produtos para uso em ambientes, pisos, paredes, mobiliários e artigos (objetos, equipamentos e acessórios) utilizados exclusivamente em hospitais e estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde. Estes são classificados de acordo com a RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007, como desinfetantes hospitalares para superfícies fixas e artigos não críticos (objetos e equipamentos odontológicos, médicos e hospitalares, que entram em contato superficial com a pele intacta do organismo) (BRASIL, 2007).

Os produtos com ação antimicrobiana de uso específico abrangem os produtos que, em função de seu uso específico, não se enquadram nas classificações anteriores. Estes são desinfetantes para lactários, para piscinas, para água de consumo humano, para tecidos e roupas, para roupas hospitalares e outros (BRASIL, 2007).

Já a RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010, harmonizada pelo Mercosul (Mercado Comum do Sul), introduziu uma nova classificação para os desinfetantes de uso hospitalar utilizados em artigos semi-críticos (aqueles que entram em contato com a pele não íntegra ou com a mucosa do paciente) e críticos (aqueles utilizados em procedimentos de alto risco, que penetram tecidos ou órgãos). Nela os desinfetantes são classificados como de nível intermediário (produtos que destroem bactérias vegetativas, micobactérias, a maioria dos vírus e fungos em um período de tempo comprovado) e desinfetantes de alto nível (produtos que destroem todos os

microrganismos em um período de tempo comprovado, exceto um número elevado de esporos bacterianos) (BRASIL, 2010a).

Em relação à comprovação da eficácia, as RDCs nº 14 e 35 preconizam que 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. Essas análises podem ser realizadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ministério da Saúde, ou em laboratórios oficiais credenciados especificamente para este fim, obedecidos os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ou métodos adotados pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN).

Oficialmente, até a elaboração da RDC nº 14, a legislação em vigor (Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988) preconizava que os métodos e procedimentos para a avaliação da atividade antimicrobiana dos desinfetantes fossem aquelas preconizadas pelo INCQS, onde eram utilizadas apenas as metodologias da AOAC (BRASIL, 1988). No caso dos desinfetantes de uso geral, na análise de eficácia se utilizava o Método da Diluição de Uso (DU). Por outro lado, existem países que não utilizam os métodos preconizados pela AOAC, fazendo uso de outras normalizações e metodologias. Como exemplo, há os países da União Europeia, que seguem as normas do CEN, além de países do continente asiático que também possuem suas próprias normas. Com a circulação cada vez mais frequente de produtos entre os diferentes países, torna-se cada vez mais necessário que esses órgãos, responsáveis por essas avaliações estejam preparados para receber produtos que utilizem diferentes métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana. No Brasil, esses problemas se tornam mais complicados entre os países do Mercosul, uma vez que os produtos circulam com mais facilidade entre esses países e estes não são avaliados apenas pelas metodologias preconizadas pela AOAC. Dessa forma, com o objetivo de adequar um regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul, a principal mudança da extinta Portaria nº 15 para a RDC nº 14 foi a abertura para a utilização de outros métodos objetivando a avaliação da eficácia, incluindo não somente os da AOAC como também aqueles adotados pelo CEN, entre outros.

1.3 MÉTODOS DA DILUIÇÃO DE USO E DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO

O Método da DU da AOAC baseia-se na utilização de cilindros de aço inox impregnados com microrganismos de referência. Esses cilindros são expostos ao desinfetante a ser testado, de acordo com a diluição e o tempo de contato recomendados pelo próprio fabricante, respeitada a legislação vigente e a classificação do produto. Em seguida, os cilindros são transferidos para meios de cultura para verificação de possíveis microrganismos sobreviventes. Após a incubação, é avaliado o crescimento microbiano nas subculturas através da turvação desses meios. Para ser aprovado, o produto deve eliminar os microrganismos em 59 dos 60 cilindros utilizados em cada teste (TOMASINO, 2007, INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

Entretanto, apesar de ser o método oficialmente adotado pela AOAC e pelos órgãos brasileiros responsáveis, o Método da DU apresenta algumas falhas. Estudos já demonstraram problemas na reprodutibilidade dos testes, onde a variação dos resultados para um mesmo produto é considerada alta (ARLEA et al., 2008). Um exemplo desses estudos foi a análise de 6 desinfetantes (3 fenólicos e 3 quaternários) pelo Método da DU, onde os resultados mostraram uma inabilidade de reprodução do efeito bactericida desses desinfetantes, assim como a extrema variabilidade dos resultados entre os laboratórios que participaram dos testes (RUTALA; COLE, 1987). Outro problema encontrado nesse método é a falta de padronização do inóculo do microrganismo que irá impregnar os cilindros. Estes são mergulhados numa suspensão com o microrganismo teste durante um tempo determinado e, posteriormente são colocados em estufa para secar, mas uma estimativa do número de células por cilindro não é realizada (COLE; RUTALA; ALFANO, 1988, TOMASINO; PINES; HAMILTON, 2009). Alguns estudos já demonstraram que essa falta de padronização do inóculo inicial nos cilindros pode ser uma das causas do problema da reprodutibilidade (TOMASINO; FIUMARA; COTTRILL, 2006). Além disso, a padronização do número de células por cilindro no início do método e a avaliação do número de células ao final da análise poderia dar um caráter quantitativo ao Método da DU (TOMASINO; PINES; HAMILTON, 2009).

Outros estudos também já demonstraram que esses problemas apresentados pelo método podem ser determinados pela manipulação inadequada do operador, principalmente no que diz respeito aos cilindros (ARLEA et al., 2008).

Em relação ao método adotado pelo CEN para a avaliação da atividade antimicrobiana de saneantes usados em ambientes domiciliares ou institucionais, este é composto por algumas etapas e fases, pelas quais os produtos precisam passar para serem analisados. Ao longo desses testes, os produtos são avaliados quanto à capacidade de eliminar os microrganismos em suspensão, na presença de substâncias interferentes e em superfície (com a utilização de discos de aço inox). A fase 1 (teste em suspensão) tem como objetivo a obtenção de um resultado preliminar sobre o produto teste, etapa utilizada principalmente pelas próprias indústrias produtoras para ajuste da concentração do princípio ativo e maior conhecimento da eficácia e características do produto que está sendo desenvolvido. A fase 2 etapa 1 (teste em suspensão) difere da fase 1 pela adição de substância interferente, utilizada para mimetizar a matéria orgânica encontrada nas superfícies do ambiente, com o objetivo de se aproximar da realidade do processo de desinfecção. A fase 2, etapa 2 é um teste em superfície, com a utilização dos discos de aço inox, com o objetivo de avaliar o comportamento e eficácia do produto em uma superfície semelhante aquela onde poderá ser utilizado. Segundo a norma do CEN, para uma análise oficial de avaliação da atividade antimicrobiana são necessárias apenas a fase 2, etapa 1 e 2 (EUROPEAN STANDARD 14885, 2006).

Dessa forma, os desinfetantes podem ser analisados em diferentes situações e em condições simuladas que se aproximam um pouco mais da realidade, o que pode tornar a avaliação mais precisa em relação à situação real de uso dos produtos. Além disso, todas as etapas do método são realizadas a partir de um inóculo inicial padronizado e o número final de células viáveis será observado, possibilitando uma análise quantitativa da ação antimicrobiana dos produtos (BLOCK, 2001).

1.4 MICRORGANISMOS NO AMBIENTE DOMICILIAR E PÚBLICO

Com a crescente atenção voltada para a contaminação e risco de infecções causadas por alimentos e produtos manufaturados, houve um aumento do uso de desinfetantes pelo público em geral (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Microrganismos estão presentes em grande escala no ambiente domiciliar e público. Diversos trabalhos já demonstraram a existência de bactérias em superfícies em residências e locais de livre circulação da população. Acredita-se que os fômites (superfícies capazes de transmitir patógenos e doenças) desempenhem um importante papel na transmissão de infecções entéricas e respiratórias (BOONE; GERBA, 2007). No ambiente domiciliar, uma série de objetos apresenta contaminação por microrganismos. Ojima e colaboradores (2002b) estudaram 5 residências no Japão, pesquisando a presença de microrganismos em diferentes superfícies. A cozinha foi o local com maior contaminação por bactérias aeróbias, seguida pelo banheiro. Coliformes foram encontrados na geladeira, mais precisamente no compartimento onde são estocados os vegetais. *Escherichia coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram detectados em diversas superfícies, como torneiras, pias, esponjas, toalhas de prato e mão, maçanetas, brinquedos, dentre outros (OJIMA et al., 2002b). Os mesmos autores, num outro estudo, avaliaram 86 residências japonesas, rastreando todos os cômodos em relação à presença de bactérias e fungos, mostrando que a cozinha é o local com maior contaminação de bactérias aeróbias, incluindo coliformes, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (OJIMA et al., 2002a).

Também já foi demonstrada a presença de contaminação em locais de livre circulação, como *shoppings*, aeroportos, corrimão de escadas, banheiros públicos, pontos de ônibus, telefones públicos e locais de recreação infantil (REYNOLDS et al., 2005). Nesse estudo, além do cultivo das amostras em meio de cultura, também foi realizada a avaliação da presença de marcadores bioquímicos, como hemoglobina, ureia, amilase e proteínas, evidenciando o potencial das superfícies em apresentar contaminação microbiana e em transmitir doenças. A hemoglobina, por exemplo, é capaz de carrear vários patógenos presentes no sangue do hospedeiro; a ureia e a amilase estão presentes na mucosa e pele das pessoas,

indicando possível contaminação por microrganismos de mucosa e pele; já as proteínas estão amplamente distribuídas pelo corpo e indicam possível contaminação por microrganismos presentes no hospedeiro (REYNOLDS et al., 2005).

O nível de contaminação microbiana em residências e locais públicos pode ser influenciado por uma série de fatores. Um estudo comparou a presença de contaminação microbiana em 2 países distintos, um menos desenvolvido (Camboja) e outro desenvolvido (Estados Unidos). Foi evidenciada a presença de 100 vezes mais coliformes termotolerantes no local menos desenvolvido, provavelmente devido a diferenças no clima, estrutura das residências e práticas de higiene. Além disso, superfícies que apresentam maior umidade apresentam maior contaminação microbiana, devido à maior disponibilidade de água (SINCLAIR; GERBA, 2010).

Aproximadamente 1,8 milhões de mortes de crianças são associadas às doenças de origem alimentar, principalmente em países em desenvolvimento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). Entretanto, os países desenvolvidos também sofrem com doenças diarreicas (SCALLAN et al., 2005). Nos Estados Unidos, os patógenos alimentares causam aproximadamente 76 milhões de casos, 325 mil hospitalizações e 5 mil mortes por ano (SCOTT, 1996, MEAD et al., 1999), o que resulta em um custo estimado em 6,9 bilhões de dólares por ano, devido ao absenteísmo, custo com medicação e hospitalização (ALLOS et al., 2004, IMHOFF et al., 2004).

Microrganismos patogênicos associados à diarreia já foram isolados do ambiente residencial (ALLOS et al., 2004; SCOTT, 1996), dentre eles *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* não tifóide e *S. aureus*, sendo responsáveis por 3-7 milhões de casos e 2-6 mil mortes anuais nos Estados Unidos (BUZBY et al., 1996). De acordo com Kagan, Aiello e Larson (2002), entre 6-60% da transmissão de doenças infecciosas ocorrem dentro do ambiente domiciliar onde um dos membros da família está doente (KAGAN; AIELLO; LARSON, 2002).

A eficácia da limpeza e desinfecção é importante para reduzir a disseminação microbiana devido à contaminação cruzada entre pessoas, animais, cozinha, brinquedos e superfícies de contato (COGAN; BLOOMFIELD; HUMPHREY, 1999, COGAN et al., 2002, FREDRIKSSON-AHOMAA; KORTE; KORKEALA, 2001,

OTOKUNEFOR et al., 2003, IWANICKA-GRZEGOREK et al., 2005, SEEPERSADSINGH; ADESIYUN; SEEBARANSINGH, 2005, VAN ASSELT et al., 2008, RUTLAND et al., 2009). Além disso, máquinas e utensílios de lavagem podem funcionar como reservatórios de microrganismos (KAGAN; AIELLO; LARSON, 2002), como exemplo, alguns vírus entéricos que são capazes de sobreviver aos processos de lavagem (GERBA; KENNEDY 2007). A manipulação adequada de alimentos e procedimentos de higiene também são ferramentas eficazes para evitar a disseminação microbiana (KITAMOTO et al., 2009), pois bactérias são capazes de sobreviver, se multiplicar e dispersar pela cozinha e outras áreas domiciliares durante o preparo dos alimentos (COGAN; BLOOMFIELD; HUMPHREY, 1999, RUSIN; MAXWELL; GERBA, 2002, CASTRO-DEL CAMPO et al., 2004).

Dessa forma, a maneira mais importante para manter um controle microbiano eficiente inclui minimizar a carga microbiana de fontes externas, o controle microbiano eficaz de sítios vulneráveis das residências e a limpeza e desinfecção adequada do domicílio (WIRTANEN; SALO, 2003). Medrano-Félix e colaboradores analisaram um grupo de 30 residências e observaram a presença de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp e *S. aureus* em vários locais no interior dos domicílios (MEDRANO-FÉLIX et al., 2010). Nesse estudo, foram avaliados e utilizados procedimentos de limpeza e desinfecção por compostos de cloro e de quaternários de amônio, evidenciando a importância da desinfecção e das práticas de higiene para o sucesso da redução da carga microbiana e, conseqüentemente, da transmissão de infecções. Diversos outros trabalhos evidenciaram a importância dos procedimentos de limpeza e desinfecção para a prevenção de transmissão de doenças. Já foi demonstrado que quando superfícies de ônibus escolares e brinquedos são regularmente limpos e desinfetados, ocorre uma redução nos casos de doenças gastrointestinais e respiratórias entre as crianças do local (BARKER; STEVENS; BLOOMFIELD, 2001). Além disso, este trabalho cita uma série de estudos que indicam uma redução da contaminação e infecção viral quando são adotadas práticas de higiene, evidenciando que essas práticas são capazes de interromper, ou ao menos minimizar, a transmissão de doenças microbianas.

Entretanto, bactérias Gram-negativas têm sido encontradas como contaminantes dos próprios produtos desinfetantes. A menor suscetibilidade das bactérias Gram-negativas a esses compostos, em comparação às Gram-positivas,

está relacionada à presença da membrana externa, de natureza lipoprotéica, que age como uma barreira, limitando a entrada de muitos tipos de agentes antibacterianos quimicamente não relacionados (MIYAGI; TIMENETSKY; ALTERTHUM, 2000). Algumas bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, e *Proteus* spp já mostraram alto nível de resistência a desinfetantes (MCDONELL; RUSSELL, 1999), havendo relatos de sobrevivência de *S. marcescens* em clorexidina (MARRIE; COSTERTON, 1981), *P. aeruginosa* e *Pseudomonas cepacia* em soluções à base de iodo (BERKELMAN et al., 1984; ANDERSON et al., 1990b). Produtos à base de quaternários de amônio também já apresentaram contaminação. No Brasil, já houve relatos de isolamento de *Enterobacter* spp de desinfetante de uso domiciliar (TIMENETSKY, 1990). A maior resistência dessas bactérias parece estar relacionada a uma adaptação fisiológica em resposta à mudança no ambiente, principalmente com alterações na membrana externa das células. Em *P. aeruginosa*, observou-se que há uma diferença na composição do lipopolissacarídeo (LPS) e aumento no conteúdo do íon Mg⁺, que fortalece as ligações entre os LPS. Além disso, a presença de porinas de baixa eficiência impede a difusão de moléculas para o interior da célula. Em *B. cepacia*, o alto conteúdo de arabinose ligado ao fosfato no seu LPS parece diminuir a afinidade da membrana externa às moléculas catiônicas (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

1.5 JUSTIFICATIVA

O monitoramento da qualidade dos produtos saneantes deve ser realizado rotineiramente pelas autoridades sanitárias. É especial atenção deve ser dada aos produtos com atividade antimicrobiana devido ao papel essencial desses produtos no contexto da saúde pública, na prevenção e transmissão de doenças infecciosas. No mundo globalizado de hoje, onde ocorre a livre circulação de mercadorias e o lançamento de produtos com alta tecnologia, a dinâmica da avaliação da eficácia desses produtos deve ser sempre aprimorada. Por isso, é de suma importância, capacitar o único laboratório federal de controle de qualidade de produtos submetidos à Vigilância Sanitária, o INCQS, na execução de metodologias que

permitam a avaliação e o controle da qualidade desses produtos e suas formulações, evitando assim a comercialização de produtos que possam gerar risco direto ou indireto à população.

Dessa forma, após a publicação da RDC nº 14 pela Anvisa, onde é permitida a utilização de novas metodologias para a avaliação da atividade antimicrobiana de produtos desinfetantes, é extremamente necessária a implantação de métodos que representem alternativas a DU nos laboratórios oficiais para adequá-los à nova legislação.

Além disso, é de grande interesse a avaliação desses métodos utilizando-se cepas bacterianas provenientes do ambiente, de forma a se obter mais proximidade com a realidade de aplicação dos produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo estudar, implantar e aplicar métodos baseados nas normas do Comitê Europeu de Normalização para a avaliação da atividade antibacteriana de desinfetantes de uso institucional (produtos de venda livre, utilizados em domicílios, locais públicos, indústrias), avaliando em paralelo a metodologia da Diluição de Uso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implantar os métodos preconizados pelo CEN para avaliar a eficácia de desinfetantes de uso institucional;
- Aplicar os métodos implantados frente a produtos desinfetantes comercializados no mercado brasileiro;
- Utilizar o método de Diluição de Uso para uma avaliação em paralelo com os métodos implantados;
- Isolar e identificar bactérias do ambiente domiciliar para serem utilizadas como microrganismos teste nos métodos em estudo;
- Identificar os microrganismos encontrados como contaminantes em desinfetantes utilizados ao longo da realização do presente trabalho.

3 METODOLOGIA

3.1 PRODUTOS UTILIZADOS

Foram utilizados três produtos desinfetantes para a realização dos testes de avaliação da atividade antimicrobiana. O álcool etílico a 70%, preparado no próprio laboratório a partir de etanol absoluto e dois produtos (A e B) à base de compostos quaternários de amônio classificados como desinfetantes de uso geral comercializados no mercado brasileiro. O produto A possui como ativos Cloreto de Cocobenzil Alquil Dimetil Amônio (0,45%) e Cloreto de Cetil Trimetil Amônio (0,35%), coloração laranja, pouca opacidade e recomendação de uso como produto puro. O produto B possui como ativo Cloreto de Alquil Dimetil Benzil Amônio (2%), coloração verde, pouca opacidade e recomendação de uso na diluição de 5%.

Logo no início do trabalho, foram também adquiridos três produtos à base de quaternários de amônio que seriam utilizados nos testes em paralelo com as metodologias da AOAC e do CEN, porém foi verificada nesses produtos a presença de contaminação microbiana conforme descrito no item 3.3 (produtos C, D e E). O produto C possui como ativo Cloreto de Alquil Dimetil Benzil Amônio (0,4%), coloração roxa, pouca opacidade e recomendação de uso como produto puro. O produto D possui como ativo Cloreto de Alquil Dimetil Benzil Amônio (0,4%), coloração verde, pouca opacidade e recomendação de uso como produto puro. O produto E possui como ativo Cloreto de Alquil Dimetil Benzil Amônio (0,3%), coloração rosa, pouca opacidade e recomendação de uso como produto puro. Assim, esses três produtos não foram utilizados nos testes para avaliação da atividade antimicrobiana, sendo realizada a identificação dos contaminantes (segundo item 3.2, 3.3 e 3.4) (**Tabela 2**).

A avaliação do teor de princípio ativo dos produtos foi realizada pelo Setor de Saneantes e Cosméticos do Departamento de Química do INCQS, de acordo com o POP INCQS nº 65.3110.014 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2011).

Todos os produtos foram utilizados conforme recomendado pelos fabricantes, tanto no método da DU como nas metodologias do CEN, utilizando-se água purificada para diluição dos mesmos quando foi o caso.

Tabela 2

Produtos escolhidos para a realização das metodologias de avaliação da atividade antimicrobiana.

Produto	Princípio Ativo	Observação
Alcool etílico 70%	Álcool etílico	Utilizado nos testes
Produtos A e B	Quaternário de amônio	Utilizados nos testes
Produtos C, D e E	Quaternário de amônio	Identificação da contaminação

3.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DO AMBIENTE DOMICILIAR

Duas áreas (cozinha e banheiro) de uma mesma residência foram escolhidas para a coleta das amostras. Na cozinha, foi escolhida uma região no chão, ao lado da caixa de areia do animal doméstico; no banheiro, foi escolhida uma região no chão ao lado do vaso sanitário. Numa área delimitada de 100 cm², foi passado um *swab* umedecido em solução de cloreto de sódio 0,85%. O material coletado no *swab* foi inoculado em um tubo contendo caldo soja tríptica (TSB) e incubado por 24h a 36 ± 1°C. A partir do crescimento no meio TSB, alçadas foram transferidas, através da técnica de esgotamento, para placas de Petri contendo os meios ágar soja tríptica (TSA), ágar cetrimida, ágar MacConkey e ágar manitol salgado. Após incubação por 24 h a 36 ± 1°C, as colônias isoladas foram submetidas à bacterioscopia pelo método de Gram e transferidas para uma nova placa de TSA, semeada através da técnica de esgotamento. Após incubação por 24 h a 36 ± 1°C, foi verificada a pureza da cultura e, a partir desse crescimento, foi realizada a identificação.

3.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS CONTAMINANTES DOS DESINFETANTES

Os três produtos desinfetantes foram inicialmente utilizados nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana. Ao realizar o método da DU, foi observado o crescimento de todos os tubos de meio de cultura usados nos ensaios, indicando uma possível contaminação presente nesses produtos. Assim, uma alíquota de 1 mL de cada desinfetante foi transferida para um tubo contendo caldo Letheen e este foi incubado a 37°C por até 7 dias. Após esse período foi observada a turvação do meio de cultura, confirmando a presença de contaminantes nesses produtos. A partir dessa observação, foi realizado o isolamento das bactérias contaminantes.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas diretamente da embalagem de cada desinfetante que apresentou contaminação nos testes iniciais, e adicionadas em tubos contendo 10 mL de caldo Letheen. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 a 5 dias. Após crescimento em caldo Letheen, alçadas foram transferidas para os meios de cultura utilizados para observação do crescimento bacteriano: meio Lowenstein-Jensen, TSA e ágar cetrimida. A partir do crescimento em TSA, foi realizado o estoque das bactérias em criotubos, contendo TSB com 20% de glicerol, e mantidos a -70°C .

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

As bactérias a serem identificadas foram cultivadas em placas contendo meio TSA, através da técnica de esgotamento, e incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir do crescimento em placa, foi realizada a bacterioscopia pelo método de Gram. Para confirmação das características morfo-tintoriais, foi realizada a técnica do hidróxido de potássio. Uma colônia isolada na placa de TSA foi retirada com a ajuda de uma alça e esfregada em solução de KOH 3% (hidróxido de potássio) por 1 minuto. No caso de formação de um filete após a alça ser levantada do esfregaço, a bactéria deve ser considerada Gram-negativa. Caso não seja formado o filete, a bactéria deve ser considerada Gram-positiva (POWERS, 1995).

Além da técnica do KOH, o crescimento em placa de TSA foi utilizado para a identificação das bactérias no equipamento VITEK 2 (bioMérieux). Alçadas do microrganismo foram retiradas para a realização de uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala MacFarland em solução de cloreto de sódio 0,45-0,5%. A suspensão foi, então, colocada no aparelho em cartão de identificação (Cartão VITEK 2 GN, nº lote: 241188540) relativo às características morfo-tintoriais confirmadas pela técnica do KOH. O ciclo do equipamento para a realização das provas bioquímicas foi de 24h.

3.5 CEPAS BACTERIANAS

Neste trabalho, foram utilizadas para o método da DU as cepas de referência de *S. aureus* INCQS nº 00039 (ATCC 6538) e *S. choleraesuis* INCQS nº 00028 (ATCC 10708) segundo o preconizado pela AOAC (TOMASINO, 2007). Para as metodologias do CEN, foram utilizadas as cepas de referência de *S. aureus* INCQS nº 00039 (ATCC 6538), *P. aeruginosa* INCQS nº 00025 (ATCC 15442), *E. coli* INCQS nº 00031 (ATCC 10536) e *Enterococcus hirae* INCQS nº 00019 (ATCC 10541) (EUROPEAN STANDARD 14885, 2006). Além dessas, foram utilizadas nas duas metodologias aquelas bactérias isoladas de domicílio (**Tabela 3**).

3.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE DESINFETANTES DE USO GERAL PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO

3.6.1 Manutenção dos microrganismos de referência

Ampolas contendo os microrganismos liofilizados foram reconstituídas com 0,5 mL de caldo nutriente Difco (para *S. choleraesuis*) ou TSB (para *S. aureus*). Alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para um tubo contendo o mesmo caldo e

este foi incubado por 18-24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram semeados também, por estrias, três tubos com ágar nutriente inclinado, incubados por 48 ± 2 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir do crescimento em caldo, foi realizada a bacterioscopia para a observação da morfologia das células. Para a verificação da pureza da cultura, foi semeada uma placa de Petri com ágar nutriente Difco e incubada por 18-24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Caso a cultura estivesse pura, os três tubos de ágar nutriente inclinado eram estocados a $2-5^\circ\text{C}$ por 30 ± 2 dias (cultura estoque) (TOMASINO, 2007, INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

Tabela 3

Microrganismos utilizados nos testes para avaliação da atividade antimicrobiana preconizados pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN).

Métodos	Microrganismos
<p style="text-align: center;">Diluição de Uso</p>	<p style="text-align: center;"><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella choleraesuis</i></p> <p>Isolado domiciliar (cozinha) – <i>Enterobacter cloacae</i> Isolado domiciliar (banheiro) - <i>Enterobacter cloacae</i></p>
<p style="text-align: center;">Metodologia CEN Fase 1 Fase 2, Etapa1 Fase 2, Etapa 2</p>	<p style="text-align: center;"><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus hirae</i></p> <p>Isolado domiciliar (cozinha) - <i>Enterobacter cloacae</i> Isolado domiciliar (banheiro) - <i>Enterobacter cloacae</i></p>

3.6.2 Cilindros carreadores

Foram utilizados cilindros de aço inoxidável tipo 304, SS 18-8, polidos, com 8 ± 1 mm de diâmetro externo, 6 ± 1 mm de diâmetro interno e 10 ± 1 mm de comprimento.

Antes da realização dos ensaios, os cilindros sofreram uma preparação específica. Inicialmente foram observados possíveis danos visíveis, como arranhões, lascas e orifícios. Os cilindros foram então fervidos em água destilada por 10 minutos e, posteriormente, tratados com solução de hidróxido de sódio 1M por uma noite. Após esse tratamento, os cilindros foram lavados abundantemente com água corrente até a água de lavagem apresentar pH neutro. Após esse procedimento, os cilindros foram colocados em tubos de ensaio 25 mm x 200 mm com tampa de rosca na quantidade de 12 cilindros por tubo e cobertos com água purificada. Os tubos foram, então, esterilizados por autoclavação a 121°C por 20 minutos e guardados à temperatura ambiente até a realização dos ensaios (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

3.6.3 Metodologia

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. O 4º repique consecutivo, a ser utilizado no teste, 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 2**). Após o tempo de incubação, as culturas testes foram agitadas e reunidas em um frasco estéril, e distribuídas em alíquotas de 20 mL em 3 tubos de 25 X 150 mm estéreis (**Figura 3**). Foram então transferidos 22 cilindros de aço inox estéreis (20 foram utilizados no ensaio e 2 foram usados no controle de fertilidade descrito posteriormente), com auxílio do gancho de transferência para cada um dos três tubos da cultura teste de 48 h, onde permaneceram submersos por 15 minutos à temperatura ambiente (**Figura 3**). Após esse tempo de contato, utilizando-se o

gancho flambado, os 22 cilindros foram cuidadosamente dispostos verticalmente em duas placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro Whatman nº 2, e as placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 40 minutos (**Figura 4**).

Figura 2 - Etapa inicial da preparação do inóculo realizado a partir das culturas estocadas para o Método da Diluição de Uso (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009)

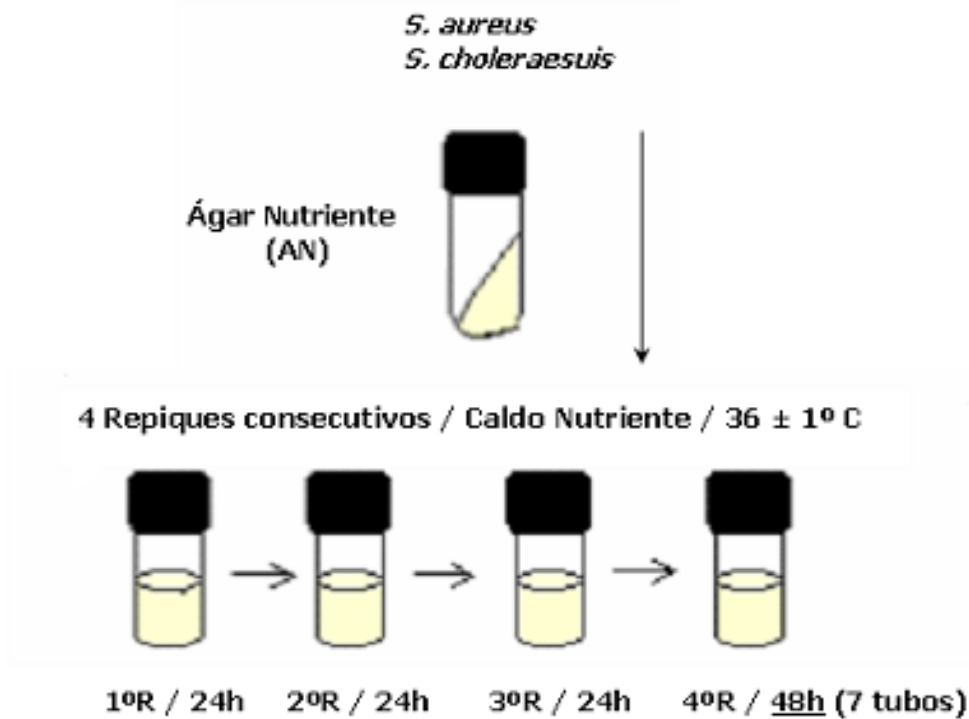
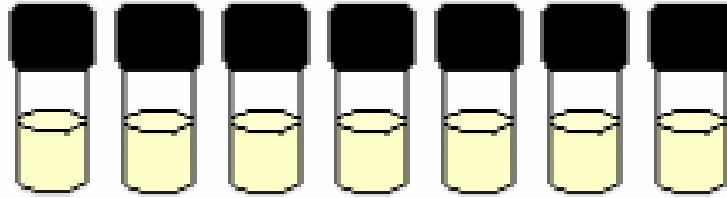
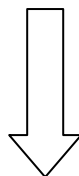
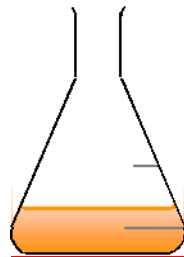
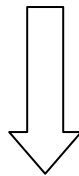


Figura 3 - Esquema dos procedimentos empregados no preparo do inóculo utilizado no Método da Diluição de Uso, a partir do 4º repique após incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009)

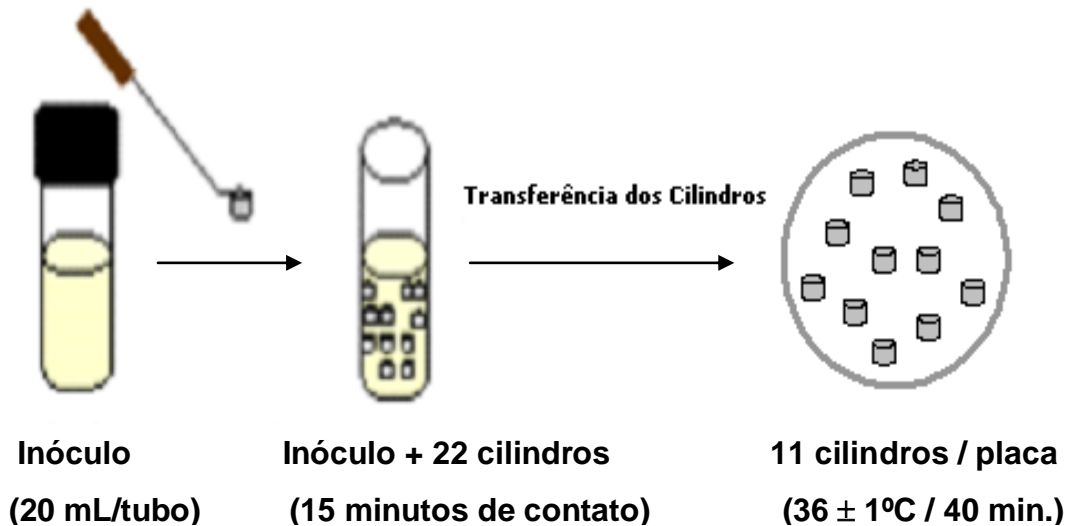


4º Repique – 7 tubos contendo o microrganismo teste em 10 mL de Caldo Nutriente.



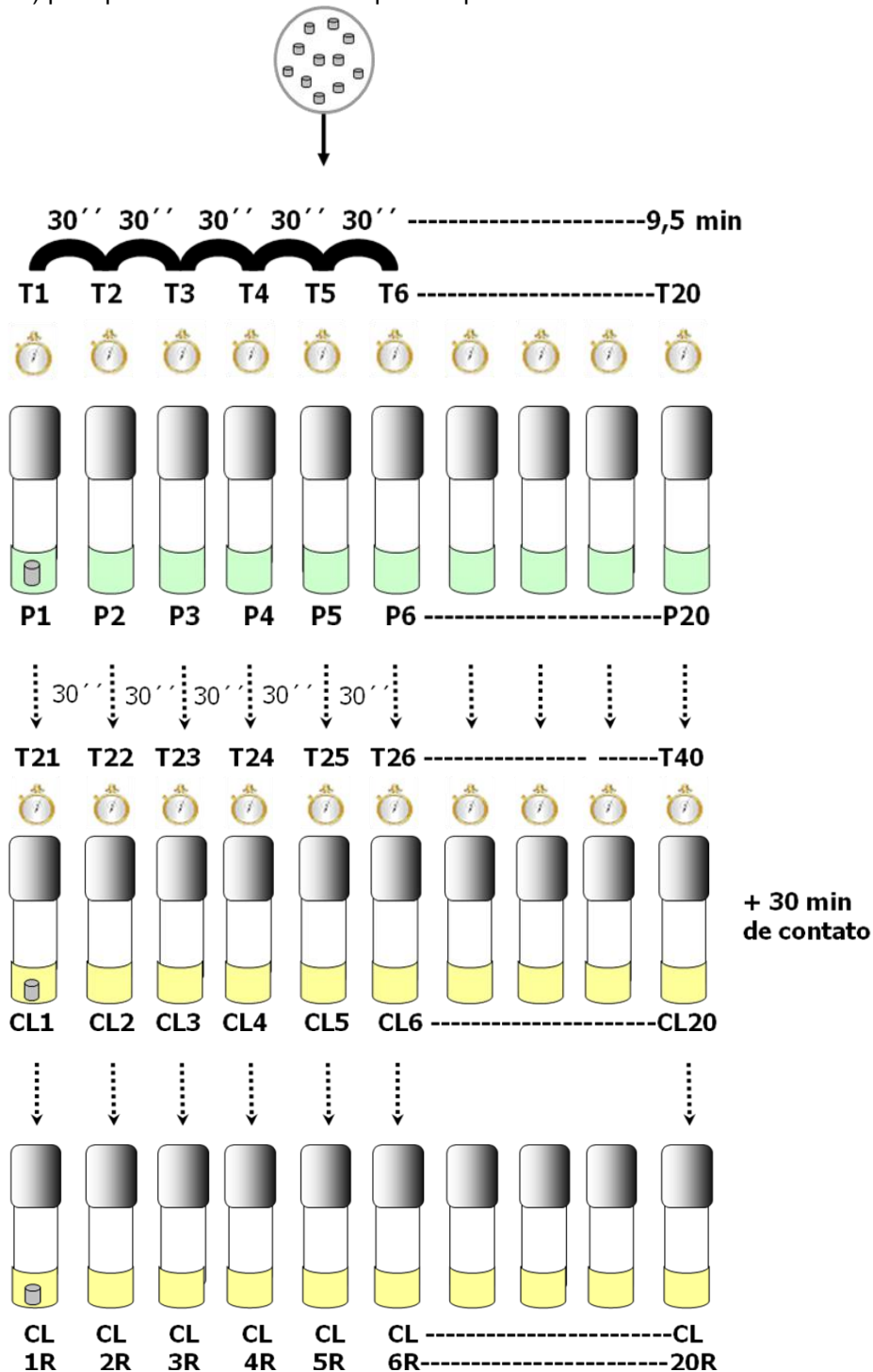
Inóculo de 20 mL

Figura 4 - Etapa de contaminação e transferência dos cilindros segundo o Método da Diluição (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009)



Cada um dos cilindros foi transferido assepticamente e cronometradamente, com intervalo de 30 segundos, para cada um dos 20 tubos contendo 10 mL do produto à temperatura de 20°C. Após o tempo de contato de 10 minutos, os cilindros foram transferidos para 20 tubos contendo 10 mL de meio de cultura (caldo Letheen para os produtos à base de compostos quaternários de amônio e caldo nutriente para a solução de álcool etílico a 70%). Após 30 minutos, a contar da transferência do último cilindro para o tubo com o meio de cultura, estes foram novamente transferidos para tubos contendo 10 mL do mesmo meio (subcultura) e o total de 40 tubos de meio de cultura foi incubado a 36 ± 1°C por 48 horas. Esse procedimento foi realizado em três baterias de 20 cilindros cada, perfazendo um total de 60 cilindros de aço inoxidável e 120 tubos contendo o meio de subcultura (**Figura 5**).

Figura 5 - Esquema da transferência dos cilindros entre tubos utilizados no método da Diluição de Uso (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009). 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 30 segundos (T2) outro cilindro é transferido para o 2º tubo contendo o produto e assim sucessivamente. O último cilindro é transferido no tempo T20 ao tubo P20 e após 30 segundos o 1º cilindro, que se encontra no tubo P1 que terá totalizado 10 minutos de contato com o produto, é transferido no tempo T21 para o 1º tubo contendo o meio de cultura (CL 1). No tempo T22 o 2º cilindro é transferido do tubo T12 para o tubo CL2 e assim sucessivamente. A nomenclatura dos meios de cultura exemplifica o uso de caldo Letheen (CL) para produtos à base de compostos quaternários de amônio



3.6.4 Leitura e avaliação dos resultados

Para leitura do teste 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 teste foi repetido de acordo com os critérios preconizados no POP INCQS nº 65.3210.007, ou seja, no caso do resultado do teste ser satisfatório, não foi realizada nenhuma repetição. Entretanto, quando o resultado do teste foi insatisfatório, houve a nova realização do mesmo teste. No caso de haver crescimento microbiano, foi confirmada a presença do microrganismo teste utilizado no teste através de bacterioscopia pelo método de Gram e prova da coagulase (para *S. aureus*) e sorologia com soro polivalente (para *Salmonella choleraesuis*) (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

3.6.5 Controles

Todo o material envolvido no teste foi verificado quanto à esterilidade, evitando a ocorrência de resultado falso-positivo. Os controles realizados testes estão descritos abaixo:

- 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 teste, não devendo ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

- Esterilidade da água purificada

Neste procedimento, foi adicionado 0,2 mL da água purificada estéril, usada para diluir o produto, a um tubo contendo o meio de subcultura utilizado no teste e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, não devendo ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

- Esterilidade dos lotes de pipetas

Foi separada uma pipeta de cada lote utilizado no teste e com o auxílio de um pipetador automático, foi 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, não devendo ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

- Esterilidade dos carreadores

Um cilindro estéril, do lote empregado no teste, foi transferido para um tubo contendo o meio de subcultura utilizado no teste e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, não devendo ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

- Fertilidade do meio de cultura

Um cilindro contaminado e seco foi transferido para um tubo contendo o mesmo lote do meio de subcultura utilizado no teste. Este foi incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após esse tempo de incubação a evidência de crescimento foi observada através da turvação do meio de subcultura (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

3.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PRODUTOS DESINFETANTES DESTINADOS A DESINFECÇÃO DE SUPERFÍCIES EM AMBIENTES DOMÉSTICO, INSTITUCIONAL E INDUSTRIAL SEGUNDO O COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO

Essa avaliação é baseada em um conjunto de normas que preconizam desde a abertura de ampolas, preservação das cepas bacterianas e os testes de avaliação da atividade antimicrobiana propriamente ditos, incluindo até 3 fases de avaliação (**Tabela 4**).

Tabela 4

Etapas da metodologia preconizada pelo CEN.

Etapa	Observação	Objetivo
Fase 1	Etapa em suspensão	Triagem inicial para encontrar a concentração ideal de uso (não é obrigatória para a avaliação da eficácia)
Fase 2, Etapa 1 (Fase 2.1)	Etapa em suspensão, com adição de substância interferente	Avaliação do desinfetante na presença de substância interferente para mimetizar a presença de matéria orgânica
Fase 2, Etapa 2 (Fase 2.2)	Etapa em superfície, com utilização de discos de aço inox	Teste em superfície, mimetizando o uso do produto em superfícies contaminadas no ambiente

3.7.1 Manutenção dos microrganismos de referência

Ampolas contendo microrganismos liofilizados foram reconstituídas com 1,0 mL de TSB. Essa suspensão foi diluída em 5,0 mL do mesmo caldo e agitada para obter uma suspensão homogênea. Duas placas de Petri contendo TSA foram inoculadas com a suspensão bacteriana, uma com 0,1 mL da suspensão, gerando um crescimento confluyente na placa, e a outra com uma alçada para crescimento em isolamento. As duas placas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Esta última foi utilizada para a verificação da pureza da cultura e a realização da bacterioscopia pelo método de Gram para observação da morfologia.

À placa com crescimento confluyente, foram adicionados 10 mL de solução crioprotetora (extrato de carne, digesto pancreático de caseína e glicerol), realizando-se uma raspagem da superfície para a obtenção de uma suspensão de células. Essa suspensão foi alíquotada em criotubos, em porções de 0,5 mL da suspensão bacteriana. Os criotubos foram mantidos à temperatura de -70°C por 14 meses (cultura estoque).

A partir da suspensão criopreservada, foi obtida a cultura de trabalho. Uma alçada da suspensão criopreservada foi transferida para dois tubos contendo TSA inclinado, incubados por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após o tempo de incubação, os tubos foram mantidos a $2-5^\circ\text{C}$ por no máximo 9 semanas (excessão para *P. aeruginosa*, a qual foi mantida por no máximo 6 semanas) (EUROPEAN STANDARD 12353, 2006).

3.7.2 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida Básica de Desinfetantes Químicos e Antissépticos – Fase 1 (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005)

3.7.2.1 Repiques

Para a obtenção da cultura teste, a partir da cultura de trabalho, foram realizados dois repiques consecutivos em meio TSA inclinado, com incubação por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Um terceiro repique opcional é permitido.

3.7.2.2 Padronização do inóculo inicial

Conforme preconizado pela norma EN 1040, o inóculo inicial utilizado nos testes deve estar entre $1,5 \times 10^8$ e $5,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para padronizar essa faixa na prática, foi adotada, para cada microrganismo, uma relação entre densidade ótica (leitura em espectrofotômetro) e contagem de colônias em placas (unidades formadoras de colônia – UFC).

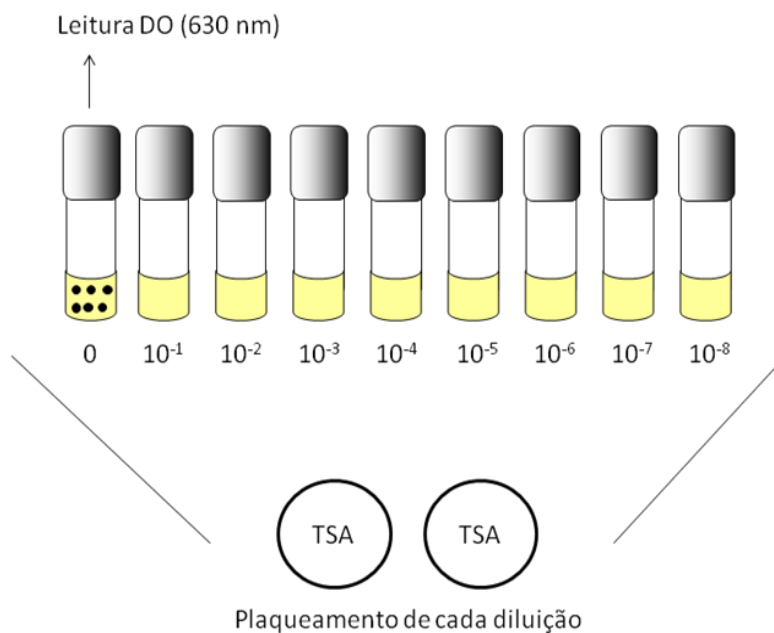
Para isso, a partir do segundo repique, alçadas foram transferidas para um tubo contendo solução diluente (digesto pancreático de caseína e cloreto de sódio) e 5 g de pérolas de vidro. O tubo foi, então, agitado a 1.000 g por 3 minutos. A partir dessa suspensão, foi realizada uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-8} . Cada diluição foi plaqueada (1 mL) em meio TSA através da técnica de *pour plate* e incubada por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após o tempo de incubação, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas nas placas onde foi possível encontrar contagem entre 14 e 330 UFC (**Figura 6**).

A média ponderada da contagem das duas placas de cada diluição foi obtida e multiplicada pela diluição para a obtenção do número de células por mL. Foram realizadas três repetições desse procedimento para a obtenção de pelo menos três correlações entre densidade ótica (DO) e número de células/mL, para ser possível

obter uma faixa de DO a qual correspondesse à faixa de $1,5 \times 10^8$ e $5,0 \times 10^8$ UFC/mL.

A DO desta suspensão foi medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 630 nm.

Figura 6 - Padronização do inóculo inicial através da utilização conjunta de técnica espectrofotométrica (leitura da DO) e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).



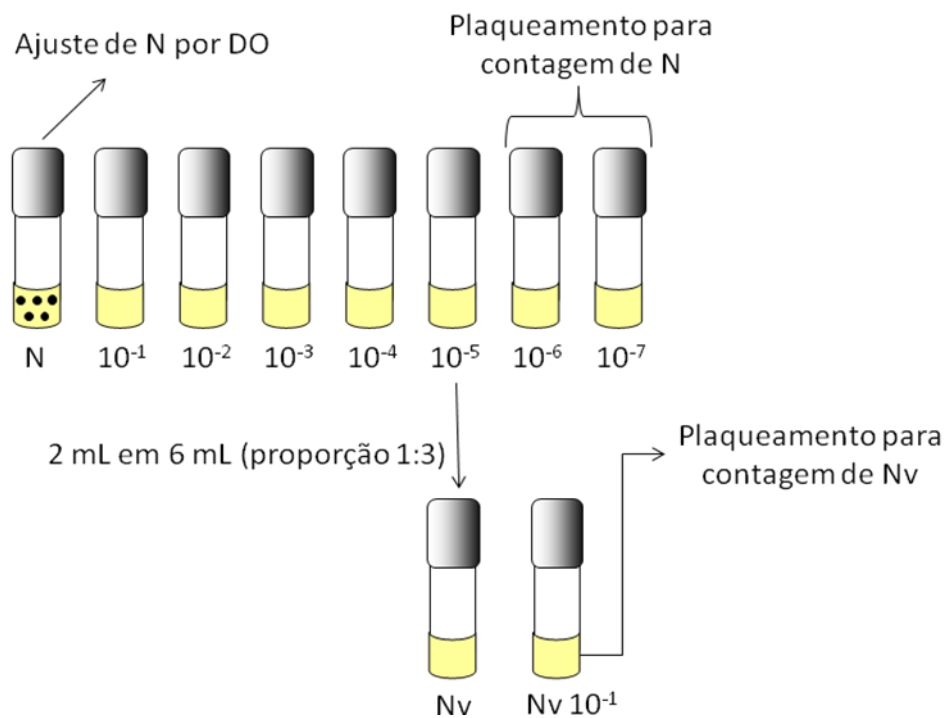
3.7.2.3 Realização do teste

Na realização do teste propriamente dito, a partir do 2º repique, alçadas com o microrganismo teste foram transferidas para um tubo contendo 15 mL de solução diluente e 5 g de pérolas de vidro. Essa suspensão foi agitada a 1.000 g por 3 minutos (5 minutos para *P. aeruginosa*). Para ajustar a suspensão inicial (N), alíquotas de 3 mL foram retiradas e realizada a leitura em espectrofotômetro para medir a DO. Com a suspensão inicial ajustada, de acordo com a padronização

inicial, foi realizada uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-7} . As diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueadas em meio TSA para a contagem da suspensão inicial (**Figura 7**).

Para os controles, foi preparada uma suspensão de validação (Nv), padronizada entre $3,0 \times 10^2$ e $1,6 \times 10^3$ UFC/mL, transferindo 2 mL da diluição 10^{-5} para um tubo contendo até 6 mL de solução diluente (proporção 1:3). Para a contagem em placa da suspensão de validação, foi realizada uma diluição 10^{-1} (**Figura 7**).

Figura 7 - Preparação e ajuste da suspensão teste (N) e da suspensão de validação (Nv). DO = densidade ótica



Com a suspensão teste (N) e a suspensão de validação (Nv) preparadas, o teste propriamente dito pôde ser realizado.

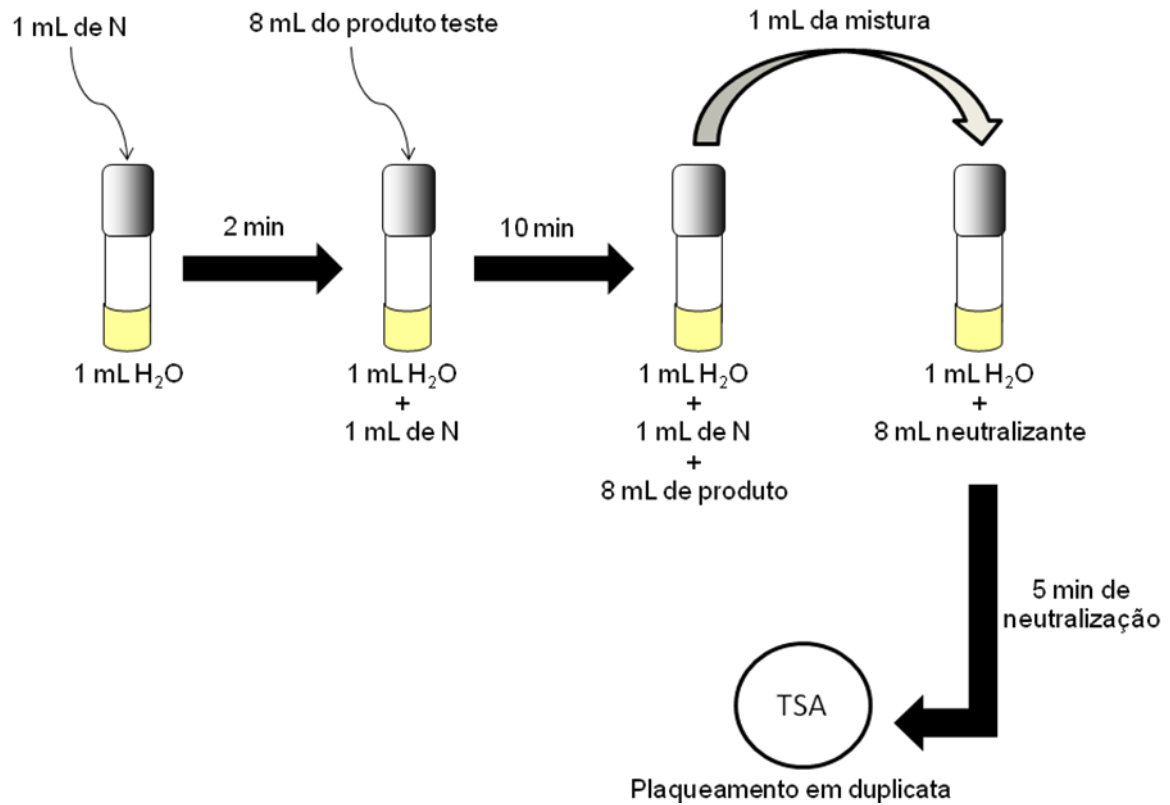
Um mL da suspensão teste foi transferido para um tubo contendo 1 mL de água purificada estéril. Após 2 minutos, 8 mL do produto teste foram adicionados ao tubo. Após 10 minutos de contato e ação do produto, 1 mL da mistura foi transferida para um tubo contendo 1 mL de água e 8 mL de solução neutralizante. Após 5 minutos de neutralização, 1 mL da mistura foi plaqueada em duplicata em meio TSA

adicionado do mesmo neutralizante. As placas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Figura 8**). Todo o procedimento foi realizado em banho de água a 20°C .

Esse procedimento foi realizado para cada diluição do produto teste e segundo o preconizado pelo método do CEN, cada produto teste deve ser testado utilizando-se 3 concentrações diferentes: uma concentração acima da recomendada pelo fabricante, a concentração recomendada pelo fabricante e uma concentração abaixo da recomendada pelo fabricante. Esta última deve ser ineficaz em eliminar os microrganismos nos testes. As duas concentrações extras são utilizadas apenas como um controle do comportamento do produto nos testes, entretanto para fins de cálculos do resultado é utilizada apenas a concentração recomendada pelo fabricante. Para a avaliação do produto à base de álcool etílico, este foi utilizado sem diluição (produto puro), a 70% (concentração de uso) e a 25% (concentração abaixo da recomendada). Para o produto A, por ter recomendação de uso sem diluição (produto puro), foram utilizadas somente 2 concentrações, o produto puro (recomendação do fabricante) e diluído a 50%. Já para o produto B, foram utilizadas as concentrações de 10% (concentração acima da recomendada), 5% (concentração recomendada pelo fabricante) e 1% (concentração abaixo da recomendada).

Em relação à solução neutralizante utilizada, foram testadas 4 soluções neutralizantes, sendo elas compostas por polissorbato 80 (30 g/L) + lecitina (3 g/L); polissorbato 80 (30 g/L) + lecitina (3 g/L) + dodecil sulfato de sódio (4 g/L); polissorbato 80 (30 g/L) + lecitina (3 g/L) + saponina (30 g/L); polissorbato 80 (30 g/L), lecitina (3 g/L), tiosulfato de sódio (5 g/L) e L-histidina (1 g/L). No caso do produto álcool etílico 70%, a solução neutralizante foi substituída por água purificada, uma vez que este princípio ativo não necessita de neutralização por não possuir efeito residual.

Figura 8 - Esquema do teste de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes EN 1040 (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005). N: suspensão teste



3.7.2.4 Controles

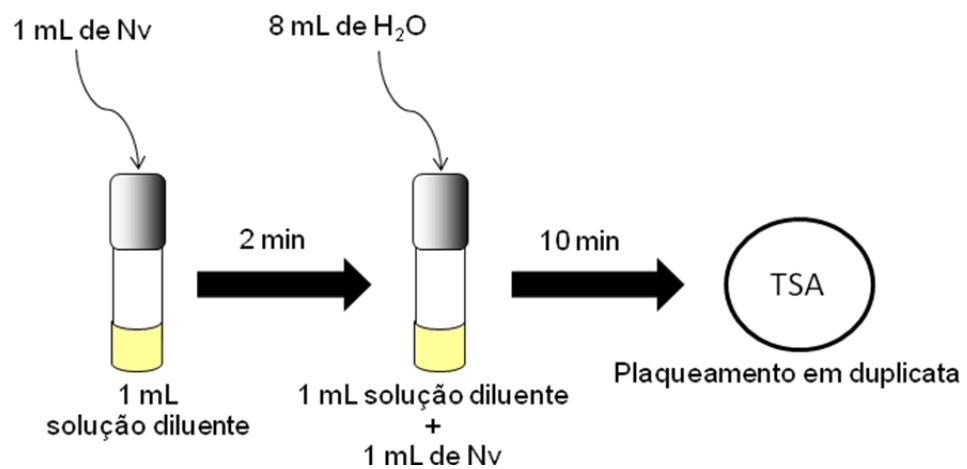
A metodologia preconiza a realização de 3 controles do teste: controle do microrganismo (A), controle do microrganismo frente ao neutralizante (B) e controle da neutralização (C).

Controle A:

Um mL da suspensão de validação foi transferida para um tubo contendo 1 mL de água. Após 2 minutos, 8 mL de água foram adicionados ao tubo. Após 10

minutos de contato, 1 mL da mistura foi plaqueada em duplicata em meio TSA. As placas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Figura 9**).

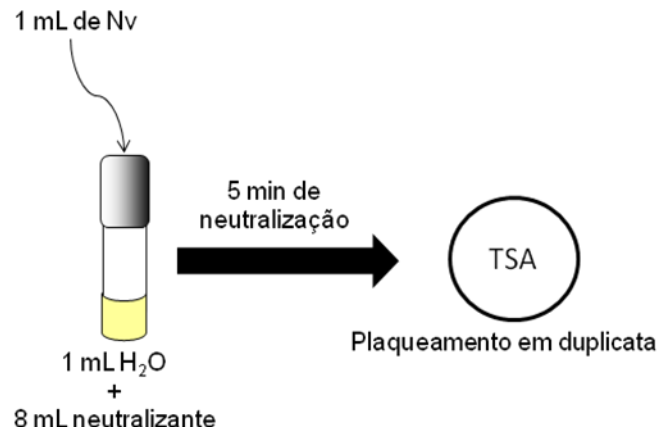
Figura 9 - Esquema do controle A do teste (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005). Nv: suspensão de validação



Controle B:

Um mL da suspensão de validação foi transferida para um tubo contendo 8 mL de solução neutralizante e 1 mL de água. Após 5 minutos de neutralização, 1 mL da mistura foi plaqueada em duplicata em meio TSA. As placas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Figura 10**).

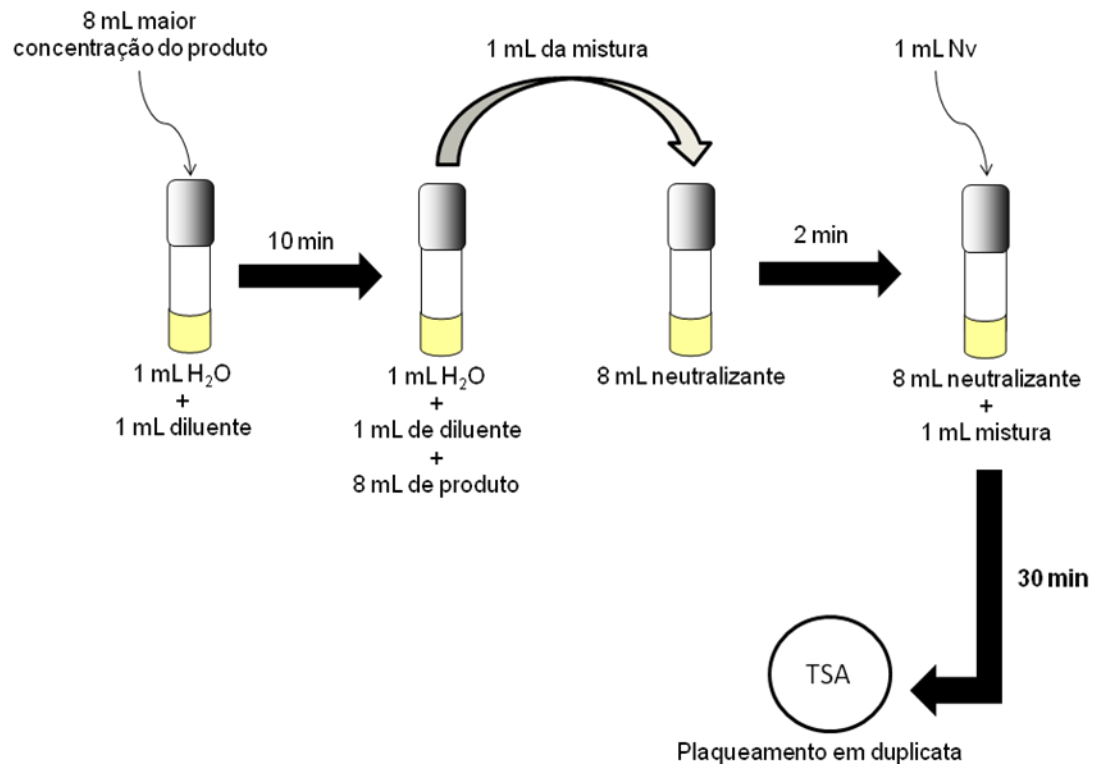
Figura 10. Esquema do controle B do teste (EUROPENA STANDARD 1040, 2005). Nv: suspensão de validação



Controle C:

Oito mL da concentração mais alta do produto teste utilizado no teste foram transferidos para um tubo contendo 1 mL de água e 1 mL de solução diluente. Após 10 minutos de contato e ação do produto, 1 mL da mistura foi transferido para um novo tubo contendo 8 mL de solução neutralizante. Após 5 minutos de neutralização, foi adicionado 1 mL da suspensão de validação. Após 30 minutos, 1 mL da mistura foi plaqueada em duplicata em meio TSA. As placas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Figura 11**).

Figura 11 - Esquema do controle C do teste (EUROPEAN STANDARD 1040, 2005). Nv: suspensão de validação



Na prática, para a realização simultânea do procedimento de 3 concentrações de produto teste e três controles, foi montado um esquema de encaixe dos tempos de cada passo, demonstrado na **Figura 12 (a e b)**.

Figura 12a - Esquema de realização do teste EN 1040 demonstrando passo a passo a realização dos controles. Nv: suspensão de validação; A: controle A; B: controle B; C: controle C. Os números em caixa vermelha indicam os tempos em minutos de cada etapa do teste

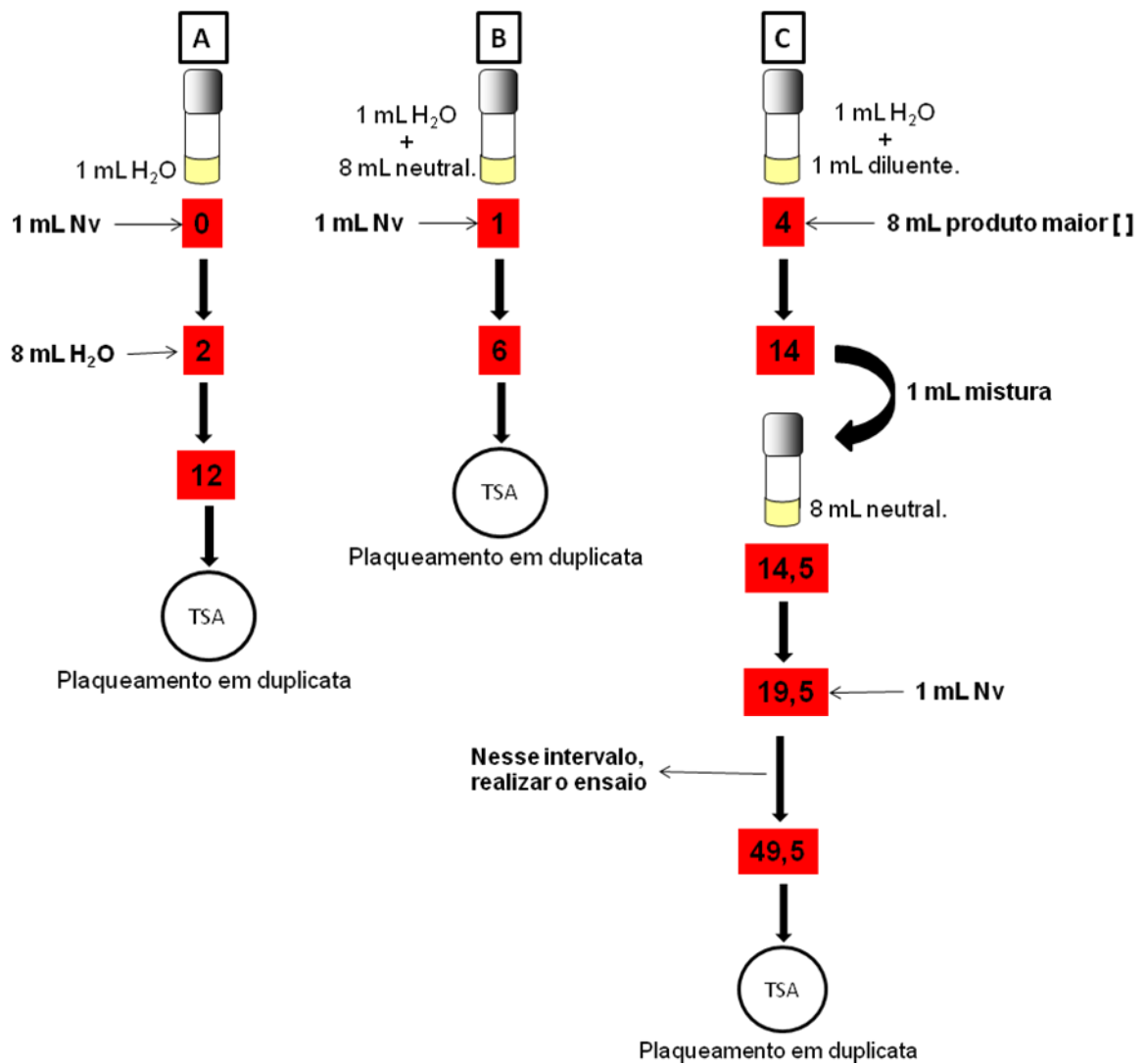
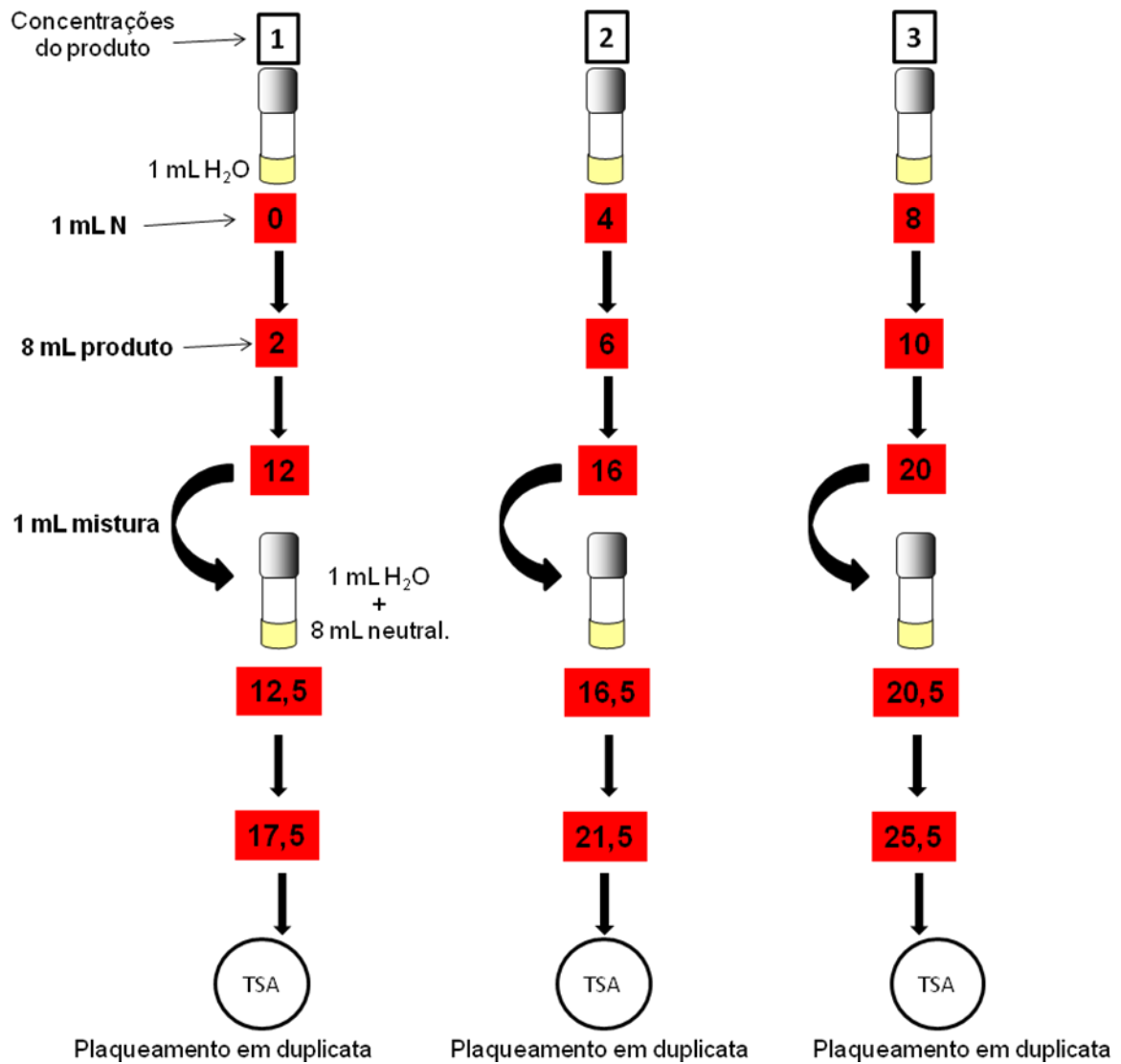


Figura 12b - Esquema de realização do teste EN 1040. N: suspensão teste; 1: concentração mais alta do produto teste; 2: concentração do produto teste recomendada pelo fabricante; 3: concentração mais baixa do produto teste. Os números em caixa vermelha indicam os tempos em minutos de cada etapa do teste.



3.7.2.5 Leitura e avaliação dos resultados

A partir do crescimento nas placas com meio TSA, foi realizada a contagem das UFC e cálculo em logaritmo da suspensão teste inicial (contagem das placas referente às diluições 10^{-6} e 10^{-7}) e da mistura final (contagem das placas referente ao teste). Para o produto ser considerado satisfatório, deve ser capaz de reduzir a população inicial em pelo menos 5 log.

Para o cálculo da suspensão inicial, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 n_2) 10^{-6}}$$

Onde,

C = é a soma das UFC contadas no plaqueamento da suspensão inicial

n_1 = é o número de placas semeadas da diluição 10^{-6}

n_2 = é o número de placas semeadas da diluição 10^{-7}

10^{-6} = é o fator de diluição correspondente a menor diluição

A faixa padronizada da suspensão inicial deve estar entre $1,5 \times 10^8$ e 5×10^8 .

Para o cálculo da suspensão final (N_a), após o contato com o produto desinfetante, foi realizada a média aritmética da contagem de UFC das placas semeadas. Esse valor encontrado foi multiplicado por 10, devido à adição de neutralizante, o que dilui em 10 vezes a suspensão:

$$N_a = 10 c/n$$

Onde,

c = é a soma das UFC contadas no plaqueamento da suspensão final

n = é o número de replicatas utilizadas

Para o cálculo da suspensão de validação (N_v), foi realizada a média aritmética da contagem de UFC das placas semeadas. Esse valor encontrado foi multiplicado por 10, devido à diluição 10^{-1} feita para a contagem em placa:

$$N_v = 10 c/n$$

Onde,

c = é a soma das UFC contadas no plaqueamento da suspensão final

n = é o número de replicatas utilizadas

A faixa padronizada da suspensão de validação deve estar entre $3,0 \times 10^2$ e $1,6 \times 10^3$, equivalendo a uma contagem de 30-160 UFCs nas respectivas placas.

Para o cálculo dos controles A, B e C, foi realizada a média aritmética da contagem de UFC das placas semeadas. Esses valores deveriam ficar maiores ou iguais à metade do valor encontrado na suspensão de validação.

Para o cálculo do logaritmo da redução ($\log R$), foi utilizado o log de N_0 , devido a diluição de 10^{-1} da suspensão inicial (N):

$$\log R = \log N_0 - \log N_a$$

Onde,

N_0 = é o valor em logaritmo da suspensão inicial dividido por 10

N_a = é o valor em logaritmo da suspensão final

3.7.3 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes Químicos e Antissépticos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 1 (EUROPEAN STANDARD 1276, 2009)

A partir do 2º repique, alçadas do microrganismo teste foram transferidas para um tubo contendo 15 mL de solução diluente e 5 g de pérolas de vidro. Essa suspensão foi agitada a 1.000 g por 3 minutos (5 minutos para *P. aeruginosa*). Para ajustar a suspensão inicial (N), alíquotas de 3 mL foram retiradas e realizada a leitura em espectrofotômetro para medir a DO, com comprimento de onda de 630 nm. Com a suspensão inicial ajustada, foi realizada uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-7} . As diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueadas em meio TSA para a contagem da suspensão inicial (**Figura 7**).

Para os controles, foi preparada uma suspensão de validação (Nv), transferindo 2 mL da diluição 10^{-5} para um tubo contendo 6 mL de solução diluente (proporção 1:3). Para a contagem em placa da suspensão de validação, foi realizada uma diluição 10^{-1} (**Figura 7**).

Com a suspensão teste (N) e a suspensão de validação (Nv) preparadas, o teste propriamente dito pôde ser realizado.

O procedimento da fase 2, etapa 1 é muito semelhante com a fase 1, a diferença está na substituição de 1 mL de água por 1 mL de soroalbumina bovina (BSA) 3% nos seguintes tubos: primeiro tubo do teste, tubo do controle A e primeiro tubo do controle C. O BSA foi utilizado como substância interferente, simulando a presença de matéria orgânica na ação do produto desinfetante. Com exceção dessa substituição, todo o processo foi igual à fase 1, como já demonstrado nas **Figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12**. Os cálculos utilizados para a avaliação dos resultados são os mesmos demonstrados para a fase 1.

Além disso, na fase 2, etapa 1, para os produtos A e B foi testada uma 5ª solução neutralizante, composta por polissorbato 80 (36 g/L), lecitina (3,6 g/L), tiosulfato de sódio (6 g/L) e L-histidina (1,2 g/L), representando um aumento de 20% na concentração desses componentes em relação a mesma solução utilizada na fase 1.

3.7.4 Teste Quantitativo em Superfície Não Porosa para Avaliação da Atividade Bactericida e/ou Fungicida de Desinfetantes Químicos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 2 (EUROPEAN STANDARD 13697, 2001)

3.7.4.1 *Tratamento inicial dos carreadores de microrganismos*

Como carreadores, foram utilizados discos de aço inox 304 com no mínimo 10,5% de cromo e máximo de 1,2% de carbono, com 2 cm de diâmetro, 1,5 mm de espessura externa (borda) e 1 mm de espessura interna (EUROPEAN STANDARDS 10088, 2005).

Os discos de aço inox foram previamente tratados com 5% de Triton X-100 por 60 minutos, para a retirada de sujidades. Após esse período, os discos foram lavados abundantemente em água corrente para a retirada do Triton. Posteriormente, os discos foram tratados com isopropanol 70% (v/v) durante a noite. No dia seguinte, os discos foram retirados da solução e secados assepticamente, e estocados em tubos estéreis.

3.7.4.2 *Preparação do inóculo inicial*

A partir do 2º repique, alçadas do microrganismo teste foram transferidas para um tubo contendo 15 mL de solução diluente e 5 g de pérolas de vidro. Essa suspensão foi agitada a 1.000 g por 3 minutos (5 minutos para *P. aeruginosa*). Para ajustar a suspensão inicial (N), alíquotas de 3 mL foram retiradas e realizada a leitura em espectrofotômetro para medir a DO, com comprimento de onda de 630 nm. Com a suspensão inicial ajustada, foi realizada uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-7} . As diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueadas em meio TSA para a contagem da suspensão inicial (**Figura 7**).

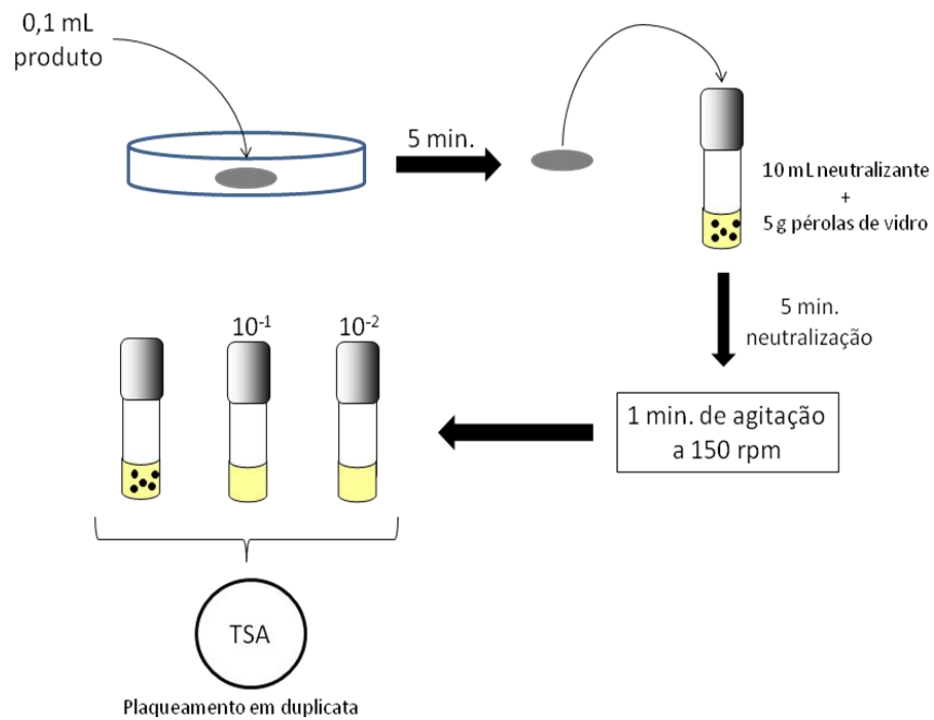
3.7.4.3 Contaminação dos discos

Um mL da suspensão inicial foi adicionada a 1 mL de BSA 3% por 2 minutos. Após esse tempo, 50 μ L da mistura foram adicionados em cada disco, de forma a cobrir toda a superfície. Os discos foram, então, incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 40 minutos e, posteriormente, à temperatura ambiente por mais 20 minutos para equilibrar a temperatura.

3.7.4.4 Teste propriamente dito

Aos discos contaminados e secos, foram adicionados 100 μ L do produto teste em três concentrações: a concentração recomendada pelo fabricante, uma concentração acima da recomendada e uma concentração abaixo da recomendada. Após 5 minutos de contato do produto com a superfície contaminada dos discos, estes foram mergulhados em tubos de 4-5 cm de diâmetro, contendo 10 mL de solução neutralizante e 5 g de pérolas de vidro. Após 5 minutos de neutralização, os tubos foram agitados por 1 minuto a 150 g. Após esse processo, uma alíquota de 1 mL foi retirada, realizando diluições 10^{-1} e 10^{-2} . Todos os tubos das diluições foram plaqueados em duplicata em meio TSA, incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (**Figura 13**). O valor da contagem das placas do tratamento com o produto teste foi chamado de Nd.

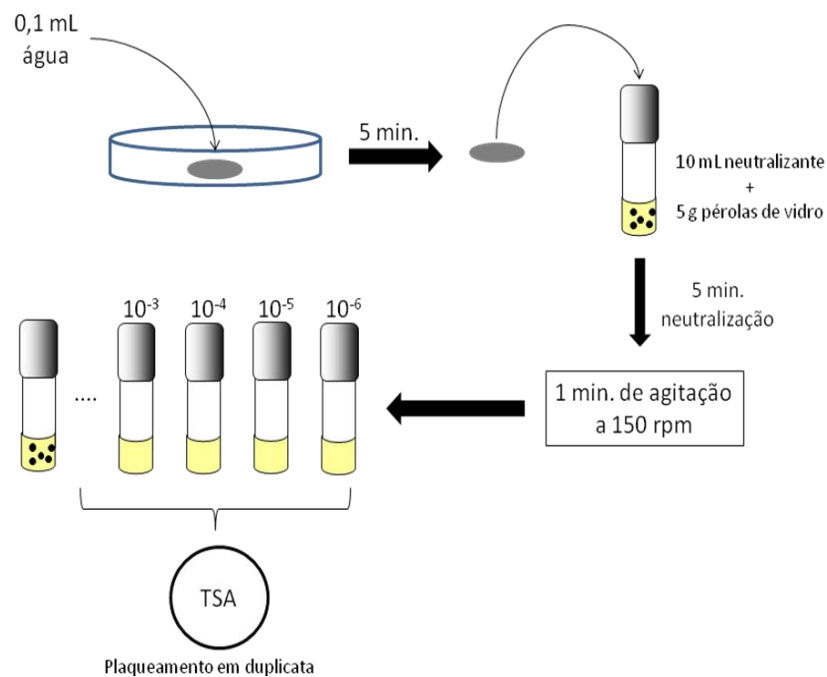
Figura 13 - Esquema representativo do teste da fase 2, etapa 2



3.7.4.5 Controle com água purificada

Este controle foi realizado de forma semelhante ao teste propriamente dito, substituindo-se o produto teste por água. Ao final do processo, foram feitas diluições até 10^{-6} . As diluições de 10^{-3} a 10^{-6} foram plaqueadas em duplicata em meio TSA, incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (**Figura 14**). O valor da contagem das placas do tratamento com o produto teste foi chamado de Nc.

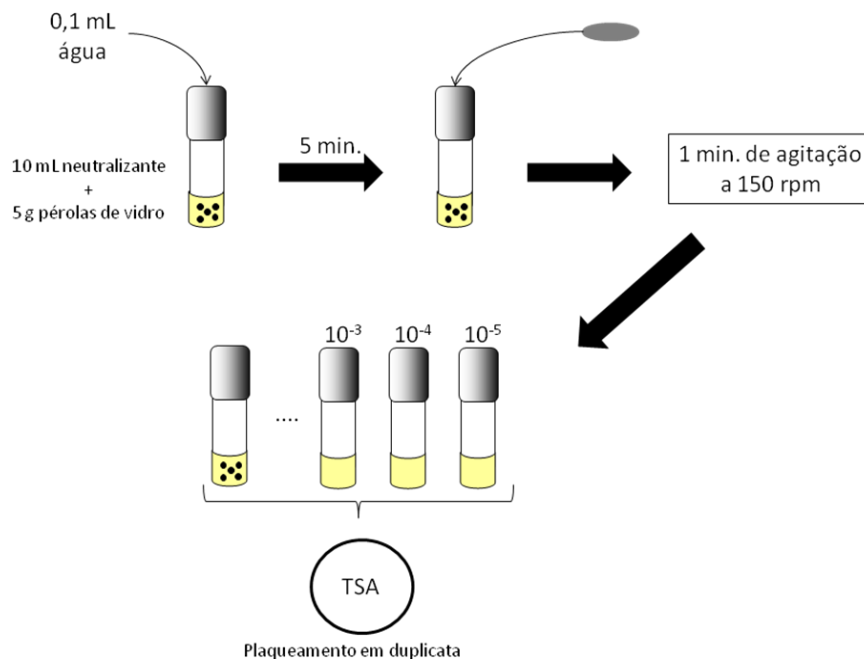
Figura 14 - Esquema representativo do controle de água da fase 2, etapa 2



3.7.4.6 Controle do neutralizante

A um tubo contendo 10 mL de solução neutralizante e 5 g de pérolas de vidro, foi adicionado 0,1 mL de água purificada estéril. Após 5 minutos, um disco previamente contaminado foi adicionado ao tubo, e este foi agitado por 1 minuto a 150 g. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas até 10^{-5} , sendo as diluições 10^{-3} a 10^{-5} plaqueadas em duplicata em meio TSA (**Figura 15**). O valor da contagem das placas do controle da neutralização foi chamado de NC.

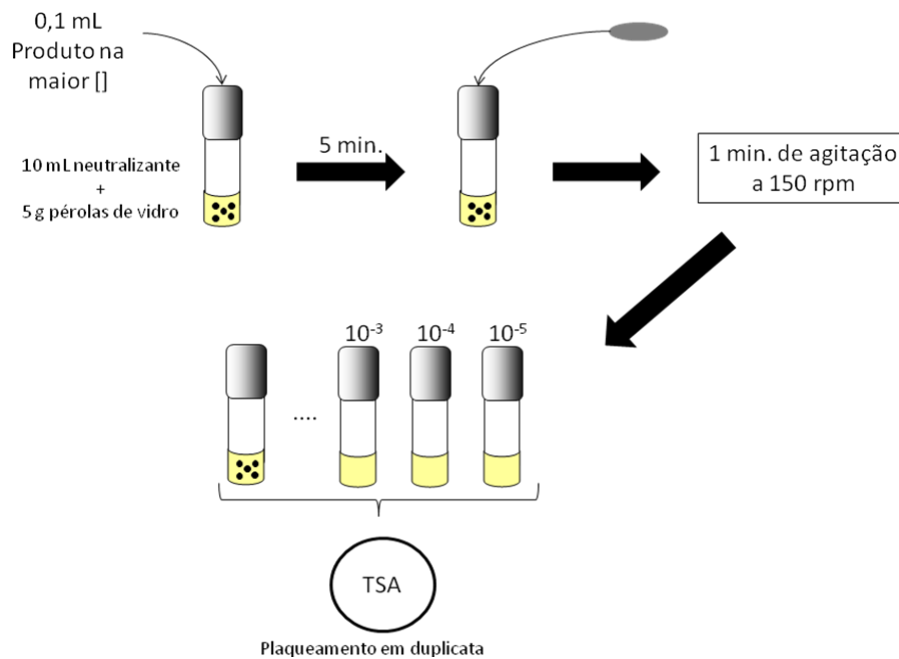
Figura 15 - Esquema representativo do controle do neutralizante da fase 2, etapa 2



3.7.4.7 Teste de neutralização

A um tubo contendo 10 mL de solução neutralizante e 5 g de pérolas de vidro, foi adicionado 0,1 mL do produto teste (foi utilizada a maior concentração do produto usada no teste). Após 5 minutos, um disco previamente contaminado foi adicionado ao tubo, e este foi agitado por 1 minuto a 150 g. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas até 10^{-5} , sendo as diluições 10^{-3} a 10^{-5} plaqueadas em duplicata em meio TSA (**Figura 16**). O valor da contagem das placas do controle da neutralização foi chamado de NT.

Figura 16 - Esquema representativo do teste de neutralização da fase 2, etapa 2



3.7.4.8 Controle do desprendimento das células dos discos

Para confirmar que as células foram adequadamente desprendidas dos discos durante a realização do teste e dos controles, os discos foram retirados dos tubos contendo neutralizante e pérolas de vidro e lavados com 10 mL de água purificada estéril. Após esse procedimento, os discos foram colocados, com a superfície contaminada para cima, em placas contendo 10 mL de TSA solidificado. A superfície contaminada foi, então, raspada com auxílio de ponteiros estéreis por 1 minuto, sendo posteriormente colocados mais 10 mL de TSA fundido. O valor da contagem desse controle foi chamado de NTS.

3.7.4.9 Cálculos e avaliação dos resultados

Para o cálculo do valor da suspensão inicial (N), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$N = \log_{10} \left[\frac{(x + x')}{2} \times \frac{0,05}{d} \right]$$

Onde,

x e x' = contagem de cada placa com TSA

d = maior diluição utilizada

Para o cálculo do resultado do teste (Nd), controle de água (Nc), controle da neutralização (NC) e teste da neutralização (NT), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$N = \log_{10} \left[\frac{(a + a')}{2} \times \frac{10}{d} \right]$$

Onde,

a e a' = contagem de cada placa com TSA

d = maior diluição utilizada

Para que o teste fosse considerado válido, as seguintes condições devem ocorrer:

$N - Nc$ não deve ser maior que $2 \log_{10}$

$N - NC$ não deve ser maior que $2 \log_{10}$

$NC - NT$ não deve ser maior que $\pm 0,3$

NTS não deve apresentar contagem maior que 100 UFC/mL

Para que o produto teste seja considerado satisfatório, o valor de $Nc - Nd$ deve ser igual ou maior que 4 log.

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Antes de serem analisados pelo VITEK 2, algumas características morfo-tintoriais dos microrganismos foram observadas, como crescimento em meios de cultura e morfologia (**Tabela 5**). Após o isolamento, os microrganismos foram identificados pelo VITEK 2, com 99% de probabilidade de identidade, conforme **Tabela 6**.

Tabela 5

Características observadas durante o isolamento e a cultura dos microrganismos oriundos da cozinha, do banheiro e dos produtos contaminados.

Origem dos Microrganismos	Testes	Resultados e Características
Isolado de domicílio (cozinha)	Meio de cultura para isolamento	Ágar cetrimide
	Morfologia (Gram)	Bacilos Gram-negativos
	Técnica KOH	Gram-negativo
Isolado de domicílio (banheiro)	Meio de cultura para isolamento	Ágar McConkey
	Morfologia (Gram)	Bacilos Gram-negativos
	Técnica KOH	Gram-negativo
Produto C	Ágar Lowenstein-Jensen	Colônias esbranquiçadas
	Ágar cetrimide	Crescimento em 48h
	Ágar soja tríptica	Colônias brilhantes, grandes e amareladas
	Morfologia (Gram)	Bastonetes, formam paliçada, arranjos diversos
	Técnica KOH	Gram-negativo
Produto D	Ágar Lowenstein-Jensen	Colônias amarelo-esverdeadas
	Ágar cetrimide	Crescimento em 48h
	Ágar soja tríptica	Colônias brilhantes, pequenas e amareladas
	Morfologia (Gram)	Bastonetes, Gram lábil
	Técnica KOH	Gram-negativo
Produto E	Ágar Lowenstein-Jensen	Colônias esverdeadas
	Ágar cetrimide	Crescimento com mais de 48h (em torno de 5 dias)
	Ágar soja tríptica	Colônias transparentes e grandes
	Morfologia (Gram)	Bastonetes e coco-bacilos, Gram lábil
	Técnica KOH	Gram-negativo

Tabela 6

Microorganismos identificados pelo VITEK 2.

Origem	Microrganismo
Isolado de domicílio (cozinha)	<i>Enterobacter cloacae</i>
Isolado de domicílio (banheiro)	<i>Enterobacter cloacae</i>
Produto C	<i>Serratia marcescens</i>
Produto D	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
Produto E	<i>Aeromonas salmonicida</i>

4.2 ANÁLISE QUÍMICA DOS PRODUTOS DESINFETANTES

A avaliação do teor de princípio ativo presente nos produtos à base de quaternários de amônio utilizados nesse estudo foi realizada de acordo com o POP INCQS nº 65.3110.014 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2011) e está mostrada na **Tabela 7**. Com exceção do produto A, todos apresentaram teor do princípio ativo acima do declarado pelo fabricante, sendo considerados insatisfatórios.

4.3 TESTES REALIZADOS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para cada um dos três produtos (álcool etílico 70%, produto A e produto B) utilizados no trabalho, foram realizadas metodologias da AOAC e do CEN, de acordo com os microrganismos preconizados, conforme mostrado na **Tabela 3**.

Para o método da DU, os testes só foram repetidos no caso de resultado insatisfatório. Para a metodologia do CEN, cada teste foi realizado pelo menos duas vezes, quando os resultados foram coincidentes.

Tabela 7

Avaliação do teor de princípio ativo dos produtos A, B, C, D e E. Todos os produtos eram à base de quaternários de amônio.

Produtos	Teor (% do declarado)	Faixa de Aprovação (% do declarado)	Resultado
Produto A	102%	± 15%	Satisfatório
Produto B	210%	± 15%	Insatisfatório
Produto C	124%	± 15%	Insatisfatório
Produto D	120%	± 15%	Insatisfatório
Produto E	168%	± 15%	Insatisfatório

4.4 AVALIAÇÃO DOS DESINFETANTES PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO DE USO

Para exemplificar os resultados obtidos em cada teste descrito abaixo, um formulário de registro da avaliação da atividade antimicrobiana de um teste encontra-se no Apêndice A.

4.4.1 Álcool etílico 70%

Pelo método da DU, o produto álcool etílico 70% foi considerado satisfatório frente a todos os microrganismos utilizados (**Tabela 8**). Todos os controles utilizados apresentaram-se dentro dos padrões desejados.

Tabela 8

Avaliação da atividade antimicrobiana do álcool etílico 70% pelo método da Diluição de Uso.

Microrganismos	Total de Carreadores Positivos	Controles		Resultado
	Teste	Esterilidade	Fertilidade	
<i>S. aureus</i>	1	C	C	S
<i>S. choleraesuis</i>	0	C	C	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	0	C	C	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	0	C	C	S

C = conforme; S = satisfatório

4.4.2 Produto A

Pelo método da DU, o produto A foi considerado satisfatório frente a todos os microrganismos utilizados (**Tabela 9**). Todos os controles utilizados apresentaram-se dentro dos padrões desejados.

Tabela 9

Avaliação da atividade antimicrobiana do produto A pelo método da Diluição de Uso.

Microrganismos	Total de Carreadores Positivos	Controles		Resultado
	Teste	Esterilidade	Fertilidade	
<i>S. aureus</i>	0	C	C	S
<i>S. choleraesius</i>	0	C	C	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	0	C	C	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	0	C	C	S

C = conforme; S = satisfatório

4.4.3 Produto B

Pelo método da DU, o produto B foi considerado satisfatório frente a *S. choleraesius*, *Enterobacter cloacae* (isolados da cozinha e do banheiro). Entretanto, frente a *S. aureus*, o produto foi considerado insatisfatório, devido ao crescimento em mais de 1 carreador em 2 dos 3 testes realizados (**Tabela 10**). Todos os controles utilizados apresentaram-se dentro dos padrões desejados.

Tabela 10

Avaliação da atividade antimicrobiana do produto B pelo método da Diluição de Uso.

Microrganismos	Total de Carreadores Positivos	Controles		Resultado
	Testes	Esterilidade	Fertilidade	
<i>S. aureus</i>	13	C	C	I
	0	C	C	S
<i>S. choleraesius</i>	2	C	C	I
	0	C	C	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	1	C	C	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	0	C	C	S

C = conforme; S = satisfatório; I = insatisfatório

4.5 METODOLOGIAS DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO

4.5.1 Padronização inicial do inóculo

A faixa para as contagens do inóculo foi alcançada com as suspensões apresentando leitura de DO entre 0,150 a 0,200 para todos os microrganismos utilizados nos testes, com exceção de *S. aureus* que foi de 0,200 a 0,300. Esses valores foram determinados pela observação da contagem obtida em cada valor de DO analisado. A faixa de leitura foi determinada pela observação dos valores de DO obtidos pela contagem de UFC/mL obtidos na etapa de padronização inicial do inóculo (**Figuras 17 a 22**), em associação com os dados obtidos posteriormente em cada teste realizado (**Apêndice B e C**). Todas as leituras de DO foram feitas no comprimento de onda de 630 nm.

Figura 17 - Padronização do inóculo de *S. aureus* através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.

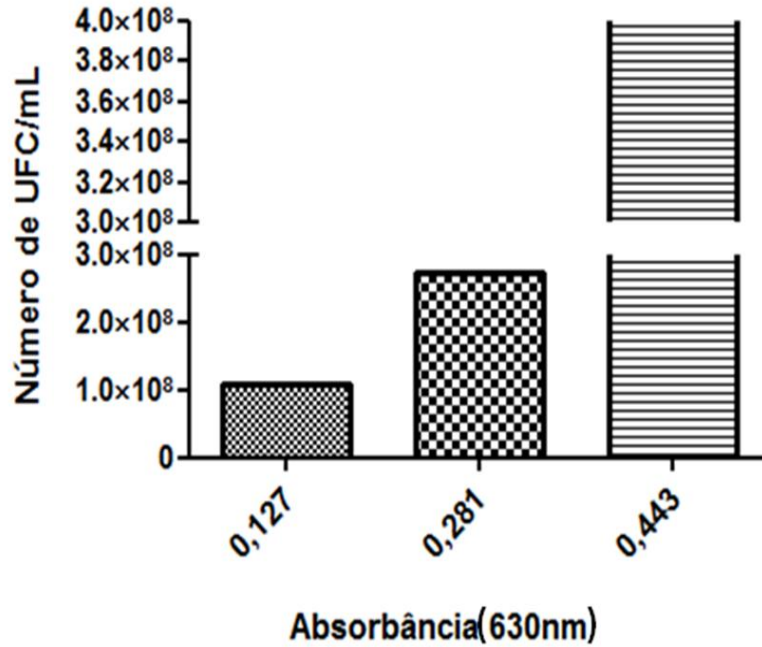


Figura 18 - Padronização do inóculo de *P. aeruginosa* através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.

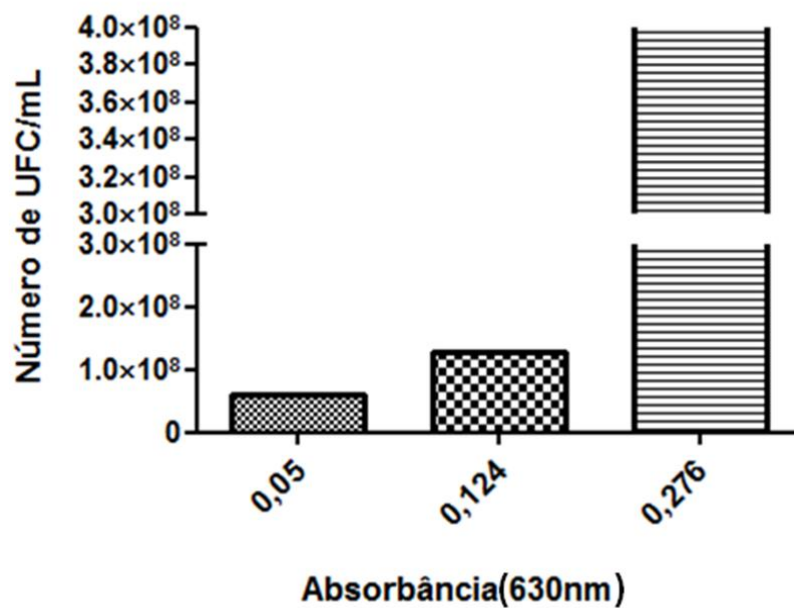


Figura 19 - Padronização do inóculo de *E. coli* através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.

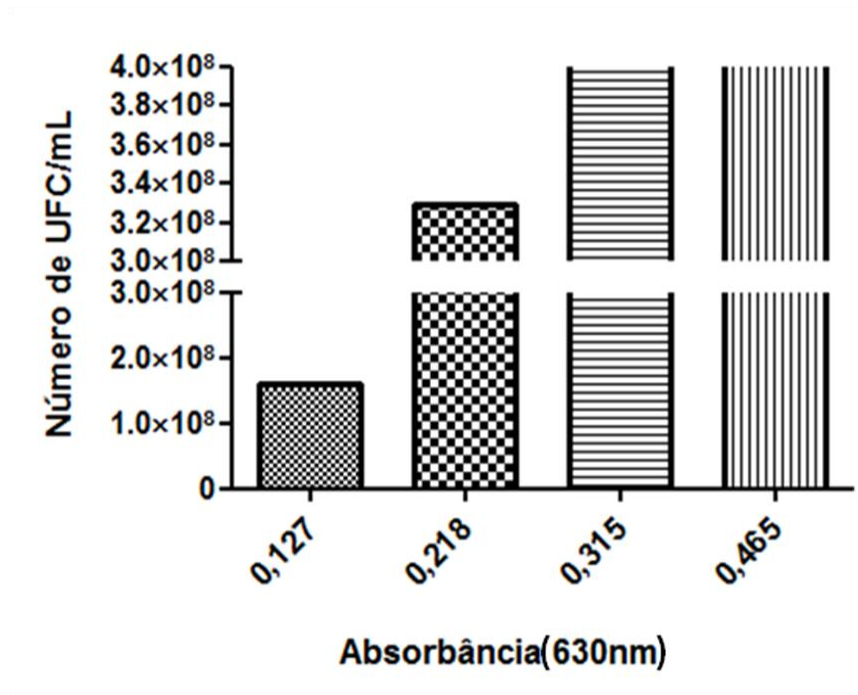


Figura 20 - Padronização do inóculo de *E. hirae* através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.

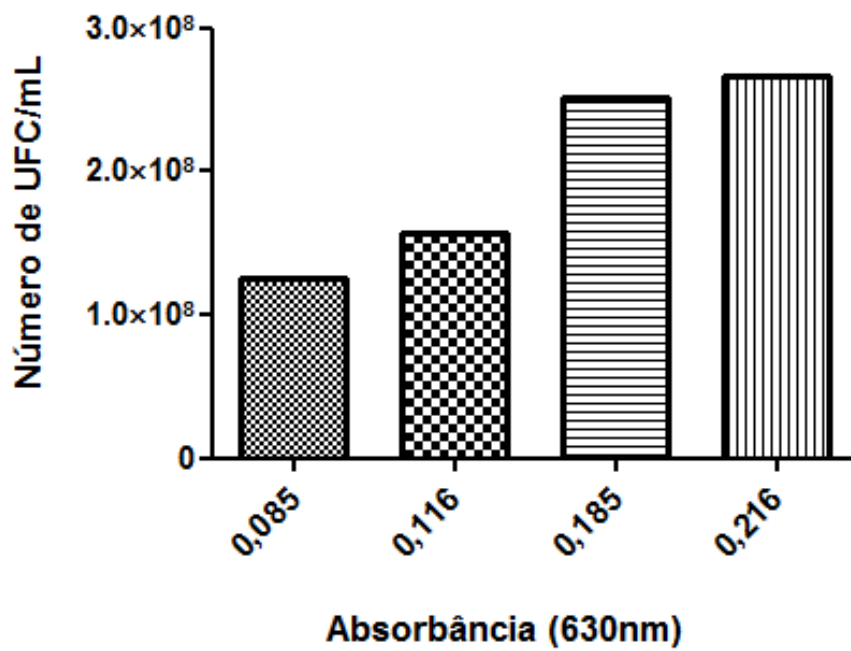


Figura 21 - Padronização do inóculo de *E. cloacae* (cozinha) através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia

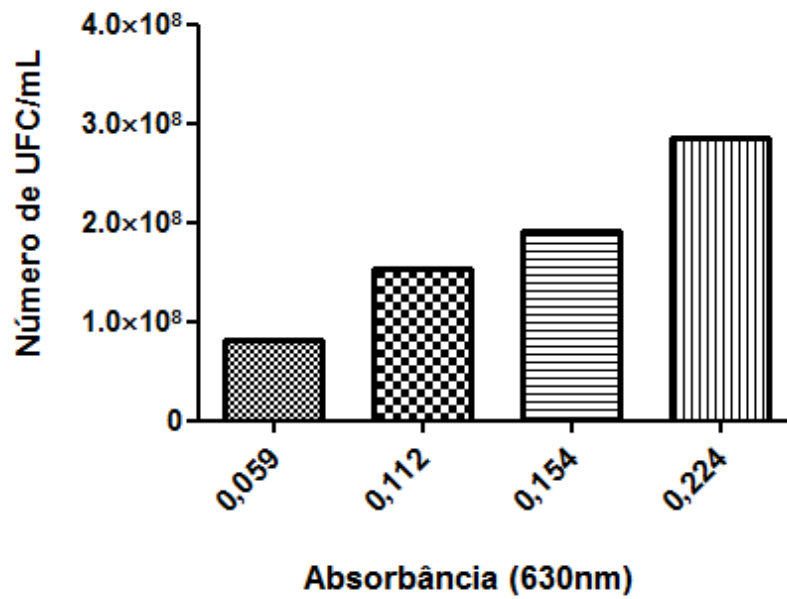
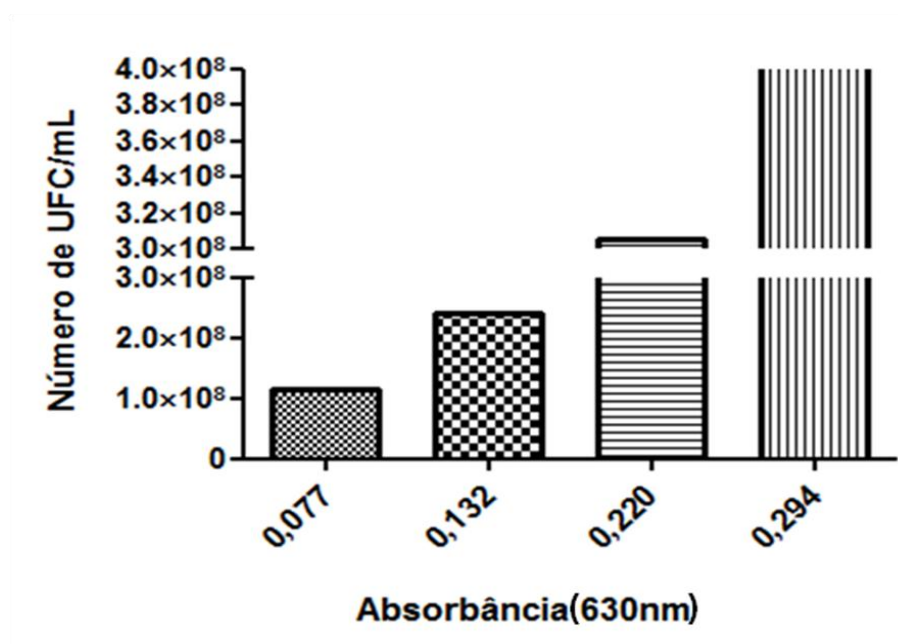


Figura 22 - Padronização do inóculo de *E. cloacae* (banheiro) através da correlação da densidade ótica e da contagem das unidades formadoras de colônia.



4.5.2 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida Básica de Desinfetantes Químicos e Antissépticos – Fase 1 (EN 1040)

Para registrar os resultados dos testes, foi elaborado um formulário para organizar os dados, conforme mostrado na **Figura 23**. Um exemplo do preenchimento deste formulário encontra-se no Apêndice B.

Para a realização da etapa de neutralização dos produtos à base de quaternários de amônio, foram testadas primeiramente 3 soluções neutralizantes (polissorbato 80 (30 g/L) + lecitina (3 g/L); polissorbato 80 (30 g/L) + lecitina (3 g/L) + SDS (4 g/L); e polissorbato 80 (30 g/L) + lecitina (3 g/L) + saponina (30 g/L)), as quais não apresentaram resultado satisfatório na neutralização desses produtos, uma vez que o controle de neutralização (controle C) não se apresentou dentro do padrão necessário. Assim, um quarto neutralizante, composto por polissorbato 80 (30 g/L), lecitina (3 g/L), tiosulfato de sódio (5 g/L) e L-histidina (1 g/L) foi testado, sendo observada a neutralização adequada desses produtos (**Tabela 11**).

Tabela 11

Soluções neutralizantes testadas e seus respectivos resultados para a fase 1 da metodologia preconizada pelo CEN.

Soluções Neutralizantes	Resultado Controle C	Limites	Conclusão
Polissorbato 80 (30 g/L) + Lecitina (3 g/L)	$< 0,5 \times N_v$	$\geq 0,5 \times N_v$	NC
Polissorbato 80 (30 g/L) + Lecitina (3 g/L) + SDS (4 g/L)	$< 0,5 \times N_v$	$\geq 0,5 \times N_v$	NC
Polissorbato 80 (30 g/L) + Lecitina (3 g/L) + Saponina (30 g/L)	$< 0,5 \times N_v$	$\geq 0,5 \times N_v$	NC
Polissorbato 80 (30 g/L), Lecitina (3 g/L), Tiosulfato de sódio (5 g/L) e L-histidina (1 g/L)	$\geq 0,5 \times N_v$	$\geq 0,5 \times N_v$	C

N_v = Suspensão microbiana inicial de validação; C = conforme; NC = não conforme

Figura 23 - Formulário de registro dos resultados dos testes preconizados pelo CEN. Vc: contagem de UFC das placas; Na: número de UFC após realização do teste; logR: redução de log (log No – log Na).

Suspensão de validação (Nvo)			Controle A			Controle B			Controle C		
Vc1			Vc1			Vc1			Vc1		
Vc2			Vc2			Vc2			Vc2		
$30 \leq \underline{Nvo} \leq 160$ () Sim () Não			$A \geq 0,5x Nvo$ () Sim () Não			$B \geq 0,5x Nvo$ () Sim () Não			$C \geq 0,5x \underline{Nvo}$ () Sim () Não		

Suspensão teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	Média = logN = No=N/10 – logNo = $7,17 \leq \log No \leq 7,7?$ () Sim () Não

Concentração do produto	Vc1	Vc2	Na (Média x 10)	logNa	logR

4.5.2.1 Álcool etílico 70%

Pelo método EN 1040 do CEN, o álcool etílico 70% foi considerado satisfatório frente a todos os microrganismos utilizados (**Tabela 12**). A concentração acima do recomendado (produto puro, a 100%) também foi capaz de reduzir 5 logs da suspensão microbiana inicial. Já a concentração abaixo da recomendada (álcool etílico a 25%) não foi capaz de reduzir 5 logs da suspensão microbiana inicial, sendo com isso a concentração ideal para observar a ausência de atividade antimicrobiana (**Tabela 13**)

Tabela 12

Avaliação da atividade antimicrobiana do álcool etílico 70% pelo método EN 1040 do CEN (Fase 1).

Microrganismos	Controles			Redução do n° de log	Resultado
	A	B	C		
<i>S. aureus</i>	C	C	C	> 5,34 log	S
<i>P. aeruginosa</i>	C	C	C	> 5,36 log	S
<i>E. coli</i>	C	C	C	> 5,32 log	S
<i>E. hirae</i>	C	C	C	> 5,2 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	C	C	C	> 5,27 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	C	C	C	> 5,36 log	S

C = conforme; S = satisfatório

Tabela 13

Atividade antimicrobiana do álcool etílico avaliada pela Fase 1 da metodologia do CEN, especificando todas as concentrações utilizadas. Os valores mostrados representam a redução de log em relação à suspensão microbiana inicial.

Microrganismos	Concentrações do produto		
	Produto Puro	70%	25%
<i>S. aureus</i>	> 5,34 log	> 5,34 log	< 3,97 log
<i>P. aeruginosa</i>	> 5,36 log	> 5,36 log	< 3,78 log
<i>E. coli</i>	> 5,32 log	> 5,32 log	< 3,95 log
<i>E. hirae</i>	> 5,2 log	> 5,2 log	< 3,83 log
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	> 5,27 log	> 5,27 log	< 3,9 log
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	> 5,36 log	> 5,36 log	< 3,99 log

4.5.2.2 Produto A

Pelo método EN 1040 do CEN, o produto A foi considerado satisfatório frente a todos os microrganismos utilizados (**Tabela 14**). Tanto a concentração recomendada pelo fabricante (produto puro) como a concentração mais baixa (50%) apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capazes de reduzir em 5 log o crescimento da suspensão microbiana inicial (**Tabela 14**). Assim, não foi possível observar a concentração onde não há atividade antimicrobiana.

Tabela 14

Avaliação da atividade antimicrobiana do produto A pelo método EN 1040 do CEN (Fase1). Os resultados apresentados representam as 2 concentrações do produto utilizadas nos testes.

Microrganismo	Controles			Redução do n° de log	Resultado
	A	B	C		
<i>S. aureus</i>	C	C	C	> 5,23 log	S
<i>P. aeruginosa</i>	C	C	C	> 5,35 log	S
<i>E. coli</i>	C	C	C	> 5,41 log	S
<i>E. hirae</i>	C	C	C	> 5,17 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	C	C	C	> 5,42 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	C	C	C	> 5,42 log	S

C = conforme; S = satisfatório

4.5.2.3 Produto B

Pelo método EN 1040 do CEN, o produto B foi considerado satisfatório frente a todos os microrganismos utilizados (**Tabela 15**). As três concentrações do produto utilizadas nos testes (10%, 5%, 1%) apresentaram atividade antimicrobiana, com redução de 5 log do crescimento da suspensão microbiana inicial, não sendo possível observar a concentração onde não é mais observada atividade antimicrobiana (**Tabela 15**).

Tabela 15

Avaliação da atividade antimicrobiana do produto B pelo método EN 1040 do CEN (Fase1). Os resultados apresentados representam as 3 concentrações do produto utilizadas nos testes.

Microrganismos	Controles			Redução do n° de log	Resultado
	A	B	C		
<i>S. aureus</i>	C	C	C	> 5,23 log	S
<i>P. aeruginosa</i>	C	C	C	> 5,35 log	S
<i>E. coli</i>	C	C	C	> 5,41 log	S
<i>E. hirae</i>	C	C	C	> 5,17 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	C	C	C	> 5,41 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	C	C	C	> 5,42 log	S

C = conforme; S = satisfatório

4.5.3 Teste em Suspensão Quantitativo para Avaliação da Atividade Bactericida Básica de Desinfetantes Químicos e Antissépticos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 1 (EN 1276)

Para registrar os resultados dos testes, foi utilizado o mesmo formulário para organizar os dados, conforme mostrado na **Figura 23**. Um exemplo de formulário preenchido encontra-se no Apêndice C.

Com a adição de BSA 3% como substância interferente no teste, a solução neutralizante utilizada na fase 1 da metodologia deixou de apresentar eficácia na neutralização dos produtos à base de quaternários de amônio frente somente a *S. aureus*. Assim, frente a esse microrganismo, foi utilizada uma solução neutralizante de igual composição, porém 20% mais concentrada (polissorbato 80 (36 g/L), lecitina (3,6 g/L), tiosulfato de sódio (6 g/L) e L-histidina (1,2 g/L)).

4.5.3.1 Álcool etílico 70%

Pelo método EN 1276 do CEN, o álcool etílico 70% foi considerado satisfatório frente a todos os microrganismos utilizados (**Tabela 16**). A concentração acima do recomendado (produto puro, a 100%) também foi capaz de reduzir 5 logs da suspensão microbiana inicial. Já a concentração abaixo da recomendada (álcool etílico a 25%) não foi capaz de reduzir 5 logs da suspensão microbiana inicial, sendo com isso a concentração ideal para observar a ausência de atividade antimicrobiana (**Tabela 17**)

Tabela 16

Avaliação da atividade antimicrobiana do álcool etílico 70% pelo método EN 1276 do CEN (Fase 2, Etapa 1).

Microorganismo	Controles			Redução do n° de log	Resultado
	A	B	C		
<i>S. aureus</i>	C	C	C	> 5,22 log	S
<i>P. aeruginosa</i>	C	C	C	> 5,24 log	S
<i>E. coli</i>	C	C	C	> 5,3 log	S
<i>E. hirae</i>	C	C	C	> 5,19 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	C	C	C	> 5,28 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	C	C	C	> 5,426log	S

C = conforme; S = satisfatório

Tabela 17

Atividade antimicrobiana do álcool etílico avaliada pela fase 2, etapa 1 do método EN 1276 do CEN, especificando todas as concentrações utilizadas. Os valores mostrados representam a redução de log em relação à suspensão microbiana inicial.

Microorganismos	Concentrações do produto		
	Produto Puro	70%	25%
<i>S. aureus</i>	> 5,22 log	> 5,22 log	< 3,85 log
<i>P. aeruginosa</i>	> 5,24 log	> 5,24 log	< 3,87 log
<i>E. coli</i>	> 5,3 log	> 5,3 log	< 3,93 log
<i>E. hirae</i>	> 5,19 log	> 5,19 log	< 3,82 log
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	> 5,28 log	> 5,28 log	< 3,91 log
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	> 5,26 log	> 5,26 log	< 3,89 log

4.5.3.2 Produto A

Pelo método EN 1276 do CEN, o produto A foi considerado satisfatório frente a todos os microrganismos utilizados, com exceção de *S. aureus* cujo teste não apresentou um bom resultado para o controle da neutralização (controle C) (**Tabela 18**). Para os demais microrganismos, tanto a concentração recomendada pelo fabricante (produto puro) como a concentração mais baixa (50%) apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capazes de reduzir em 5 log o crescimento da suspensão microbiana inicial (**Tabela 19**). Assim, não foi possível observar a concentração onde não é observada atividade antimicrobiana.

Com a utilização da solução neutralizante 20% mais concentrada, o produto A continuou não sendo adequadamente neutralizado (**Tabela 22**), serão necessários estudos adicionais com outras soluções neutralizantes para que o controle de neutralização (controle C) fique dentro do padrão exigido pela norma e o teste possa ser considerado válido.

Tabela 18

Avaliação da atividade antimicrobiana do produto A pelo método EN 1276 do CEN (Fase 2, Etapa1).

Microrganismos	Controles			Redução do n° de log	Resultado
	A	B	C		
<i>S. aureus</i>	C	C	NC	Indeterminado	Controle C não conforme
<i>P. aeruginosa</i>	C	C	C	> 5,39 log	S
<i>E. coli</i>	C	C	C	> 5,41 log	S
<i>E. hirae</i>	C	C	C	> 5,36 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	C	C	C	> 5,41 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	C	C	C	> 5,4 log	S

C = conforme; S = satisfatório

Tabela 19

Atividade antimicrobiana do produto A avaliada pela fase 2, etapa 1 pelo método EN 1276 do CEN, especificando todas as concentrações utilizadas. Os valores mostrados representam a redução de log em relação à suspensão microbiana inicial.

Microrganismos	Concentrações do produto	
	Produto Puro	50%
<i>S. aureus</i>	Não foi possível neutralizar o produto frente a <i>S. aureus</i> com as soluções utilizadas nesse trabalho	
<i>P. aeruginosa</i>	> 5,39 log	> 5,39 log
<i>E. coli</i>	> 5,41 log	> 5,41 log
<i>E. hirae</i>	> 5,36 log	> 5,36 log
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado da cozinha)	> 5,41 log	> 5,41 log
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado do banheiro)	> 5,4 log	> 5,4 log

4.5.3.3 Produto B

Pelo método EN 1276 do CEN, o produto B foi considerado satisfatório frente a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. hirae* e *E. cloacae* (**Tabela 20**). As três concentrações do produto utilizadas nos testes (10%, 5%, 1%) apresentaram atividade antimicrobiana, com redução de 5 log do crescimento da suspensão microbiana inicial, não sendo possível observar a concentração onde não é mais observada atividade antimicrobiana (**Tabela 20**).

Nos testes iniciais ocorreram problemas de neutralização frente a *S. aureus*. Com o objetivo de obter um bom resultado da neutralização, foi utilizada uma solução neutralizante 20% mais concentrada em relação a todos os componentes para a realização dos testes com o produto B nessa fase. Com essa nova solução neutralizante, foi possível observar a adequada neutralização do produto B frente a *S. aureus* (**Tabela 20**).

Tabela 20

Avaliação da atividade antimicrobiana do produto B pelo método EN 1276 do CEN (Fase 2, Etapa 1). Os resultados apresentados representam as 3 concentrações do produto utilizada nos testes.

Microorganismos	Controles			Redução do n° de log	Resultado
	A	B	C		
<i>S. aureus</i>	C	C	C	> 5,33 log	S
<i>P. aeruginosa</i>	C	C	C	> 5,39 log	S
<i>E. coli</i>	C	C	C	> 5,41 log	S
<i>E. hirae</i>	C	C	C	> 5,36 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado Cozinha)	C	C	C	> 5,41 log	S
<i>Enterobacter cloacae</i> (Isolado Banheiro)	C	C	C	> 5,4 log	S

C = conforme; S = satisfatório

4.5.4 Teste Quantitativo em Superfície Não Porosa para Avaliação da Atividade Bactericida e/ou Fungicida de Desinfetantes Químicos usados em Áreas Alimentícia, Industrial, Doméstica e Institucional – Fase 2, Etapa 2 (EN 13697)

A fase 2, etapa 2 da metodologia preconizada pelo CEN, é realizada em superfície através da utilização de discos de aço inox. Esses carreadores de acordo com as especificações exigidas pelo teste não estão disponíveis para venda no Brasil. Assim, foram realizados diversos contatos com um fornecedor europeu, sem sucesso de comunicação para a obtenção do material. Dessa forma, após uma busca intensa pelo mercado brasileiro, foi encontrada uma empresa metalúrgica que se propôs a confeccionar os discos. Todavia, o material somente pôde ser adquirido em fevereiro de 2012, não restando tempo viável para a realização integral do teste em superfície.

Portanto, foram realizados somente os passos iniciais da fase 2, etapa 2, envolvendo apenas o controle de água dessa metodologia, frente a bactéria *E. coli*, visando a padronização do tempo de secagem dos discos após a contaminação com a suspensão bacteriana inicial, e do método de desprendimento das bactérias aderidas aos discos.

Em relação ao tempo de secagem das bactérias nos discos, é preconizado na norma (EN 13697) que este não deve ultrapassar 60 minutos, uma vez que períodos superiores a este podem alterar a viabilidade da bactéria. Entretanto, foi observado que os 0,05 mL da suspensão inicial que foram adicionados à superfície dos discos não secaram até o tempo limite de 60 minutos, quando incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Por isso, foram testados outros tempos e condições para a padronização dessa etapa. Assim, foi estabelecida a condição de secagem utilizando-se 40 minutos de incubação dos discos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, seguido de 20 minutos a temperatura ambiente (os discos foram deixados esse tempo no interior do fluxo laminar, com a tampa da placa de Petri aberta), permitindo a secagem dos mesmos.

Em relação ao desprendimento das bactérias presentes nos discos, a norma (EN 13697) estabelece agitação por 1 minuto a 150 g do tubo contendo o disco, em solução neutralizante e pérolas de vidro. Entretanto, foi observado que nessas condições não há o desprendimento adequado das bactérias, uma vez que o controle do desprendimento (NTS) apresentou resultados insatisfatórios, assim como o controle de água se apresentou abaixo do valor satisfatório (**Tabela 21**).

Tabela 21

Teste preliminar da fase 2, etapa 2 usando-se *E. coli*, nas condições estabelecidas pela norma EN 13697 do CEN.

Parâmetros e Controles	Teste	Limites	Resultado
Suspensão inicial (N)	$3,49 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$ a 5×10^8	C
Controle de água (Nc)	$8,5 \times 10^6$	$\geq 10^6$	C
N – Nc (em escala logarítmica)	$8,54 - 6,93 = 1,61$	$\leq 2 \log$	C
NTS	$> 100 \text{ UFC}$	$\leq 100 \text{ UFC/mL}$	NC

C = conforme; NC = não conforme; N = suspensão microbiana inicial; Nc = controle de água; NTS = controle do desprendimento das células dos discos.

Devido ao resultado insatisfatório do desprendimento das bactérias presentes nos discos e nas condições estabelecidas pela norma (EN 13697), foi adicionada uma etapa adicional de sonicação ao teste. A sonicação foi realizada por 1, 5 e 10 minutos, seguida de agitação por 1 minuto a 1.000 g. Entretanto, novamente não houve o desprendimento adequado das bactérias, uma vez que o controle do desprendimento (NTS) apresentou resultados insatisfatórios, assim como o controle de água se apresentou abaixo do valor satisfatório (**Tabela 22**).

Tabela 22

Teste preliminar da fase 2, etapa 2 usando-se *E. coli*, com adição da etapa de sonicação ao procedimento estabelecido pela norma EN 13697 do CEN.

Parâmetros e Controles	Tempos de sonicação			Limites	Resultado
	1 min	5 min	10 min		
Suspensão inicial (N)	$3,36 \times 10^8$	$3,36 \times 10^8$	$3,36 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$ a 5×10^8	C
Controle de água (Nc)	$6,8 \times 10^5$	$6,75 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$\geq 10^6$	NC
N – Nc	$8,53 - 5,83 = 2,7$	$8,53 - 5,83 = 2,7$	$8,53 - 5,53 = 3,0$	$\leq 2 \log$	NC
NTS	> 100 UFC	> 100 UFC	> 100 UFC	≤ 100 UFC/mL	NC

C = conforme; NC = não conforme; N = suspensão microbiana inicial; Nc = controle de água; NTS = controle do desprendimento das células dos discos.

Devido ao resultado insatisfatório do desprendimento das bactérias presentes nos discos também pela adição da etapa de sonicação, foram utilizadas 2 soluções neutralizantes alternativas, a solução neutralizante 20% mais concentrada (utilizada também no item 4.5.3.1) e o caldo Letheen. Da mesma forma que nos testes das condições anteriores, não houve o desprendimento adequado das bactérias, uma vez que o controle do desprendimento (NTS) apresentou resultados insatisfatórios, assim como o controle de água se apresentou abaixo do valor satisfatório (**Tabela 23**).

Tabela 23

Teste preliminar da fase 2, etapa 2, com adição de solução neutralizante 20% mais concentrada e caldo Letheen como alternativas ao desprendimento das bactérias dos discos.

Parâmetros e Controles	Neutralizantes		Limites	Resultado
	Solução 20% concentrada	Caldo Letheen		
Suspensão inicial (N)	$3,54 \times 10^8$	$3,54 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$ a 5×10^8	C
Controle de água (Nc)	$2,95 \times 10^5$	$9,35 \times 10^5$	$\geq 10^6$	NC
N – Nc	$8,55 - 5,47 = 3,08$	$8,55 - 5,97 = 2,58$	$\leq 2 \log$	NC
NTS	$> 100 \text{ UFC}$	$> 100 \text{ UFC}$	$\leq 100 \text{ UFC/mL}$	NC

C = conforme; NC = não conforme; N = suspensão microbiana inicial; Nc = controle de água; NTS = controle do desprendimento das células dos discos.

5 DISCUSSÃO

Os microrganismos são encontrados em diversas superfícies inanimadas, tanto no ambiente domiciliar, em pias, toalhas, maçanetas (OJIMA et al., 2002a), como no ambiente público, em ônibus, corrimão de escadas e telefones públicos (REYNOLDS et al., 2005). Esses fômites possuem um grande potencial de transmissão de patógenos, podendo causar uma série de doenças que podem ser adquiridas no ambiente (BOONE; GERBA, 2007). Assim, a utilização de produtos desinfetantes com o objetivo de eliminar os microrganismos de superfícies e minimizar a incidência de doenças transmissíveis é de grande relevância para a saúde pública. Entretanto, relatos da literatura demonstram que esses produtos podem apresentar contaminação por bactérias que possuam maior tolerância aos componentes do produto (MIYAGI; TIMENETSKY; ALTERTHUM, 2000).

No início desse trabalho, foram adquiridos três desinfetantes de uso geral à base de quaternários de amônio que apresentaram contaminação bacteriana (produtos C, D e E), evidenciando que a contaminação desses produtos, relatados na literatura desde a década de 1970, continua a ocorrer nos dias de hoje (FRANK; SCHAFFNER, 1976, OIE; KAMIYA, 1996, MIYAGI; TIMENETSKY; ALTERTHUM, 2000).

A identificação das bactérias contaminantes pelo equipamento VITEK 2 revelou a presença de *Serratia marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Aeromonas salmonicida*, respectivamente nos produtos C, D e E. A presença dessas bactérias como contaminantes de produtos desinfetantes já foi descrita na literatura anteriormente. Nakashima, Highsmith e Martone (1987) relataram a presença de *Serratia marcescens* em algodão embebido numa solução de quaternários de amônio, enquanto Ehrenkranz e colaboradores (1980) relataram a contaminação por *Serratia marcescens* em borrifadores utilizados em hospitais, onde são colocados desinfetantes à base de quaternários de amônio, levando à ocorrência de infecções hospitalares por essa espécie.

Em relação a *Aeromonas salmonicida*, não há relatos na literatura associando a contaminação de desinfetantes a essa bactéria. Porém, outras espécies do gênero *Aeromonas* já foram isoladas de amostras de pacientes com quadro diarreico

(PABLOS et al, 2011), de alimentos e de água potável (OTTAVIANI et al., 2011). Nesse mesmo trabalho, a espécie *Aeromonas salmonicida* foi encontrada em amostras de água e em alimentos como peixes e salmão, o que indica que a contaminação do produto desinfetante pode ter origem na fonte de água utilizada na fabricação do produto.

A espécie *Achromobacter xylosoxidans* já foi encontrada como contaminante de soluções de clorexidina em um hospital na Espanha, causando várias infecções em pacientes de todas as faixas etárias (MOLINA-CABRILLANA et al., 2007). Como a fonte natural dessa bactéria também foi a água, é possível que a contaminação por *Achromobacter xylosoxidans* também tenha origem na água utilizada no processo de fabricação do desinfetante.

A análise química desses produtos indicou que todos estão insatisfatórios em relação ao teor de princípio ativo, apresentando valores acima do declarado pelos fabricantes. Mesmo nessas condições, os microrganismos encontrados foram capazes de se estabelecerem nessas formulações, evidenciando o caráter tolerante dessas bactérias. Apesar de não se conhecer o mecanismo exato de tolerância dessas bactérias aos compostos de quaternários de amônio, supõe-se que ocorra uma regulação metabólica induzida pela presença do biocida, principalmente na membrana externa das células (MIYAGI; TIMENETSKY; ALTERTHUM, 2000). Em *S. marcescens* resistente à clorexidina, por exemplo, foi constatada a presença de material polissacarídico formando uma matriz fibrosa que protegeria a célula bacteriana (MARRIE; COSTERTON, 1981).

Com esses dados, é possível perceber a importância das indústrias possuírem processos de fabricação adequados e um rigoroso controle da qualidade de seus produtos, minimizando ao máximo possíveis erros, pois do contrário o produto final pode conter uma formulação com desvio de qualidade, gerando risco a saúde do consumidor. Dessa forma, a avaliação da atividade antimicrobiana dos produtos desinfetantes é essencial para que os produtos comercializados tenham a sua qualidade garantida.

Para avaliação em paralelo das metodologias da AOAC e do CEN frente a microrganismos de referência preconizados pelas normas, mas principalmente daqueles oriundos de ambiente domiciliar, foram escolhidos três produtos, o álcool etílico 70 % e 2 produtos à base de compostos quaternários de amônio. O álcool

etílico 70% foi escolhido devido à sua eficácia amplamente conhecida como desinfetante e antisséptico (RUTALA, 1996). De fato, em todos os testes realizados, tanto pela metodologia preconizada pela AOAC como pelo método do CEN, este produto apresentou resultados satisfatórios para todos os microrganismos testados, comprovando sua eficácia como desinfetante em metodologias quantitativas e qualitativas, em suspensão ou em superfície (Apêndice D).

Já os produtos à base de quaternários de amônio foram escolhidos, pois atualmente no mercado brasileiro existem diversos desinfetantes de uso geral formulados com esse princípio ativo. Observando os resultados encontrados para avaliação da atividade antimicrobiana e para o teor de princípio ativo, percebeu-se um comportamento diferente entre os produtos A e B. Enquanto o produto A apresentou uma formulação adequada quimicamente e se mostrou eficaz em todos os testes realizados, o produto B apresentou uma formulação insatisfatória quimicamente, pois o produto estava com teor do princípio ativo duas vezes maior do que o declarado, mesmo assim se mostrou ineficaz contra *S. aureus* pelo método da DU. Esses resultados sugerem a influência que uma formulação inadequada do produto pode exercer sobre a atividade antimicrobiana, mesmo que o teor do princípio ativo esteja duas vezes acima do declarado. A formulação inadequadamente de um produto pode levar a resultados insatisfatórios nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana, e conseqüentemente não ser capaz de promover a desinfecção corretamente de uma superfície, gerando risco à saúde da população.

O método da DU se mostrou um método muito adequado para a avaliação da atividade antimicrobiana do álcool etílico 70% e do produto A. Entretanto, em relação ao produto B, os testes não apresentaram repetibilidade adequada quando foi utilizado o microrganismo de referência *S. aureus* (Apêndice D). Esses resultados mostram a dificuldade dessa metodologia em relação a repetitividade (ARLEA et al., 2008), uma vez que a comprovação da atividade antimicrobiana do produto só foi observada em um dos três testes. Essa variabilidade nos resultados pode ser causada pela falta de padronização do número de células microbianas nos cilindros. Por isso, na última revisão das normas da AOAC e conseqüentemente no POP da DU do INCQS, foi adicionada uma etapa de contagem das bactérias viáveis nos cilindros, como um controle adicional do teste de acordo com as recomendações da

AOAC. Nessa etapa, um cilindro contaminado e seco e escolhido aleatoriamente e adicionado a um tubo contendo caldo Lethen. Esse tubo com o cilindro é colocado em ultrassom para sonicação e, após agitação, alíquotas são retiradas, diluídas e plaqueadas para a contagem das células viáveis (TOMASINO, 2010; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2011). Essa etapa confere maior segurança em relação à quantidade do microrganismo envolvido em cada teste, estabelecendo limites para o inóculo inicial. Dessa forma, é possível minimizar o problema da falta de reprodutibilidade como observado nos resultados desse trabalho.

A metodologia preconizada pelo CEN sugere leituras de DO entre 0,150 e 0,460 para o inóculo inicial utilizado nos testes. Entretanto, os resultados encontrados nesse trabalho para a padronização do inóculo inicial não corroboram com a norma europeia, uma vez que a faixa sugerida foi de 0,150 a 0,200 para todos os microrganismos utilizados, menos para *S. aureus* cuja faixa de DO foi sugerida entre 0,200 e 0,300. Na prática, valores acima de 0,200 (0,300 para *S. aureus*) muitas vezes ficavam acima da faixa de UFC/mL estabelecida na norma. Foi observado também que a associação entre DO e UFC/mL apresenta variação de um teste para outro, devido à manipulação durante a realização de cada teste. Alguns testes apresentaram o inóculo inicial fora do padrão, mesmo com a DO dentro da faixa padronizada. Isso se deve a erros na manipulação no decorrer do preparo do inóculo, como o ajuste da DO, pipetagem e tempo que o tubo fica em repouso durante esses procedimentos. Porém nesses casos, foi possível considerar os testes válidos, uma vez que os produtos foram capazes de comprovar sua atividade antimicrobiana mesmo com a suspensão inicial do microrganismo acima da faixa estabelecida. Da mesma forma, a alteração das condições de cada laboratório pode variar esses valores, sendo fundamental que cada laboratório realize a padronização da suspensão inicial de cada microrganismo utilizado.

A neutralização é uma etapa de grande importância em qualquer método para avaliação de eficácia (RUSSEL, 1981). Uma neutralização inadequada permite que o produto possa agir por um tempo maior que o recomendado, podendo gerar resultados falso-positivos. Por isso, diferentes soluções neutralizantes foram testadas até que fosse encontrado um neutralizante capaz de neutralizar corretamente os produtos utilizados. Os resultados mostraram que a solução

neutralizante pode ser afetada pela adição do BSA 3% no teste, uma vez que o neutralizante utilizado na fase 1 do método não foi eficaz para todos os microrganismos nos testes da fase 2, etapa 1, sendo necessária a utilização de uma solução neutralizante 20% mais concentrada que foi eficaz apenas para o produto B. Para o produto A, é necessário testar outros neutralizantes. Esses resultados indicam que a escolha de uma solução neutralizante adequada para cada produto é uma etapa essencial para que os testes sejam satisfatórios, uma vez que a falha no controle da neutralização inviabiliza todo o teste. A falha na neutralização observada na fase 2, etapa 1 ocorreu apenas para *S. aureus*, indicando que a neutralização dos produtos não ocorreu completamente, restando algum resíduo do produto que pode estar afetando o crescimento dessa bactéria. Esses resultados não corroboram alguns estudos encontrados na literatura, que mostram a presença de genes em *S. aureus* que conferem tolerância dessa bactéria a várias drogas, inclusive aos quaternários de amônio (NAKAMINAMI et al., 2007). Esses resultados sugerem que a escolha da solução neutralizante mais adequada precisa levar em consideração não apenas o produto a ser testado, mas também o microrganismo envolvido, de forma a não deixar nenhum resíduo que possa interferir no crescimento microbiano e inviabilizar o teste.

Enquanto o álcool etílico se mostrou sem atividade antimicrobiana na concentração mais baixa utilizada (25%), o mesmo não foi observado para os produtos A e B, para os quais todas as concentrações utilizadas foram capazes de reduzir 5 log do crescimento da suspensão microbiana inicial. Para se alcançar a concentração onde não é observada atividade antimicrobiana, será necessário realizar outros testes posteriormente. Dessa forma, a escolha da menor concentração, com a qual o microrganismo não é eliminado, depende de cada produto, sendo necessária uma avaliação preliminar para a definição dessa concentração (JAYAPRAKASH; SHARMA; MOSES, 2010).

Nos testes preliminares da fase 2, etapa 2 foram realizados dois passos essenciais para a metodologia. Primeiramente, a contaminação dos discos com as bactérias preconizadas, etapa de grande importância, onde, segundo a norma (EN 13697) a padronização da etapa visa impedir a perda da viabilidade das células bacterianas, a qual pode ser afetada com a incubação dos discos contaminados por mais de 60 minutos, isso pode interferir diretamente nos problemas de falta de

reprodutibilidade dos testes. Outro ponto crucial da metodologia é o desprendimento das células aderidas aos discos após o contato com o produto ou com água (controle de água). Os resultados encontrados não permitiram a padronização dessa etapa, uma vez que os procedimentos estabelecidos pela norma, e mesmo alguns procedimentos alternativos, não foram capazes de desprender as células dos discos. Assim, é possível perceber a dificuldade e a importância da adequada padronização desse ponto da metodologia, de forma a avaliar corretamente a contagem de UFC em placas e avaliar a presença de células viáveis após o contato com o produto desinfetante.

Portanto, a metodologia do CEN apresentou etapas em suspensão de fácil realização. O estoque e preparação dos microrganismos para os testes também foram etapas que se mostraram bastantes práticas na rotina do laboratório. A etapa em superfície se mostrou mais trabalhosa, principalmente em relação a manipulação dos discos carreadores. Entretanto, como são requeridas pela norma a utilização de 4 microrganismos de referência, 3 concentrações do produto teste e pelo menos 6 repetições de cada ensaio, a utilização dessa metodologia em avaliações oficiais de atividade antimicrobiana se torna muito pouco prática na rotina laboratorial, uma vez que para a avaliação de um único produto são necessários 48 testes com cada uma das três concentrações do produto.

Nesse trabalho foram utilizadas duas bactérias isoladas do ambiente domiciliar, a fim de avaliar o comportamento das metodologias e dos produtos frente a esses microrganismos. As amostras foram coletadas de uma mesma residência e, de acordo com a identificação das amostras pelo equipamento VITEK 2, os dois isolados pertenciam a mesma espécie bacteriana, *Enterobacter cloacae*. Esse fato pode ser explicado pela livre circulação do animal de estimação por toda a casa, além da circulação dos 5 membros da família, fatos que permitem o carreamento da bactéria para todos os ambientes da casa. Mesmo sendo identificados como a mesma espécie, os dois isolados foram mantidos separadamente para fins de realização dos testes de atividade antimicrobiana. Nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana, as bactérias isoladas foram eliminadas pelos três produtos, evidenciando a capacidade destes em eliminar não apenas microrganismos de referência, mas também amostras coletadas do ambiente. Esses resultados parciais sugerem que ambas as metodologias para a avaliação da atividade antimicrobiana

são capazes de aferir a qualidade dos produtos desinfetantes e a eficácia destes para o uso prático no ambiente domiciliar e público. Entretanto, ainda é necessária a avaliação da fase 2, etapa 2 para uma observação mais completa dessas características.

Portanto, a implantação de novas metodologias que possam contribuir para a avaliação da qualidade dos produtos com atividade antimicrobiana é de extrema importância para que o mercado nacional tenha produtos adequados e em conformidade com a legislação brasileira, não gerando risco à saúde da população.

6 CONCLUSÕES

- Com esse trabalho foi realizada a padronização da fase 1 e da fase 2, etapa 1 da metodologia preconizada pelo CEN, assim como os passos iniciais da fase 2, etapa 2.
- O álcool etílico a 70% e o produto A se mostraram eficazes frente a todos os microrganismos preconizados nas duas metodologias, enquanto o produto B se apresentou satisfatório apenas na metodologia do CEN, não sendo eficaz frente a *S. aureus* no método preconizado pela AOAC.
- Dois isolados bacterianos foram coletados de domicílio e identificados como *Enterobacter cloacae*. Esses foram utilizados nas duas metodologias de avaliação da atividade antimicrobiana, onde todos os produtos foram eficazes em eliminá-los nas concentrações recomendadas pelos fabricantes, evidenciando a eficácia dos produtos frente não só as bactérias de referência preconizada pelas metodologias, mas também frente às bactérias encontradas no ambiente.
- A utilização das bactérias isoladas do ambiente permitiu observar que ambas as metodologias da AOAC e do CEN foram capazes de avaliar o comportamento dos produtos comercializados no mercado brasileiro frente às bactérias presentes em ambientes onde esses produtos são utilizados.
- As bactérias contaminantes dos três desinfetantes obtidos no início do trabalho foram identificadas, revelando a presença de *Serratia marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Aeromonas salmonicida*. A observação evidenciou a presença de produtos contaminados nos dias de hoje, corroborando com dados mais antigos da literatura, os quais relatam contaminação desde a década de 1970.

PERSPECTIVAS

Este estudo permitiu observar a complexidade para a implantação de métodos para avaliação da eficácia de desinfetantes. Estudos adicionais utilizando produtos à base de outros princípios ativos são de grande interesse e necessidade para a implantação das metodologias e maior conhecimento do comportamento das mesmas frente aos produtos comercializados no mercado brasileiro.

REFERÊNCIAS

ALLOS, B. M. et al. Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21st century: the foodnet perspective. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38 (Suppl 3), S115–S120, 2004.

ANDERSON, R. L. et al. Effect of disinfectants on *Pseudomonas* colonized on the interior surface of PVC pipes. **Am. J. Public Health**, v. 80, p. 17–21, 1990a.

ANDERSON, R. L. et al. Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3598-600, 1990b.

ANDRADE, D. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. **Rev. Med. (Ribeirão Preto)**, v. 40, n. 2, p. 250-2544, 2007.

ARLEA, C. et al. Modifications to the AOAC use-dilution test for quaternary ammonium compound-based disinfectants that significantly improve method reliability. **J. AOAC Int.**, v. 91, n. 1, p. 152-158, 2008.

BARKER, J.; STEVENS, D.; BLOOMFIELD, S. F. Spread and prevention of some common viral infections in community facilities and domestic homes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 91, p. 7–21, 2001.

BERKELMAN, R. L. et al. Intrinsic bacterial contamination of a commercial iodophor solution: investigation of the implicated manufacturing plant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 47, p. 752-6. 1984.

BOONE, S. A.; GERBA, C. P. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 1687–1696, 2007.

BRASIL. Decreto nº 79.094 de 5 de Janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976, que submete ao 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. 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. 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, DF, p. 17041-17043, 5 set. 1988.

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.

BRASIL. Resolução RDC nº 35 de 16 de agosto de 2010. Abrange os produtos com ação antimicrobiana destinados ao uso em objetos e ambientes relacionados à assistência à saúde para artigos críticos e semi-críticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de agosto de 2010a.

BRASIL. Resolução RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 22 de dez. de 2010b.

BLOCK, S.S. Disinfection, Sterilization and Preservation. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1481 p., 2001.

BUZBY, J. C. et al. Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses. Food and Consumer Economics Division, Economic Research Service, U.S. **Department of Agriculture**. Agricultural Economic Report No. 741. 1996.

CASTRO-DEL CAMPO, N. et al. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. **Rev. Cub. Salud Publica**, v. 30, p. 83–86, 2004.

COGAN, T. A.; BLOOMFIELD, S. F.; HUMPHREY, T. J. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 354–358, 1999.

COGAN, T. A. et al. Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. **J. Appl. Microbiol.**, v. 92, p. 885–892, 2002.

COLE, E. C.; RUTALA, W. A.; ALFANO, E. M. Comparison of stainless steel penicylinders used in disinfectant testing. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 71, n. 2, p. 288-9, 1988.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P. S. Battling biofilms—The war is against bacterial colonies that cause some of the most tenacious infections known. The weapon is knowledge of the enemy's communication system. **Sci. Am.**, v. 285, n. 1, p. 74–81, 2001.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 114–122, 2003.

EHRENKRANZ, N. J. et al. Antibiotic sensitive *Serratia marcescens* infections complicating cardiopulmonary operations: contaminated disinfectant as a reservoir. **Lancet.**, v. 316, n. 8207, p. 1289-92, 1980.

EPSTEIN, A. K., POKROY, B., SEMINARA, A., AIZENBERG, J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. **PNAS**. v. 108, n. 3, p. 995-1000, 2011.

EUROPEAN STANDARD, n. 1040. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase 1). 2005.

EUROPEAN STANDARD, n. 10088. Stainless steels - List of stainless steels. 2005.

EUROPEAN STANDARD, n. 12353. Chemical disinfectants and antiseptics - Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, sporicidal and fungicidal activity. 2006.

EUROPEAN STANDARD, n. 1276. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1). 2009.

EUROPEAN STANDARD, n. 13697. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2). 2001.

EUROPEAN STANDARD, n. 14885. Chemical disinfectants and antiseptics - Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics. 2006.

FRANK, M. J.; SCHAFFNER, W. Contaminated aqueous benzalkonium chloride. **JAMA**, v. 236, p. 2418-2419, 1976.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORTE, T.; KORKEALA, H. Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 32, p. 375–378, 2001.

GERBA, C. P.; KENNEDY, D. Enteric virus survival during household laundering and impact of disinfection with sodium hypochlorite. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 4425– 4428, 2007.

GOSAU, M. et al. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 21, p. 866–872, 2010.

IMHOFF, B. et al. Burden of self-reported acute diarrheal illness in foodnet surveillance areas, 1998–1999. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38 (Suppl 3), S219–S226, 2004.

IWANICKA-GRZEGOREK, E. et al. Is transmission of bacteria that cause halitosis from pets to human possible? **Oral Dis.**, v. 11(Suppl 1), p. 96–97, 2005.

JAYAPRAKASH, R., SHARMA, A., MOSES, J. Comparative evaluation of the efficacy of different concentrations of chlorhexidine mouth rinses in reducing the mutans streptococci in saliva: an in vivo study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent.**, v. 28, n. 3, p. 162-166, 2010.

KAGAN, L. J.; AIELLO, A. E.; LARSON, E. The role of the home environment in the transmission of infectious diseases. **J. Community Health**, v. 27, p. 247–264, 2002.

KITAMOTO, M. et al. Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 62, p. 242–243, 2009.

KLEVENS, R. M. et al. Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. **Public Health Rep.**, v. 122, p.160–166, 2007.

LANINI, S. et al. Molecular Epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* Hospital Outbreak Driven by a Contaminated Disinfectant-Soap Dispenser. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, e17064. 2011.

IOANNOU, C J; HANLON, G. W.; DENYER, S. P. 2007. Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.51, n. 1, pp. 296-306, 2007

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE Manual da Qualidade. Determinação de Tensoativos Aniônicos e Catiônicos. Rev. 10. In: **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011. Seção 4.3. 9 p. (65.3110.014 rev. 10).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Manual da Qualidade. Método da Diluição de Uso. Rev. 08. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. Seção 10. 21 p. (65.3210.007 rev. 10).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. MANUAL DA QUALIDADE. Método da Diluição de Uso. Rev. 12. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011. Seção 4.3. 30 p. (65.3210.007 rev. 12).

MARRIE, T. J.; COSTERTON, J. W. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 42, p. 1093-102, 1981.

MCDONNELL, G; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MEAD, P. S. et al. Food related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, p. 607–625, 1999.

MEDRANO-FÉLIX, A. et al. Impact of prescribed cleaning and disinfectant use on microbial contamination in the home. **J. Appl. Microbiol.**, v. 110, n. 2, p. 463-471, 2010.

MIYAGI, F.; TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Evaluation of bacterial contamination in disinfectants for domestic use. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 444-8, 2000.

MOLINA-CABRILLANA, J. et al. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, p. 435–437, 2007.

NAKAMINAMI, H. et al. Transduction of the plasmid encoding antiseptic resistance gene *qacB* in *Staphylococcus aureus*. **Biol. Pharm. Bill.**, v. 8, p. 1412-1415, 2007.

NAKASHIMA, A. K.; HIGHSMITH, A. K.; MARTONE, W. J. Survival of *Serratia marcescens* in benzalkonium chloride and in multiple-dose medication vials: relationship to epidemic septic arthritis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p.1019-21, 1987.

OIE, S.; KAMIYA, A. Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. **Am. J. Infect. Control**, v. 5, p. 389-95, 1996.

OJIMA, M. et al. Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. **J. Appl. Microbiol.**, v. 93, p. 800–809, 2002a.

OJIMA, M. et al. Bacterial contamination of Japanese households and related concern about sanitation, **Int. J. Environ. Health Res.**, v. 12, n. 1, p. 41-52, 2002b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva, Switzerland: **WHO Library ISBN** 978 924 1547222. 2008.

OTTAVIANI, D. et al. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 144, p. 538-545, 2011.

OTOKUNEFOR, T. V. et al. *Salmonella* in gut and droppings of three pest lizards in Nigeria. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, p. 545–548, 2003.

PABLOS, M. et al. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 147, p. 203-210, 2011.

PANLILIO, A. L. et al. Infections and pseudo infections due to povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p.1078-1083, 1992.

POWERS, E. M. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. **Appl Environ Microbiol.**, v. 61, n. 10, p. 3756-3758, 1995.

RENVERT, S.; ROOS-JANSKER, A. M.; CLAFFEY, N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p. 305–315, 2008.

REYNOLDS, K. A. et al. Occurrence of bacteria and biochemical markers on public surfaces. **Int. J. Environ. Health Res.**, v. 15, n. 3, p. 225-234, 2005.

RUSIN, P.; MAXWELL, S.; GERBA, C. Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram positive bacteria, gram negative bacteria and phage. **J. Appl. Microbiol.**, v. 93, p. 585–592, 2002.

RUSSEL, A. D. Neutralization procedures in the evaluation of bactericidal activity. In: COLLINS, C. H., ALLWOOD, M. C., BLOOMFIELD, S. F., FOX, A. Disinfectantes: their use and evaluation of effectiveness. London: Academic Press, 229p. p. 45-49. 1981.

RUTALA, W. A. APIC Guideline for selection and use of disinfectants. **AJIC Am. J. Infect. Control**, v. 24, p. 313-42, 1996.

RUTALA, W. A.; COLE, E. C. Ineffectiveness of hospital disinfectants against bacteria: a collaborative study. **JSTOR: Infect. Control**, v. 8, n. 12, p. 501-506, 1987.

RUTLAND, B. E. et al. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, p. 1328–1330, 2009.

SCALLAN, E. et al. Prevalence of diarrhea in the community in Australia, Canada, Ireland and the United States. **Int. J. Epidemiol.**, v. 34, p. 454–460, 2005.

SCOTT, E. Foodborne disease and other hygiene issues in the home. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 80, p. 5–9, 1996.

SEEPERSADSINGH, N.; ADESIYUN, A. A.; SEEBARANSINGH, R. Serovars and antibiotic sensitivity of *Salmonella* spp. isolated from non-diarrheic cats in Trinidad. **Vet. Arch.**, v. 75, p. 223–231, 2005.

SHIMONO, N. et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections following thoracic surgeries occurring via the contamination of bronchoscopes and an automatic endoscope reprocessor. **J. Infect. Chemother.**, v. 14, p. 418–423, 2008.

SINCLAIR, R. G.; GERBA, C. P. Microbial contamination in kitchens and bathrooms of rural Cambodian village households. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 52, p. 144–149, 2010.

TAKAHASHI, H. et al. Nosocomial *Serratia marcescens* outbreak in Osaka, Japan, from 1999 to 2000. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 25, p. 156–161, 2004.

TIMENETSKY, J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. **Rev Saúde Pública**, v. 24, p. 47-50, 1990.

TOMASINO, S. Disinfectants. In: Official Methods of Analysis. 18th ed. Revision 2, **Association of Official Analytical Chemists**, cap. 6, 2007.

TOMASINO, S. Disinfectants. In: Official Methods of Analysis. 18th ed. Revision 3, **Association of Official Analytical Chemists**, cap. 6, 2010.

TOMASINO, S. F., FIUMARA, R. M., COTTRILL, M. P. Enumeration procedure for monitoring test microbe populations on inoculated carriers in AOAC use-dilution methods. **J AOAC Int**, Fort Meade, v. 89, n. 6, p. 1629-1634, 2006.

TOMASINO, S. F., PINES, R. M., HAMILTON, M. A. Improving the AOAC use-dilution method by establishing a minimum log density value for test microbes on inoculated carriers. **J AOAC Int**, Fort Meade, v. 92, n. 5, p. 1531-40, 2009.

VAN ASSELT, E. D. et al. Cross-contamination in the kitchen: estimation of transfer rates for cutting boards, hands and knives. **J. Appl. Microbiol.**, v. 105, p. 1392–1401, 2008.

WATTS, J. L. et al. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. **J. Dairy Sci.** v. 83, n. 10, p. 2373-2379, 2000.

WIRTANEN, G; SALO, S. Disinfection in food processing-efficacy testing of disinfectants. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 2, p. 293–306, 2003.

APÊNDICE A

EXEMPLO DO FORMULÁRIO DE REGISTRO DOS TESTES DE DILUIÇÃO DE USO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



FORMULÁRIO DE REGISTRO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA 1/2

Amostra nº: —

Produto/ nº lote: *Alcool 70%*

Classificação: —

Método: *Diluição de uso*Diluição testada: *70% (V/V)*Microorganismo teste: *Staphylococcus aureus*Datas dos repiques do microorganismo teste/meio de cultura e nº lote: *CN 659/10*1º repique: *08/07/10* 2º repique: *09/07/10* outros repiques: —3º repique: *10/07/10* 4º repique: *12/07/10*Meio de subcultura/ nº lote: *Caldo Letheen 478/10*Temperatura: *20±1°C*

Matéria orgânica: —

Termômetro ensaio: *T 0098*Tempo de contato: *10 min.*Cronômetro: *EX 0492*Incubação: *36±1°C / 48h* Estufa nº: *MB 0175*Termômetro estufa: *T 0175*Fluxo laminar: *MB 0100*Proveta volume/ nº lote: *10ml / 29408747*Erlenmeyer volume/ nº lote: *250ml / 32070610*Tubos de ensaio / nº lote: *25 x 150 / 32210510*Placas de Petri com papel de filtro/ nº lote: *32080610*

RESULTADO:

Subc.	Tubos: 1 a 60	Data	Leitura	Tot.cil. positivos
1ª	<i>Ausência de crescimento nos 60 Tubos</i>	<i>14/07/10</i>	<i>16/07/10</i>	<i>1</i>
2ª	<i>Crescimento no tubo 34R e ausência nos demais Tubos</i>			

OBSERVAÇÃO: *Colorações de Gram: cocos gram-positivos*CONFIRMAÇÃO DO MICROORGANISMO TESTE: *Teste da coagulase: coagulase-positivo*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde


FORMULÁRIO DE REGISTRO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA 2/2

Amostra n° :

Produto/ n° lote:

Controles		Resultado	Interpretação
		P/N	C/NC
Esterilidade	meio de subcultura/ n° lote: 478/10	N	C
	água purificada/ n° lote: 42160710	N	C
	matéria orgânica: —	—	—
	carreador/ n° lote: 13160410	N	C
	pipetas/n° lote: 1mL —	—	—
	2mL —	—	—
	5mL —	—	—
	10mL 29408747	N	C
Viabilidade	meio de subcultura/ n° lote: 478/10	Tubo A: P	C
		Tubo B: P	C

N – negativo (ausência de crescimento microbiano)

P – positivo (presença de crescimento microbiano)

C – conforme

NC – não conforme

Conclusão: *Satisfatório*Analista: *Rodrigo*Data: *20/07/10*

APÊNDICE B

EXEMPLO DOS FORMULÁRIOS DE REGISTRO DOS TESTES DO COMITÊ EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO – FASE 1

EN 1040 (Fase 1) ①

Produto: *Alcool 70%*

Micro-organismo: *Enterococcus hirae*

Neutralizante: *—*

Temperatura °C: *20 ± 1°C*

Tempo de contato: *10 min.*

Suspensão de validação (Nvo)			Controle A			Controle B			Controle C		
Vc1	<i>53</i>	<i>56,5</i>	Vc1	<i>52</i>	<i>53,5</i>	Vc1	<i>58</i>	<i>62</i>	Vc1	<i>60</i>	<i>62</i>
Vc2	<i>60</i>		Vc2	<i>55</i>		Vc2	<i>66</i>		Vc2	<i>64</i>	
30 ≤ Nvo ≤ 160 <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			A ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			B ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			C ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não		

Suspensão teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	Média = $2,22 \times 10^8$ logN = 8,35 No=N/10 – logNo = 7,35 7,17 ≤ logNo ≤ 7,7? <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não
	10^{-6}	<i>238</i>	<i>196</i>	
	10^{-7}	<i>31</i>	<i>23</i>	

Concentração do produto	Vc1	Vc2	Na (Média x 10)	logNa	logR
<i>Produto Puro</i>	<i><14</i>	<i><14</i>	<i><140</i>	<i><2,15</i>	<i>> 5,2</i>
<i>70%</i>	<i><14</i>	<i><14</i>	<i><140</i>	<i><2,15</i>	<i>> 5,2</i>
<i>25%</i>	<i>>330</i>	<i>>330</i>	<i>>3300</i>	<i>>3,52</i>	<i>< 3,83</i>

Conclusão: *Produto Satisfatório (DO = 0,190)*

Analista: *Rodrigo*

Data: *12/05/11*

EN 1040 (Fase 1) - ②

Produto: *Alcool 70% (v/v)*

Micro-organismo: *Enterococcus hirae*

Neutralizante: —

Temperatura °C: *20 ± 1 °C*

Tempo de contato: *10 min*

Suspensão de validação (Nvo)		Controle A			Controle B			Controle C		
Vc1	70 ⁵² 70 ⁵⁴	Vc1	70	70	Vc1	52	52,5	Vc1	47	42
Vc2	70 ⁵⁴	Vc2	70		Vc2	53		Vc2	37	
30 ≤ Nvo ≤ 160 <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não		A ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			B ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			C ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não		

Suspensão teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	Média = $2,06 \times 10^8$ logN = 8,31 No = N/10 - logNo = 7,31 $7,17 \leq \log No \leq 7,7 ?$ <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não
	10^{-6}	231	173	
	10^{-7}	22	27	

Concentração do produto	Vc1	Vc2	Na (Média x 10)	logNa	logR
Produto Puro	<14	<14	<140	<2,15	>5,16
70%	<14	<14	<140	<2,15	>5,16
25%	7330	7330	73300	>3,52	<3,79

Conclusão: *Produto Satisfatório (DO = 0,198)*

Analista: *Rodrigo*

Data: *13/05/11*

EN 1040 (Fase 1) - ③

Produto: *Álcool 70% (v/v)*

Micro-organismo: *Enterococcus hirae*

Neutralizante: —

Temperatura °C: *20°C*

Tempo de contato: *10 min.*

Suspensão de validação (Nvo)			Controle A			Controle B			Controle C		
Vc1	<i>66</i>	<i>63</i>	Vc1	<i>64</i>	<i>67</i>	Vc1	<i>51</i>	<i>58,5</i>	Vc1	<i>80</i>	<i>63,5</i>
Vc2	<i>60</i>		Vc2	<i>70</i>		Vc2	<i>66</i>		Vc2	<i>47</i>	
30 ≤ Nvo ≤ 160 <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			A ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			B ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			C ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não		

Suspensão teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	Média = $2,45 \times 10^8$ logN = <i>8,39</i> No = N/10 - logNo = <i>7,39</i> $7,17 \leq \log No \leq 7,7?$ <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não
	10^{-6}	<i>245</i>	<i>249</i>	
	10^{-7}	<i>23</i>	<i>22</i>	

Concentração do produto	Vc1	Vc2	Na (Média x 10)	logNa	logR
<i>Produto Puro</i>	<i><14</i>	<i><14</i>	<i><140</i>	<i><2,15</i>	<i>>5,24</i>
<i>70%</i>	<i><14</i>	<i><14</i>	<i><140</i>	<i><2,15</i>	<i>>5,24</i>
<i>25%</i>	<i>>330</i>	<i>>330</i>	<i>>3300</i>	<i>>3,52</i>	<i><3,87</i>

Conclusão: *Produto Satisfatório (DO = 0,205)*

Analista: *Rodrigo*

Data: *18/05/11*

APÊNDICE C

EXEMPLO DOS FORMULÁRIOS DE REGISTRO DOS TESTES DO COMITÊ
EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO – FASE 2, ETAPA 1EN 1276 (Fase 2 – Passo 1) - ①Produto: *Álcool 70% (v/v)*Micro-organismo: *Enterobacter cloacae* (isolado da cozinha)

Neutralizante: —

Substância Interferente: *BSA 3%*Temperatura °C: *20 ± 1°C*Tempo de contato: *10 min.*

Suspensão de validação (Nvo)			Controle A			Controle B			Controle C		
Vc1	85	76,5	Vc1	69	71	Vc1	92	76	Vc1	61	69,5
Vc2	68		Vc2	73		Vc2	60		Vc2	78	
30 ≤ Nvo ≤ 160 <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			A ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			B ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			C ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não		

Suspensão teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	Média = $2,65 \times 10^8$ logN = 8,42 No = N/10 – logNo = 7,42 $7,17 \leq \log No \leq 7,7?$ <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não
	10^6	290	250	
	10^7	23	21	

Concentração do produto	Vc1	Vc2	Na (Média x 10)	logNa	logR
Produto Puro	<14	<14	<140	<2,15	≥ 5,27
70%	<14	<14	<140	<2,15	≥ 5,27
25%	>330	>330	>3300	>3,52	≤ 3,90

Conclusão: *DO = 0,210. Produto satisfatório.*Analista: *Rodrigo*Data: *29/07/11*

EN 1276 (Fase 2 – Passo 1) - ②

Produto: *Alcool 70% (v/v)*

Micro-organismo: *Enterobacter cloacae* (isolado da cozinha)

Neutralizante: —

Substância Interferente: *BSA 3%*

Temperatura °C: *20 ± 1°C*

Tempo de contato: *10 min.*

Suspensão de validação (Nvo)			Controle A			Controle B			Controle C		
Vc1	58	63	Vc1	97	80	Vc1	83	74	Vc1	62	62,5
Vc2	68		Vc2	63		Vc2	65		Vc2	63	
30 ≤ Nvo ≤ 160 <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			A ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			B ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			C ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não		

Suspensão teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	Média = $2,64 \times 10^8$ logN = 8,42 No = N/10 - logNo = 7,42 7,17 ≤ logNo ≤ 7,7 ? <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não
	10^{-6}	238	291	
	10^{-7}	27	24	

Concentração do produto	Vc1	Vc2	Na (Média x 10)	logNa	logR
<i>Produto Puro</i>	<14	<14	<140	<2,15	≥ 5,27
<i>70%</i>	<14	<14	<140	<2,15	≥ 5,27
<i>25%</i>	>330	>330	>3300	>3,52	≤ 3,90

Conclusão: *PO = 0,187. Produto Satisfatório*

Analista: *Rodrigo*

Data: *29/07/11*

EN 1276 (Fase 2 – Passo 1) - ③

Produto: *Alcool 70% (v/v)*

Micro-organismo: *Enterobacter cloacae* (isolado da cozinha)

Neutralizante: —

Substância Interferente: *BSA 3%*

Temperatura °C: *20 ± 1°C*

Tempo de contato: *10 min.*

Suspensão de validação (Nvo)			Controle A			Controle B			Controle C		
Vc1	78	75	Vc1	58	65	Vc1	79	73,5	Vc1	55	70
Vc2	72		Vc2	72		Vc2	68		Vc2	85	
30 ≤ Nvo ≤ 160 <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			A ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			B ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não			C ≥ 0,5x Nvo <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não		

Suspensão teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	Média = $2,5 \times 10^8$ logN = 8,40 No = N/10 - logNo = 7,40 $7,17 \leq \log No \leq 7,7?$ <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não
	10^{-6}	220	276	
	10^{-7}	33	22	

Concentração do produto	Vc1	Vc2	Na (Média x 10)	logNa	logR
Produto Puro	<14	<14	<140	<2,15	≥ 5,25
70%	<14	<14	<140	<2,15	≥ 5,25
25%	7370	7370	73700	73,52	≤ 3,88

Conclusão: *DO = 0,192. Produto satisfatório*

Analista: *Rodrigo*

Data: *29/07/11*

APÊNDICE D
RESULTADOS DOS TESTES DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA PELOS MÉTODOS DE DILUIÇÃO DE USO E DO COMITÊ
EUROPEU DE NORMALIZAÇÃO

Microrganismos	Método da Diluição de Uso	CEN – Fase 1	CEN – Fase 2, Etapa 1
Álcool etílico 70%			
<i>S. aureus</i>	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
<i>S. choleraesuis</i>	Satisfatório	-----	-----
<i>P. aeruginosa</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. coli</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. hirae</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. cloacae</i> (isolado cozinha)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. cloacae</i> (isolado banheiro)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
Produto A			
<i>S. aureus</i>	Satisfatório	Satisfatório	Produto não foi neutralizado
<i>S. choleraesuis</i>	Satisfatório	-----	-----
<i>P. aeruginosa</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. coli</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. hirae</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. cloacae</i> (isolado cozinha)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. cloacae</i> (isolado banheiro)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
Produto B			
<i>S. aureus</i>	Insatisfatório	Satisfatório	Satisfatório
<i>S. choleraesuis</i>	Satisfatório	-----	-----
<i>P. aeruginosa</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. coli</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. hirae</i>	-----	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. cloacae</i> (isolado cozinha)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
<i>E. cloacae</i> (isolado banheiro)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório