

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

Hilda do Nascimento Nóbrega

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE PRODUTOS
ANTISSÉPTICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA *TIME KILL***

Rio de Janeiro
2013

Hilda do Nascimento Nóbrega

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE PRODUTOS
ANTISSÉPTICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA *TIME KILL***

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Área de Concentração em Qualidade de Produtos em Saúde, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz,RJ), como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Prof. Dr. Ivano R. V. de Filippis Capasso

Rio de Janeiro
2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Nóbrega, Hilda do Nascimento

Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos - através da técnica *time kill*
/ Hilda do Nascimento Nóbrega: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

65 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Ivano R. V. de Filippis Capasso

1. Produtos com Ação Antimicrobiana 2. Time kill. 3. Vigilância Sanitária. I.Título.

IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ANTISEPTICS PRODUCTS THROUGH
TIME KILL

Hilda do Nascimento Nóbrega

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE PRODUTOS
ANTISSÉPTICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA *TIME KILL***

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Área de Concentração em Qualidade de Produtos em Saúde, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz,RJ), como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Victor Augustus Marin
Universidade do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Ivano R. V. de Filippis Capasso - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Para meu querido Carlos Eduardo, pelo apoio intelectual e psicológico, por me encorajar e lembrar que tudo pode dar certo mais uma vez.

AGRADECIMENTOS

A Deus, cuja presença eu sinto todo os dias, como prova maior da minha existência.

Aos meus pais José Carvalho da Nóbrega e Maria A. do Nascimento Nóbrega, por estarem presentes em minha vida, como é importante saber que vocês existem, que Deus os proteja sempre. Obrigada por tudo!

O meu orientador Prof. Dr. Ivano R. V. de Filippis Capasso pela orientação e confiança que foram importantes para a realização dessa dissertação, a ele minha admiração e meu agradecimento.

Especialmente a chefe e Mestre Joana Angélica Barbosa Ferreira pelos ensinamentos, apoio e companheirismo que foram essenciais para a finalização dessa dissertação, obrigada.

À toda a equipe do Setor de Medicamentos Não-Estéreis, Cosméticos, Artigos e Insumos de Saúde.

À Dr^a Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão, pela disponibilidade, paciência e profissionalismo.

À minha amiga Adherlene a quem eu aprendi a admirar pela amizade, companheirismo, incentivo e apoio diante das dificuldades das disciplinas cursadas durante o curso.

À Coordenação de Pós Graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde do INCQS/Fiocruz, a seus professores, cujos cursos tive a oportunidade de frequentar durante o mestrado, e às meninas da secretaria acadêmica, sempre muito simpáticas e dispostas a colaborar.

Á todos do Departamento de Microbiologia que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, principalmente a chefe do departamento Dra. Suely Fracallanza pela liberação para que eu pudesse cursar as disciplinas.

Ao Diretor do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde do INCQS/Fiocruz , Dr. Eduardo Leal pela oportunidade que me foi dada, senão, não teria sido possível ingressar neste Mestrado.

À Anna Maria, Michele, Renata, Amanda, Mararlene (pela grande ajuda, obrigada!) Tatiana, Lilian e especialmente à Dra. Shirley Abrantes pelo incentivo, amizade e pela força nos momentos mais tensos que só quem já passou e passa, sabe como é difícil chegar até o final.

“A ciência é antes um modo de pensar do que propriamente um conjunto de conhecimentos. Seu objetivo é compreender de que forma o mundo funciona, procurar as regularidades que possam existir, penetrar nas conexões das coisas, desde as partículas subnucleares, que talvez sejam as componentes de toda a matéria, até os organismos vivos e a comunidade social humana, e daí ao cosmo como um todo. [...] A ciência é baseada na experimentação, na disposição de desafiar velhos dogmas, numa abertura para ver o universo como ele realmente é. Nesse pressuposto, a ciência muitas vezes requer coragem — pelo menos a coragem de questionar a sabedoria convencional.”

Carl Sagan

RESUMO

A antissepsia consiste na utilização de produtos (microbicidas ou microbiostáticos) sobre a pele ou mucosa com o objetivo de reduzir os micro-organismos existentes nas camadas superficiais (microbiota transitória) e profundas (microbiota residente) da pele e de mucosas, pela aplicação de agentes biocidas, classificados como antissépticos. Um número considerável de agentes químicos é utilizado tanto em laboratórios quanto nos estabelecimentos de saúde e nas indústrias, incluindo álcoois, iodóforos, fenóis sintéticos e compostos quaternários de amônio, clorexidina entre outros. Entretanto, não existe um antisséptico que atenda a todas as situações e necessidades encontradas, sendo preciso conhecer as características de cada um para que se tenham subsídios suficientes que permitam a escolha correta do produto, evitando custos excessivos e uso inadequado. Ao contrário dos desinfetantes que apresentam padrões e critérios específicos e bem definidos, nos antissépticos não são realizados testes, para as diversas preparações dermatológicas antimicrobianas existentes. Por isso, este trabalho se propôs estudar a atividade antimicrobiana desses produtos utilizando ensaio *Time Kill* descrito por Hobson e Bolsen, 1991 no qual é avaliada a destruição de uma população de micro-organismos aeróbios dentro de um período de tempo especificado, quando testado contra os agentes antimicrobianos. Foram analisadas 25 preparações à base de: PVP-I sol. degermante, digluconato de clorhexidrina, nordexidina, cloreto de benzalcônico, triclosano e álcool etílico. Foram utilizadas cepas microbianas de referência e cepas clínicas. Todas as amostras foram processadas utilizando produtos antissépticos na concentração diluída e não diluída. Para a recuperação dos micro-organismos sobreviventes foram utilizadas as técnicas de semeadura em profundidade e filtração por membrana. Das 25 amostras comerciais, 20% foram insatisfatórias utilizando-se as cepas de referência, todas essas à base de clorexidina. Nos ensaios com as cepas clínicas todas as amostras foram satisfatórias. Com base nos dados obtidos podemos comprovar que a filtração por membrana é menos sensível, não expressando fielmente as condições microbiológicas do produto. Já a semeadura em profundidade mostrou-se bem mais sensível uma vez que em todas as amostras testadas o número de colônias contadas foi superior. As análises realizadas em 35 amostras de produtos antissépticos nos permitiram inferir que o teste *Time Kill* é adequado para o estudo da atividade antimicrobiana *in vitro*.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, antisséptico, tempo de morte, neutralização.

ABSTRACT

Antisepsis is any procedure using microbicide or microbiostatic products on the skin or mucosa in order to reduce the existing flora on surface layers (transient microbiota) and deep (microbiota). The application of such biocide agents are classified as antiseptics. A considerable number of chemicals is used both in laboratories and health establishments and industries, including alcohol, iodophors, synthetic phenols, quaternary ammonium compounds, chlorhexidine and others. However, an antiseptic that meets all situations and needs is not available yet. It is necessary to know the characteristics of each antiseptic to enable the correct choice, avoiding excessive costs and misuse. Unlike disinfectants which have specific and well defined standards and criteria, antiseptics don't have specific considerations for testing the various existing antimicrobial dermatological preparations. Therefore, this study aimed to determine the antimicrobial activity of these products using as reference the Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity citing the "Time Kill" assay. This is the procedure of ASTM E2315 Study Time Kill Test developed in 1991 by Bolsen and Hobson, which is evaluated by the evolution of a population of aerobic micro-organisms within a specified time period, when tested against antimicrobial agents. The analysis was carried out on 25 samples of antiseptic products showing that the Time Kill test is suitable for the study of in vitro antimicrobial activity PVP-I, clorhexidrina of digluconate, nordexidina, benzalcônico chloride, triclosan and ethyl alcohol. All samples were processed using antiseptic products in a diluted and direct concentration and both were inoculated by depth seeding and membrane filtration. Our results show that membrane filtration is less sensitive and don't express the microbiological condition of the product. Depth seeding proved to be much more sensitive since all samples tested showed a higher number of colonies.

Keywords: antimicrobial activities, antiseptic, time kill, neutralization.

ABREVIATURAS

- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC** - *American type culture collection*
- EM** - Norma europeia
- FDA** - *Food and Drug Administration*
- IH** - Infecção hospitalar
- INCQS** - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- M11** - *Methods*
- MS** - Ministério da Saúde
- NCCLS** - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- OTC** - *Over-the-Counter*
- PV** - Peso-Volume
- PVP** - Peso-Volume-Peso
- RN** - Recém-nascidos
- SUS** - Sistema Único de Saúde
- T** - Tempo
- TO** - Tempo zero
- UFC** - Unidade formadora de colônias
- USP** - *United States Pharmacopeia*
- UTIN** - Unidade de terapia intensiva neonatal
- WHO** - *World Health Organization*
- PAC** - Pneumonia adquirida na comunidade
- HCAP** - A pneumonia associada à Saúde
- NH₄⁺** - íon amônio de quatro valências
- quats** - amônio quarternário
- CDC** - Centers for Disease Control and Prevention
- AOAC** - Association of Official Analytical Chemists
- IRAS** - Infecção Relacionada a Assistência a Saúde
- ASTM E 2315 - 03** Teste *Time Kill*
- NA** - salina estéril

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Relação das principais causas de morte em países desenvolvidos e da mortalidade infantil de 0 a 4 anos de idade	17
Figura. 2. Esquema de processamento de um produto antisséptico-atraves do método <i>Time Kill</i>	38
Figura. 3. Filtração por membrana.	38
Figura. 4. Esquema do controle	39
Figura. 5. Porcentagem total das 25 amostras comerciais analisadas que apresentaram ausência de crescimento e presença de crescimento microbiano	42
Figura. 6. Comparação entre as amostras não diluídas de dicluconato de clorhexidina (B) e álcool etílico a 35% (A), por semeadura em profundidade e filtração por membrana, que apresentaram presença de <i>P. aeruginosa</i>	43
Figura. 7. Comparação entre as amostras diluídas de dicluconato de clorhexidina (B) e álcool a 35% (A), semeadura em profundidade e filtração por membrana, que apresentaram presença de <i>P. aeruginosa</i>	44
Figura. 8. Comparação entre as amostras não diluídas e diluídas de dicluconato de clorhexidina (B) e álcool a 35% (A), filtração por membrana, que apresentaram presença de <i>P. aeruginosa</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela. 1. Substâncias químicas utilizadas como antissépticos.	23
Tabela. 2. Ação microbiológica de alguns agentes antissépticos	23
Tabela. 3. Cepas de origem clínica utilizadas no estudo	36
Tabela. 4. Atividade antimicrobiana de produtos antissépticos frente a cepas de referência e cepas clínicas por técnica de <i>Time Kill</i>	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Tipos de agentes químicos e atividade dos produtos antissépticos	21
1.2. Lavagem e Assepsia das mãos.....	29
1.3. Métodos para a determinação da atividade antimicrobiana de produtos antissépticos	31
1.3.1. Técnica <i>Time Kill</i>	32
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	34
3. OBJETIVO GERAL	35
3.1. Objetivos específicos	35
3.1.1. Determinar a eficácia dos produtos antissépticos, quanto à sua ação antimicrobiana <i>in vitro</i> por método <i>Time Kill</i>	35
3.1.2. Determinar a susceptibilidade de cepas de origem clínica aos antissépticos em estudo	35
3.1.3. Fornecer dados que permitam sugerir a adoção de um método oficial de avaliação <i>in vitro</i> dos antissépticos	35
3.1.4. Adicionalmente, avaliar o procedimento de recuperação de micro-organismos sobreviventes utilizando semeadura em profundidade e filtração por membrana.....	35
4. MATERIAL E MÉTODO	36
4.1. Amostras de antissépticos.....	36
4.2. Micro-organismos utilizados	36
4.3. Preparação de inóculos	37
4.4. Método <i>Time Kill</i>	37
4.5. Controle	39
5. Critérios de aceitação.....	39
6. RESULTADO	40
7. DISCUSSÃO	46
8. CONCLUSÕES	53
9. Meios de cultura	54
9.1. Ágar Mueller- Hinton	54
9.2. Caldo Mueller- Hinton	54
9.3. Caldo Mueller Hinton modificado	54
9.4. Ágar Caseína-soja.....	55
9.5. Ágar Sabouraud-dextrose – 4%	55
REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

Assepsia é o conjunto de medidas adotadas para impedir a introdução de agentes patogênicos no organismo e no ambiente e inclui procedimentos de antisepsia, desinfecção e esterilização (GOMES, 2002). A antisepsia consiste na utilização de produtos (microbiocidas ou microbiostáticos) sobre a pele ou mucosa com o objetivo de reduzir os micro-organismos existentes nas camadas superficiais (microbiota transitória) e profundas (microbiota residente) da pele e de mucosas, pela aplicação de agentes biocidas, classificados como antissépticos. Na assistência à saúde, a principal função dos antissépticos é o preparo da pele, como higienização das mãos e antes de alguns procedimentos, como cirurgias, aplicações de injeções, punções venosas e arteriais, cateterismos vesicais e outros procedimentos invasivos, nos quais ocorre o rompimento das barreiras normais de defesa do indivíduo (SANTOS, 2002).

Hospitais que trabalham com equipe envolvida no controle de infecção hospitalar devem ressaltar questões relevantes que segundo Redfern (1998) compreendem aspectos relacionados ao paciente (preparo de pele, procedimento de tricotomia, roupa privativa, retiradas de adornos) e relacionado à equipe cirúrgica (REDFERN, 1998).

Nos dias atuais, tem sido sugerida a mudança do termo infecção hospitalar por Infecção Relacionada à Assistência À Saúde (IrAS), que reflete melhor o risco de aquisição dessas infecções (ANVISA, 2000).

A Infecção relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) nasceu com os serviços de saúde, principalmente nos hospitais, que podem ser considerados um ecossistema particular, um ambiente ideal para o surgimento de surtos onde se verifica a presença de indivíduos debilitados ou imunocomprometidos, a realização de procedimentos invasivos, o uso frequente de antimicrobianos e a presença da equipe de saúde necessária para à assistência (BATISTA, 2004).

Sem dúvida alguma, as IRAS constituem um grave problema de saúde pública, tanto pela sua abrangência como pelos elevados custos sociais e econômicos. O conhecimento e a conscientização sobre os vários riscos de transmissão de infecções, das limitações dos processos de desinfecção e de esterilização e das dificuldades de processamento inerentes à natureza de cada

artigo são imprescindíveis para que se possam tomar as devidas precauções. (ANVISA, 2000).

Segundo dados de LEAL et al., (2004), no município do Rio de Janeiro, a mortalidade infantil encontra-se na faixa de quinze óbitos por mil nascimentos, e que destes, 70% ocorrem nos primeiros vinte e oito dias de vida. A análise destes óbitos que poderiam ser evitados a partir do controle da IRAS, que é considerada um dos mais importantes agravos à saúde dos recém-nascidos (RN), decorrente da falta de assepsia durante os procedimentos de parto (LEAL et al. 2004).

As infecções hospitalares representam um grave problema em todo o mundo, ocasionando aumento da morbidade e da mortalidade, do tempo de hospitalização e dos custos hospitalares (EDMOND & WENZEL, 1996; CRABTREE et al., 1999; NIEDERMAN, 1998) (Figura 1). Diversos micro-organismos estão envolvidos nessas infecções, apresentando cada vez mais resistência aos antibióticos.

Segundo Hanberger (1999), estudos realizados com o objetivo de avaliar a ocorrência de bactérias Gram-negativas com sensibilidade diminuída aos antibióticos, em pacientes de UTIs na Europa, demonstraram que os micro-organismos mais encontrados foram as enterobactérias (59%), seguidas pela *P. aeruginosa* (24%), sendo que este micro-organismo apresentou maior resistência em todos os países envolvidos (HANBERGER et al. 1999). Estudos realizados no Brasil mostraram a ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em diferentes hospitais do Rio de Janeiro (PELLEGRINO, et al. 2002).

No Brasil, o Ministério de Saúde define infecção hospitalar como aquela adquirida após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorre durante a internação e em decorrência de procedimentos hospitalares.

Figura 1- Relação das principais causas de morte em países desenvolvidos e da mortalidade infantil de 0 a 4 anos de idade.



FONTE: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,oms-eleva-alerta-de-gripe-suina-e-brasil-tem-dois-suspeitos,362957,0.htm> - consultado em 06.06.11

Também a Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990 (BRASIL, 1990), estabelece como objetivo e atribuição do Sistema Único de Saúde (SUS) “a assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da Saúde com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas, onde estão incluídas também ações de prevenção de infecções”. (EDMOND & WENZEL, 1996; CRABTREE et al., 1999; NIEDERMAN, 1998).

Dentre as medidas de controle e prevenção das IRAS estão os procedimentos de antisepsia, desinfecção e esterilização.

Ignaz Semmelweis (1818-1865) é considerado o pioneiro nos esforços de controle da infecção hospitalar. O processo de coletar sistematicamente os dados e analisar e instituir medidas de prevenção ainda é o modo mais eficaz no controle de infecções. Além disso, a importância atribuída por ele às mãos dos profissionais de saúde, como meio de transmitir patógenos de um paciente para outro, continua válida. Infelizmente, como no século XIX, os médicos e demais profissionais de saúde ainda necessitam ser lembrados constantemente de higienizar as mãos antes e depois do contato com os pacientes (ANVISA, 2000).

Considerando que a adesão dos profissionais de saúde à higienização das mãos, segundo pesquisas atuais, não é maior que 60%, ainda é possível afirmar que hoje, como no tempo de Semmelweis, as mãos ainda são o principal veículo de transmissão de micro-organismos no ambiente hospitalar (ANVISA, 2000).

A higienização das mãos é, isoladamente, a ação mais importante para a prevenção e para o controle de infecções hospitalares (BRASIL, 1998). A importância

das IRAS é realçada quando analisamos os estudos do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), que as considera como sendo as principais causas de morbidade e mortalidade, além de aumentarem o tempo de hospitalização do paciente, elevando o custo do tratamento (CDC, 2002).

O desenvolvimento dos antissépticos relaciona-se à história do tratamento de feridas e tem como objetivo básico reduzir os riscos e prevenir ou diminuir as complicações infecciosas (CERQUEIRA, 1997). Por mais de um século, o iodo, descoberto em 1812, foi considerado um dos antissépticos mais eficazes, sendo utilizado na prevenção de infecção e no tratamento de feridas. Em 1839, publicou-se o primeiro relato do seu uso específico em feridas (GOTTARDI, 2001). No entanto, sua desvantagem de causar toxicidade às células levou a novas formulações, como os iodóforos (CERQUEIRA, 1997).

Em 1750, o médico inglês Joseph Pringle publicou três artigos comparando a resistência à putrefação pela aplicação de substâncias, que ele chamou de antissépticos (BLOCK, 2001). No século XIX, Lister e Semmelweis demonstraram em seus experimentos que agentes químicos poderiam prevenir doenças. O primeiro utilizou o fenol como antisséptico pré-cirúrgico e o último empregou água clorada para lavagem prévia das mãos antes do trabalho em obstetrícia, alcançando uma redução significativa da morte de neonatos por febre puerperal (BLOCK, 2001).

Além de caracterizar o espectro de referência ou de organismos isolados clinicamente para o qual o antimicrobiano é eficaz, a taxa de morte também deve ser caracterizada pelo produto. O produto antimicrobiano é testado com o tempo e o número de sobreviventes determinados por contagem direta. A *Food and Drugs Administration* (FDA) atualmente não especifica uma metodologia específica (FDA, 2007).

Os antissépticos utilizados nas lesões cutâneas devem combater tanto a microbiota transitória quanto a permanente, que podem ser constituídas por várias bactérias patogênicas, incluindo aquelas que comumente causam infecções hospitalares, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* etc. Muitos antissépticos se mostram mais eficazes em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas, embora esta diferença não seja tão clara como na atividade dos antibióticos. Um grupo de bactérias Gram-negativas, do gênero *Pseudomonas*, é de especial interesse (KONEMAN, 2001; LACZ, 1984; MURRAY et al., 2007). As pseudomonas, que também são comuns no ambiente, são muito

resistentes a diversos produtos químicos e podem até mesmo crescer em alguns antissépticos (BALOWS, 1991).

P. aeruginosa, provoca infecção de feridas, de queimaduras e do trato urinário, quando introduzida por cateter e instrumentos ou por soluções de irritação. O acometimento do trato respiratório, especialmente por respiradores contaminados, resulta em pneumonia necrótica e otite externa invasiva (maligna) em pacientes diabéticos. A infecção do olho, que pode levar à sua rápida destruição, é mais comum após procedimentos cirúrgicos ou ferimentos. Em lactantes ou pessoas debilitadas, pode invadir a corrente sanguínea resultando em sépsis fatal e ocorre comumente em pacientes com leucemia ou linfoma e em vítimas de queimaduras graves. (BROOKS, 2009).

Staphylococcus aureus está frequentemente envolvido com infecções humanas (MOREIRA et al., 1998), tanto de origem comunitária como hospitalar, podendo ser encontrado no ambiente externo (MOREIRA et al., 1998). O protótipo de uma lesão estafilocócica é o furúnculo ou outros abscessos localizados que quando estabelecidos em um folículo piloso levam a necrose tecidual. A partir de qualquer foco os micro-organismos podem se propagar através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para outras partes do corpo (BROOKS, 2009).

E. coli é a causa mais comum de infecção no trato urinário, podendo resultar em bacteremia com sinais clínicos de sépsis, diarreia dos viajantes, septicemia e meningite. (BROOKS, 2009).

Candida albicans pode invadir a corrente sanguínea causando tromboflebite, endocardite ou infecção dos olhos ou outros órgãos, incluindo as meninges, quando inoculada por via intravenosa (equipos de soro, agulhas, alimentação parenteral, abuso de narcóticos, etc). (BROOKS, 2009).

Um quadros de infecção hospitalar mais importantes é a pneumonia bacteriana. Segundo Heron (2007), a pneumonia é uma doença comum associada com morbidade e mortalidade substanciais e é uma das principais causas de morte nos Estados Unidos (HERON, 2007). Ela é responsável por cerca de 1,4 milhão de internações e, em combinação com a gripe, resulta em quase 60 mil mortes por ano (HERON, 2007; DE FRANCES, 2007). A Pneumonia Adquirida na Comunidade (CAP) é definida como pneumonia que se desenvolve em pacientes fora do ambiente hospitalar. A Pneumonia Associada à Saúde (HCAP) é uma entidade mais recentemente descrita, que inclui pacientes com pneumonia oriundos da

comunidade e que apresentam maior risco de infecção a partir dos mesmos microrganismos Gram-negativos multirresistentes e geralmente associados a IRAS (KOLLEF, 2008; CARRATALA, 2007; KOLLEFF, 2005; MICEK, 2007).

A mortalidade infantil decorrente da infecção em neonatos, sendo, pois, um importante agravo à saúde dos RN, minimizar os riscos de IRAS significa reduzir o número de mortes de RN que necessitam de hospitalização. Sem dúvida, um desafio a ser enfrentado pelos profissionais e gerenciadores, tendo em vista que, no Brasil, 25% dos óbitos ocorrem em unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN) (PRADE et al., 1995a). Vários estudos têm referendado a importância da higiene oral em pacientes sob ventilação mecânica invasiva, como medida de prevenção da formação da placa bacteriana dentária. Existem estudos demonstrando que o mesmo agente microbiano causador da placa dentária foi responsável pela ocorrência de pneumonia em pacientes sob ventilação invasiva. A utilização de clorexidina 0,12% na higiene oral relacionou-se com a redução da ocorrência de pneumonias hospitalares em unidades de terapia intensiva (ADDE, et. al. 1991).

Também na área da odontologia, o tema antissépticos é de grande relevância. Para Adde (1991), os materiais envolvidos no trabalho clínico nos estabelecimentos de saúde de atenção odontológica podem se transformar em veículo para os agentes infecciosos, daí a necessidade de passarem por um processo de descontaminação após o uso. Além disso, os locais em que estes materiais são processados e as pessoas que os manuseiam também podem se tornar fontes de infecção para um hospedeiro suscetível. O objetivo é eliminar total ou parcialmente as fontes de infecção presentes após cada atendimento (ADDE, et. al. 1991).

Na Europa, utilizam-se soluções de clorexidina a 0,2% como colutórios orais desde a década de 1980. A natureza catiônica da clorexidina permite a sua ligação a tecidos duros e moles na cavidade bucal; a seguir, é liberada com o decorrer do tempo, produzindo um efeito bacteriostático contínuo. Foi demonstrada a eficácia dessas soluções, quando utilizadas duas vezes ao dia, na redução da formação da placa e gengivite. Os principais efeitos colaterais consistem na pigmentação dos dentes, aumento da formação de cálculos e alteração do paladar. Dois colutórios de clorexidina a 0,12% foram aprovados pela FDA, sendo tão eficazes clinicamente quanto a solução mais forte a 0,2%, porém com uma redução significativa na incidência de efeitos colaterais (FDA, 1999b).

Na área de ginecologia e obstetrícia, Adde (1991) diz em seus estudos que as seguintes soluções antissépticas são as mais indicadas: Solução tópica alcoólica de dicluconato de clorexidina a 0,5%; solução tópica degermante de dicluconato de clorexidina a 0,2%; tintura de PVPI a 10% (1% de iodo ativo); solução de PVPI a 10% (1% de iodo ativo) (ADDE, et. al. 1991).

A disseminação de patógenos resistentes aos antibióticos representa uma ameaça crescente em unidades de saúde. Desta forma, é importante a utilização de produtos eficazes visando impedir a disseminação de micro-organismos resistentes.

Segundo trabalho de Weber e Rutala (2006), de um modo geral, antissépticos e desinfetantes devem ser usados quando há estudos científicos que demonstrem benefício ou quando existe uma forte justificativa teórica para a utilização de germicidas (WEBER e RUTALA, 2006).

1.1. TIPOS DE AGENTES QUÍMICOS e ATIVIDADE DOS PRODUTOS ANTISSÉPTICOS

Um número considerável de agentes químicos é utilizado tanto em laboratórios quanto nos estabelecimentos de saúde e nas indústrias, incluindo álcoois, iodóforos, fenóis sintéticos e compostos quaternários de amônio, clorexidina entre outros. Entretanto, não existe um antisséptico que atenda a todas as situações e necessidades encontradas, sendo preciso conhecer as características de cada um para que se tenham subsídios suficientes que permitam a escolha correta do produto, evitando custos excessivos e uso inadequado (TEIXEIRA, 2010).

Um antisséptico ideal deve ser capaz de destruir a forma vegetativa de todos os micro-organismos patogênicos, requerer tempo limitado de exposição e ser eficaz em temperatura ambiente, além de ser não corrosivo, apresentar baixa toxicidade para seres humanos e ser de baixo custo. Devido às semelhanças na composição química e no metabolismo entre os seres humanos e micro-organismos, é pouco provável alcançar este ideal. Entretanto, a toxicidade seletiva (para alguns micro-organismos, mas não para as células humanas) é de suma importância para os antissépticos. O grau de seletividade para os agentes antissépticos pode variar, dependendo dos tecidos com os quais entram em contato. Um antisséptico destinado para a lavagem das mãos pode ser menos seletivo do que um

antisséptico utilizado como colutório oral (enxaguatório ou ainda enxague bucal são líquidos utilizados para realizar a higiene da cavidade oral), visto que o epitélio altamente queratinizado da pele proporciona maior grau de proteção contra antisséptico do que o epitélio oral (FDA, 2007).

Em todo o campo de assistência à saúde, as preocupações quanto à transmissão de micro-organismos infecciosos levaram a um aumento no uso de antissépticos e desinfetantes. Os vários antissépticos e desinfetantes podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação: agentes que desnaturam as proteínas; agentes que causam a ruptura osmótica da célula; e agentes que interferem em processos metabólicos específicos, tendem a matar os micro-organismos. A interferência em processos metabólicos específicos, geralmente afeta o crescimento e a reprodução celular sem matar a célula (TEIXEIRA, 2010).

A Tabela 1 relaciona as várias classes de substâncias químicas utilizadas como desinfetantes/antissépticos e a Tabela 2 mostra sua eficácia contra diversos micro-organismos representativos. Os aldeídos e certas substâncias à base de halogênio e oxidantes possuem a maior faixa de eficácia e também tendem a ser mais tóxicos para os tecidos humanos. Em consequência, seu uso limita-se principalmente à desinfecção e à esterilização. As outras classes químicas consistem em agentes antimicrobianos menos eficazes, mas também menos prejudiciais aos tecidos humanos, sendo, portanto, utilizadas tanto como desinfetantes quanto como antissépticos (WHO, 2005).

Tabela 1 – Substâncias químicas utilizadas como antissépticos.

Classes	Principais agentes antissépticos
Biguanidas e amidinas	<u>Dibromopropamidina</u> - Clorexidina - <u>Propamidina</u> - <u>Hexamidina</u> - <u>Poliexanida</u>
Fenol e derivados	<u>Hexaclorofeno</u> - <u>Policresuleno</u> - <u>Fenol</u> - Triclosan - <u>Cloroxilenol</u> - <u>Bifenilol</u>
Derivados de iodo	<u>Iodo/octilfenoxipoliglicoleter</u> - Iodopovidona - <u>Di-iodo-hidroxiopropano</u>
Compostos de amónio quaternário	<u>Benzetónio</u> - <u>Cetrimónio</u> (brometo - cloreto) - <u>Cetilpiridínio</u> - <u>Cetrimida</u> - Cloreto de benzoxónio - <u>Cloreto de didecildimetilamónio</u>
Outros	<u>Peróxido de hidrogénio</u> - <u>Tosilcloramida de sódio</u> - Etanol - <u>Permanganato de potássio</u> - <u>Hidroclorito de sódio</u>

Adaptada da fonte: <http://www.formatex.info/microbiology2/369-376.pdf>

Tabela 2 - Ação microbiológica de alguns agentes antissépticos.

Classe ou agente	Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas	Esporos bacterianos	Bacilos da tuberculose	HBV	HIV	Fungos
<u>Halogênicos</u>	+	+	±	±	+	+	+
<u>Fenóis</u>	+	+	-	+	-	+	+
<u>Álcoois</u>	+	+	-	+	±	+	±
<u>Clorexidrina</u>	+	±	-	-	-	+	±

Adaptado da fonte: <http://www.formatex.info/microbiology2/369-376.pdf>

(+) positivo, (-) negativo, (±) mais ou menos

A clorexidina possui ampla atividade antimicrobiana, porém mata os micro-organismos numa taxa muito mais lenta do que a do álcool etílico. Sua atividade persiste, embora sua eficácia seja reduzida por materiais orgânicos e altos valores de pH. A clorexidina foi aprovada para o uso em escovas cirúrgicas em meados dos anos 1970, e como colutório a 0,12%, no final da década de 1980. Para lavagem cirúrgica, as soluções de clorexidina a 4% são de ação rápida como os iodóforos e possuem a substantividade do hexaclorofeno (SOUZA,2007).

Substantividade (retentividade): é a capacidade de o produto permanecer retido no local de ação (superfície dental, gengiva e mucosa bucal), sendo liberado lentamente, evitando que seu efeito seja rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar. No tratamento de infecções causadas pela placa dental, a substantividade do agente antimicrobiano é muito importante, já que os agentes necessitam de um certo tempo de contato para inibir ou matar um micro-organismo (BLUCHER, 2007). Já a atividade do paraclorometaxilenol (PCMX) limita-se principalmente às bactérias Gram-positivas. Como possui baixa toxicidade e não tem atividade residual, vem sendo utilizado em produtos para lavagem das mãos (MURRAY, 2007).

Os metais pesados, em particular os mercuriais e compostos de prata, possuem uma longa história como agentes antimicrobianos. Os mercuriais orgânicos ainda são utilizados em alguns países como fumigantes, mas foram substituídos por substâncias mais eficazes e menos tóxicas na Medicina e na Odontologia (FDA, 2007).

Vários metais pesados podem ser utilizados como biocidas antissépticos, incluindo a prata, o mercúrio e o cobre. Quantidades muito pequenas de metais pesado, exercem atividade antimicrobiana com ação referida oligodinâmica. Este efeito é produzido pela ação dos íons do metal pesado sobre os micróbios. Quando os íons de metal se combinam com os grupos sulfidríla nas proteínas celulares, ocorre desnaturação (TORTORA, 2002).

A prata é usada como antisséptico em uma solução de nitrato de prata a 1%. Antigamente muitos estados dos EUA requeriam que os olhos dos recém-nascidos fossem tratados com algumas gotas de nitrato de prata, para prevenir uma infecção denominada oftalmia gonorreica neonatal (conjuntivite), que os lactentes poderiam contrair ao passar através do canal vaginal durante o parto (TORTORA, 2002). Entre os aldeídos, o glutaraldeído foi inicialmente proposto como agente antimicrobiano no

início da década de 60 sendo amplamente utilizado na odontologia e medicina como desinfetante de imersão (WHO, 2005). O glutaraldeído tem potente ação biocida, sendo bactericida, virucida, fungicida e esporicida. Sua atividade é devida à alquilação de grupos sulfidríla, hidroxila, carboxila e amino dos micro-organismos. A atividade esporicida se deve ao fato de o glutaraldeído reagir com a superfície do esporo, provocando o endurecimento das camadas externas e a morte do esporo (FDA, 2005). Devido à sua toxicidade, o glutaraldeído não é utilizado como antisséptico. O glutaraldeído tem atividade esporicida mais acentuada que o formaldeído. O uso do formaldeído como desinfetante vem sendo restringido em função da alta toxicidade (MURRAY, 2007).

IARC (*International Agency for Research on Cancer*), órgão da WHO (*World Health Organization* ou OMS - Organização Mundial de Saúde) publicou recentemente uma nota sobre o Formol, com resultados de um amplo estudo realizado por 26 cientistas de 10 países, onde concluiu que o formol é cancerígeno a humanos, através da detecção significativa de casos de câncer nasofaríngeo. O grupo também encontrou casos significativos de câncer nas fossas nasais e paranasais. Este estudo conduzido pelo IARC alerta aos segmentos/profissionais que fazem uso do formaldeído, a necessidade de cuidados especiais quanto à saúde ocupacional dos funcionários que o manuseiam, uma vez que os casos de câncer detectados são do trato respiratório (WHO, 2005).

Os alcoóis (etílico, etanol, isopropanol) possuem excelente atividade contra todos os grupos de micro-organismos, exceto os esporos, e possuem baixa toxicidade, embora tenham tendência a ressecar a superfície da pele, devido a remoção dos lipídios. Além disso, não possuem atividade residual e são inativados por matéria orgânica. Por conseguinte, é necessário limpar a superfície da pele antes da aplicação do álcool (MURRAY, 2007). Os alcoóis, em especial o etanol, são muito empregados como antissépticos. Os alcoóis etílico e isopropílico apresentam atividade antimicrobiana sobre bactérias em sua forma vegetativa, como os cocos Gram-positivos, as enterobactérias e bactérias Gram-negativas não fermentadoras da glicose, como as *Pseudomonas*. Atuam também sobre as micobactérias, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*, sobre alguns fungos e vírus lipofílicos. Não possuem atividade sobre esporos bacterianos e vírus hidrofílicos (TEIXEIRA, 2010). O mecanismo de ação dos alcoóis ainda não foi totalmente elucidado, sendo a desnaturação das proteínas do micro-organismo o mais provável. Na ausência de

água, as proteínas não são desnaturadas tão rapidamente quanto na sua presença, razão pela qual o etanol absoluto, um agente desidratante, é menos ativo do que suas soluções aquosas. (TEIXEIRA, 2010).

Nos estabelecimentos de saúde, os produtos à base de álcool etílico são indicados para desinfecção e descontaminação de artigos como ampolas e vidros, termômetros oral e retal, estetoscópios, cabos de otoscópios e laringoscópios, superfícies externas de equipamentos metálicos, macas, colchões e mesas de exames (TEIXEIRA, 2010) e os antissépticos à base deste princípio ativo são empregados para antisepsia das mãos. A concentração ideal de uso dos álcoois está entre 60 e 90% em volume, sendo a concentração recomendada em torno de 77% (Volume/Volume), o que corresponde a 70% em peso (NIEDERMAN, 1998).

O álcool está entre os antissépticos mais seguros, não só por possuir baixa toxicidade, mas também pelo seu efeito microbicida rápido e de fácil aplicação. Desta forma, provê rápida antisepsia em procedimentos como punções venosas e é excepcional para higienização das mãos. Quando comparada à lavagem simples com água e sabão, a aplicação de soluções alcoólicas para higienização das mãos oferece vantagens como: rapidez de aplicação, maior efeito microbicida e, por ser menos irritante para a pele, quando associado a emolientes, maior aceitabilidade pelos profissionais (NIEDERMAN, 1998).

Aplicações de álcool durante quinze segundos são eficazes na prevenção de transmissão de bactérias Gram-negativas encontradas nas mãos dos profissionais de saúde e o seu modo de aplicação simples reduz o tempo de higienização das mãos em até quatro vezes. Mesmo sem possuir ação contra formas esporuladas, em concentrações apropriadas, o álcool é um antisséptico de baixo custo, extremamente rápido e eficaz na redução do número de micro-organismos encontrados na pele (PIETSCH, 2001).

Osler apresentou, em 1995, estudo comparativo da eficácia dos diversos produtos comumente utilizados na prática do procedimento de degermação das mãos: sabão líquido, PVP-I degermante, clorexidina degermante, solução aquosa de PVP-I, álcool a 70% e clorexidina associada a álcool a 79%. Neste estudo, o álcool a 70% apresentou mais eficácia como bactericida, possui pouco ou nenhum efeito residual, se comparado a outros antissépticos. Quando associado a algum emoliente, o álcool tem sua atividade bactericida prolongada, por meio do

retardamento da sua evaporação, com diminuição também do ressecamento e da irritação provocadas na pele pelo uso repetido (OSLER, 1995).

A adição de iodo na proporção de 0,5 a 1,0% (p/v) a soluções a 70% em peso incrementa a atividade e acrescenta ação residual a estas soluções. O iodo penetra rapidamente através da parede celular dos micro-organismos. O efeito letal é atribuído à ruptura das estruturas protéicas e dos ácidos nucleicos e à interferência nos processos de síntese de proteínas (TEIXEIRA, 2010).

Atualmente, a Portaria nº 1.323 de 2011 (BRASIL, 2011) torna pública a proposta de resolução "Diretrizes para Disponibilização de Preparação Alcoólica para Fricção Antisséptica das Mãos pelos Serviços de Saúde". Essa portaria tem o objetivo de implementar e promover a higienização das mãos nos serviços de saúde por meio de preparações alcoólicas, previstas na Aliança Mundial para a segurança do paciente, com o intuito de prevenir e controlar as infecções relacionadas à assistência à saúde, visando à segurança do paciente e dos profissionais de saúde. Assim sendo, é de fundamental importância o controle da qualidade de produtos antissépticos, de forma a garantir a eficácia dos mesmos na prevenção das IRAs (BRASIL, 2011).

As formulações antissépticas comercializadas normalmente contém 1% (p/v) de iodo disponível em base alcoólica ou aquosa. Produtos para escovação cirúrgica das mãos contém geralmente 0.75% (p/v). Soluções diluídas possuem atividade mais rápida do que a das concentradas. A razão para tal ainda não está totalmente esclarecida, mas foi sugerido que a diluição do PVP-I resulta no enfraquecimento da ligação do iodo com o polímero carreador, aumentando a concentração de iodo na solução. Assim, o iodóforo deve ser adequadamente diluído para alcançar a atividade antimicrobiana (TEIXEIRA, 2010).

Os iodóforos constituem uma combinação entre o iodo e um agente solubilizante ou carreador. O complexo resultante fornece um reservatório de iodo que é liberado em pequenas quantidades na solução aquosa. O composto mais conhecido é o polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I). Os iodóforos são ativos para bactérias na forma vegetativa, incluindo micobactérias, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos e para esporos bacterianos (FDA, 2007).

Os iodóforos ou preparações de iodo são frequentemente utilizados com álcoois para a desinfecção da superfície da pele. Os iodóforos também são excelentes agentes antissépticos cutâneos, com faixa de atividade semelhante a do

álcool, possuem atividade residual limitada e são inativados pela matéria orgânica (MURRAY, 2007). ○

Os halogênios e as substâncias liberadoras de halogênios constituem alguns dos mais eficazes agentes microbianos utilizados para a desinfecção e antissepsia. Seu principal modo de ação parece depender da reação covalente do halogênio com sistemas enzimáticos-chave.

O cloro e o iodo são os compostos liberadores de halogênio mais utilizados e estudados para as mais diferentes aplicações. (DYCHDALA, 2001 e GOTTARDI, 2001).

O hipoclorito de sódio ou cálcio liberam facilmente o cloro ativo e, desta forma, possui uma ação muito rápida e eficaz. A mesma rapidez na reação, que lhe confere excelente eficácia antimicrobiana, também é responsável pela sua degradação e liberação no ar. Desta forma, o efeito residual do cloro gerado pelo hipoclorito é muito baixo, sendo estimado que em horas (2 a 4 horas) já não se tenha um nível bactericida significativo (WHO, 2005).

Já os cloros orgânicos, como o dicloroisocianurato e o tricloroisocianurato, são liberadores de cloro mais lentos e, desta forma, mantêm-se em solução por mais tempo, garantindo uma eficácia por período mais prolongado (WHO, 2005).

O dicloroisocianurato a concentrações elevadas é um esporicida, que depende do pH e do cloro disponível. Da mesma maneira que os compostos clorados, os iodados também apresentam rápida eficácia bactericida, fungicida, virucida e esporicida em baixas concentrações. Devido à toxicidade os compostos liberados de cloro não são utilizados atualmente para antissépticos (TEIXEIRA, 2010).

O fenol (ácido carbólico), uma substância usada primeiramente por Lister em sua sala de cirurgia, é raramente usado nos dias atuais como antisséptico ou desinfetante, pois irrita a pele e tem um odor desagradável. Frequentemente, é utilizado em pastilhas para a garganta devido ao seu efeito anestésico local, mas possui pouco efeito bactericida nas baixas concentrações usadas. Contudo, em concentração acima de 1%, o fenol tem um efeito antibacteriano significativo. Os derivados do fenol compostos fenólicos, contêm uma molécula de fenol que foi quimicamente alterada para reduzir suas qualidades irritantes ou aumentar sua atividade antibacteriana em combinação com um sabão ou detergente. Os compostos fenólicos exercem atividade antimicrobiana lesando as membranas plasmáticas, inativando as enzimas e desnaturando as proteínas (TORTORA, 2002).

Um dos compostos fenólicos mais utilizados é o triclosan, um fenoxifenol. O triclosan é ativo contra as bactérias, mas não contra outros micro-organismos. Trata-se de um agente antisséptico comum encontrado em sabões desodorantes (MURRAY,2007).

Os agentes de superfície mais amplamente usados são os detergentes iônicos, especificamente os compostos de quaternário amônio (quats). Sua capacidade de limpeza está relacionada à parte positivamente carregada de cátion da molécula. Os compostos de amônio quaternário são fortemente bactericidas contra as bactérias Gram-positivas e um pouco menos ativos contra as bactérias Gram-negativas (TORTORA, 2002).

Os quats também são fungicidas, amebicidas e viricidas contra vírus envelopados. Eles não matam os endosporos ou os bacilos da tuberculose. Seu modo de ação química é desconhecido, mas eles alteram a permeabilidade celular e causam a perda de constituintes citoplasmáticos essenciais, como o potássio (TORTORA, 2002).

1.2. Lavagem e Assepsia das mãos

Como já mencionado a higienização das mãos é uma medida básica para reduzir as infecções. Embora a ação seja simples, a não-observância entre os prestadores de assistência a saúde é um problema em todo o mundo. Seguindo recentes entendimentos da epidemiologia sobre a observância da higienização das mãos, novas abordagens têm demonstrado sua eficácia. O Desafio Global para a Segurança do Paciente 2005–2006: “Uma Assistência Limpa é Uma Assistência Mais Segura” está concentrando parte de sua atenção na melhoria dos padrões e das práticas de higienização das mãos na assistência a saúde, ajudando a implantar intervenções bem sucedidas (WHO, 2005).

Ainda hoje, esta etapa de lavagem das mãos é negligenciada pelos profissionais de saúde. Precedendo a colocação das luvas, uma lavagem com sabões degermantes realizada corretamente é primordial na diminuição do risco de infecções. Podem ser usados sabões detergentes comuns, mas o ideal é utilizarmos sabões degermantes de clorexidina 2% a 4% (WHO, 2005).

Também na área da medicina veterinária, vale ressaltar a importância do procedimento asséptico nas rotinas diárias, mostrando aos profissionais desta área da saúde a necessidade de se ter extremo cuidado com a utilização das técnicas assépticas, de modo, à prevenir contaminação pela microbiota da pele (PASTEL et. al., 2009).

Quanto ao aspecto de susceptibilidade aos antissépticos, apesar de ainda não ter sido evidenciada a ligação entre o uso de antissépticos tópicos com a emergência de resistência a antissépticos e antibióticos, o FDA recomendou explorar a possibilidade e a relevância de monitorar o uso de antissépticos, uma vez que a história tem demonstrado que organismos vivos tendem a se adaptar para sobreviver (JONES, 2004).

De acordo com as recomendações do CDC, na escolha do antisséptico ideal para degermação é importante, entre outros aspectos, avaliar a eficácia e a segurança do produto, com a aplicação de testes na instituição, quando devem ser seguidas as instruções do fabricante, para observar aspectos como odor, facilidade de uso e praticidade da embalagem (CDC, 2002).

O sucesso dos procedimentos de desinfecção e antissepsia depende de alguns fatores como: escolha apropriada do produto, de acordo com o objetivo do procedimento; preparo correto das soluções de uso; aplicação correta do produto; observação do tempo de contato; manipulação adequada após a desinfecção; e utilização de produtos eficazes, com a qualidade comprovada (TEIXEIRA, 2010).

O controle da qualidade dos desinfetantes e antissépticos envolve análises químicas, toxicológicas e microbiológicas do rótulo. A análise microbiológica tem como objetivo comprovar a eficácia do produto para a finalidade a que se destina. Para avaliar a eficácia de desinfetantes, metodologias específicas foram estabelecidas (exemplos: Association of Official Analytical Chemists - AOAC, European Standards - EN) e todas elas recomendam o uso de micro-organismos de referência. No caso dos antissépticos, apesar da inexistência de metodologia oficial para produtos pronto-uso, também são utilizadas cepas de referência nos ensaios (ROESSLER, 1983).

1.3. Métodos para a determinação da atividade antimicrobiana de produtos antissépticos

Existem descritos na literatura vários métodos *in vitro* para avaliação da eficácia de produtos destinados à antissepsia. Atualmente, o FDA não especifica uma metodologia para determinar a eficácia dos antissépticos, porém apresenta um protocolo analítico como recomendação. Ao contrário dos desinfetantes que apresentam padrões e critérios específicos e bem definidos, nos antissépticos não são realizadas as considerações para se testarem, *in vitro*, as diversas preparações dermatológicas antimicrobianas existentes. A categorização de medicamentos segundo o FDA como *Over-the-Counter* - OTC (medicamentos disponíveis para comercialização sem receita médica) é contraditória. Esta classifica cada classe de medicamentos em três categorias:

- Categoria I de OTC: o ingrediente é reconhecido geralmente como seguro e eficaz.
- Categoria II de OTC: não se reconhece geralmente como seguro e eficaz para o uso proposto.
- Categoria III de OTC: não há informação suficiente para se ter uma decisão final.

Inicialmente, supunha-se que a maioria dos medicamentos que não precisavam de prescrição e que já estavam no mercado seria colocada na categoria I dos OTCs. No entanto, todos os antissépticos de uso oral hospitalares foram colocados na categoria III (FDA,2005).

Existem vários métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos antissépticos, dentre eles o protocolo do FDA, que inclui ensaios frente a: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Na Europa, o Comitê Europeu de Normalização estabeleceu diversos métodos, sendo que a EN 1040 (EUROPEAN STANDARD, 2005) é preliminar e as demais são específicas para lavagem higiênica e escovação cirúrgica das mãos, desde preliminares até práticos (EN 14885), aplicáveis em sua maioria a produtos para serem utilizados diluídos (NORMA EN 14885, 2007)

A atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano frente a um determinado micro-organismo pode ser medida quantitativamente por métodos de diluição em

meio de cultura líquido ou sólido. O resultado final é influenciado de maneira significativa pela metodologia, que deve ser cuidadosamente controlada para se obterem resultados reprodutíveis (intra e interlaboratório).

Antissépticos são invasivos ao tecido cutâneo, visto que a assepsia é o conjunto das medidas que permitem manter um ser vivo ou um meio inerte, isento de bactérias, e a antisepsia refere-se à desinfecção de tecidos vivos com antissépticos (TORTORA, 2002 e FUNKE, 2006).

Caso esse procedimento seja realizado de forma incorreta ou se não for realizado, poderá se estabelecer uma microbiota com potencial patogênico originando um ciclo de infecção cruzada (DOSSA, 2003). É de valor ressaltar que, obviamente, uma assepsia realizada adequadamente, seguindo as normas de biossegurança, garante a prevenção de contaminação pela microbiota da pele, evitando, assim, que ocorram infecções cruzadas (CHAN et al., 1996). Essas infecções causadas por micro-organismos, mesmo que não patogênicos, são preocupantes, caso os pacientes estejam imunocomprometidos (DOSSA, 2003).

Assim sendo, como no Brasil são comercializados diferentes tipos de antissépticos, é importante avaliar a qualidade dos produtos por meio de testes laboratoriais.

1.3.1. TÉCNICA *TIME KILL*

Uma das técnicas disponíveis é conhecida como *Time Kill* (Tempo de Morte). Nesta, uma diluição do produto-teste é colocada em contato com uma população conhecida de micro-organismos por um tempo de exposição específico a uma determinada temperatura. A atividade do produto de ensaio é inibida em intervalos na amostragem especificada com uma técnica de neutralização (diluição, agentes químicos ou outras) adequada e os micro-organismos sobreviventes contados. Existem várias técnicas do tipo *Time Kill*.

O Guia Standard de Avaliação da Atividade Antimicrobiana cita um ensaio deste tipo. Trata-se do Procedimento de Estudo Teste ASTM E2315 *Time Kill*, no qual é avaliada a evolução de uma população de micro-organismos aeróbios num período de tempo especificado, quando testado frente a agentes antimicrobianos.

Outros autores também descrevem técnicas do tipo *Time Kill* como Hobson e Bolsen (1991) que se baseiam em recomendações do FDA. Há várias questões a considerar quando se realiza um estudo utilizando-se esses ensaios. Estas são importantes para a realização deste ensaio, a fim de garantir que determinadas variáveis possam ser padronizadas: seleção do organismo e crescimento, preparação do inóculo, tempos de amostragem, temperaturas. A principal finalidade desse teste é avaliar a redução da população microbiana de ensaio depois de ter sido exposto a produtos de teste.

Além da caracterização da amplitude do espectro de micro-organismos contra os quais o antimicrobiano é eficaz, o teste do tempo de morte também deve ser um dos critérios utilizados para caracterizar os produtos. O produto antisséptico é testado sobre o tempo e o número de micro-organismos sobreviventes determinados pela contagem direta. A curva de morte gerada deve mostrar a redução microbiana no intervalo de tempo do uso previsto do produto antimicrobiano. Em outras palavras, o objetivo desta metodologia é determinar, para uma dada concentração de cada produto, o tempo da exposição requerido para eliminar completamente o crescimento de cada micro-organismo especificado no teste, sendo considerado eficaz o antimicrobiano que exercer sua ação em até trinta minutos.

Segundo Orth e Sutton, o método de difusão em ágar pode ser utilizado como um parâmetro quantitativo da atividade antimicrobiana. O teste é feito ao longo do tempo e o número de sobreviventes é determinado por enumeração direta. A curva de morte gerada deve mostrar redução microbiana no período de tempo de utilização do produto (ORTH, 1993).

Outros métodos utilizados pela comunidade europeia, são baseadas na capacidade dos produtos para reduzir a população microbiana. Por esses protocolos, os produtos devem atender a eficácia padrão: redução de 99,999% na contagem de organismos no tempo estipulado pela técnica ou no tempo de contato recomendado pelo fabricante (AFNOR, 1998).

2 - JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O Brasil, ao contrário do que ocorre para os saneantes, não dispõe de uma legislação específica para os antissépticos e ainda não é adotada uma metodologia oficial. Desta forma, pouco se tem realizado em termos de monitoramento da qualidade dos antissépticos no que diz respeito à sua atividade antimicrobiana. Estudos iniciais, mostraram que os produtos analisados encontravam-se satisfatórios. Entretanto, foi utilizada somente uma pequena amostragem (FERREIRA, et al .1999).

Devido à importância das infecções hospitalares e da necessidade de medidas preventivas eficazes, a Portaria MS nº 2616/98 estabelece as diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares, incluindo, no seu Anexo V, uma relação de princípios ativos não recomendados para a finalidade de antisepsia. No Brasil são comercializados diferentes tipos de antissépticos e são ainda escassos os dados que comprovam a sua eficácia frente aos micro-organismos potencialmente patogênicos (BRASIL, 1998).

Considerando a missão do INCQS, que é a de contribuir para a prevenção torna-se imperativo passarmos a incluir a verificação da eficácia na avaliação da qualidade dos diversos antissépticos que estão disponíveis para comercialização. Por se tratar de produtos que fazem parte de programas de prevenção de infecção nos estabelecimentos de saúde, este estudo poderá auxiliar as ações de vigilância sanitária e saúde pública na elaboração de futuras legislações. Adicionalmente, considerando que nos ensaios desenvolvidos nesse estudo foram empregadas cepas de referência, consideramos que seria interessante também avaliar cepas de origem clínica. Dessa forma, podemos comparar os resultados obtidos com as diferentes linhagens no que diz respeito à susceptibilidade a esses biocidas.

3 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de produtos antissépticos à base de Iodopolividona, digluconato de clorhexidrina, cloreto de benzalcônico, triclosano, frente a micro-organismos de referência e clínicos através do estudo *in vitro*.

3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1- Determinar a eficácia dos produtos antissépticos, quanto à sua ação antimicrobiana *in vitro* por método *Time Kill*.

3.1.2- Determinar a susceptibilidade de cepas de origem clínica aos antissépticos em estudo.

3.1.3- Fornecer dados que permitam sugerir a adoção de um método oficial de avaliação *in vitro* dos antissépticos.

3.1.4- Adicionalmente, avaliar o procedimento de recuperação de micro-organismos sobreviventes utilizando semeadura em profundidade e filtração por membrana.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. AMOSTRAS DE ANTISSÉPTICOS

Foram analisadas vinte e cinco amostras comerciais das preparações à base de PVP-I sol. Degermante (Iodopolividona 1%), Digluconato de Clorhexidrina 0,2%, 1% e 4%, Nordexidina 0,5% e 1%, Cloreto de Benzalcônico 1%, Triclosano 0,2%, 0,5% e 1%. A solução de etanol a 70% serviu como controle positivo e a solução de etanol a 35% como controle negativo.

4.2. MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

Foram utilizados os seguintes micro-organismos de referência cedidos pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do INCQS/FIOCRZ: *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538), *Escherichia coli* INCQS 00032 (ATCC 11229), *Candida albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231). Foram incluídas também as cepas de origem clínica, cedidas pela CMRVS (TABELA 3)

Tabela 3. Cepas de origem clínica utilizadas no estudo

Nº CMRVS	Nº ORIGEM	MICRO- ORGANISMOS	ISOLAMENTO
P1	III AC1	<i>S. aureus</i>	Narina de profissional de saúde
P2	IV AG1	<i>S. aureus</i>	Narina de profissional de saúde
P3	IV AG2	<i>S. aureus</i>	Narina de profissional de saúde
P4	IV BG2	<i>S. aureus</i> (MARSA)	Mão de profissional de saúde
P5	V BH2	<i>P. aeruginosa</i>	Mão de profissional de saúde
P6	54710	<i>P. aeruginosa</i>	Int. quadril esq
P7	54732	<i>P. aeruginosa</i>	Fístula
P8	54733	<i>P. aeruginosa</i>	Parte Mole Coxa
P9	54835	<i>P. aeruginosa</i>	Urina
P10	17611	<i>P. aeruginosa</i>	Hemocultura

4.3. Preparação de inóculos

A partir de culturas de 24 horas em caldo caseína soja, foram preparadas suspensões em solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril, diluindo até se obter turbidez equivalente a 0,5-McFarland ou 10^8 UFC/mL.

Preparação das soluções de ensaio:

Os produtos antissépticos foram diluídos 1:10 e também foram testados sem diluição.

4.4. MÉTODO *TIME KILL*

Foi utilizada a técnica baseada na descrição de Hobson e Bolsen 1991.

A 99 mL da solução teste 1:10 (1mL da amostra + 9 mL do diluente) e também do produto sem diluição foi adicionado 1 ml da suspensão teste (micro-organismo a aproximadamente 10^8 UFC/mL). Imediatamente em cada tempo designado (0,3,6,9,12,15,20 e 30 minutos), foram retirados 3 mL da mistura (solução teste do antisséptico + suspensão do micro-organismo) inoculados na porção de 1 mL em tubos contendo caldo Mueller Hinton, em triplicata. Alíquotas de 1 mL foram retiradas dos tubos com caldo Mueller Hinton, sendo uma alíquota semeada em Agar Mueller Hinton fundido e conservado à temperatura de aproximadamente 50°C, semeado em profundidade e as outras duas alíquotas foram submetidas à filtração por membrana em filtro de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μ (Figura 3). A seguir as membranas foram colocadas sobre a superfície de Agar Mueller Hinton em placa.

Foi realizado o mesmo procedimento para todos tempos de contato. Os tubos e placas foram incubados à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24/48 horas. Após o período de incubação, foi verificado o crescimento microbiano.

Figura 2. Esquema de processamento de um produto antisséptico-através do método *Time Kill*.

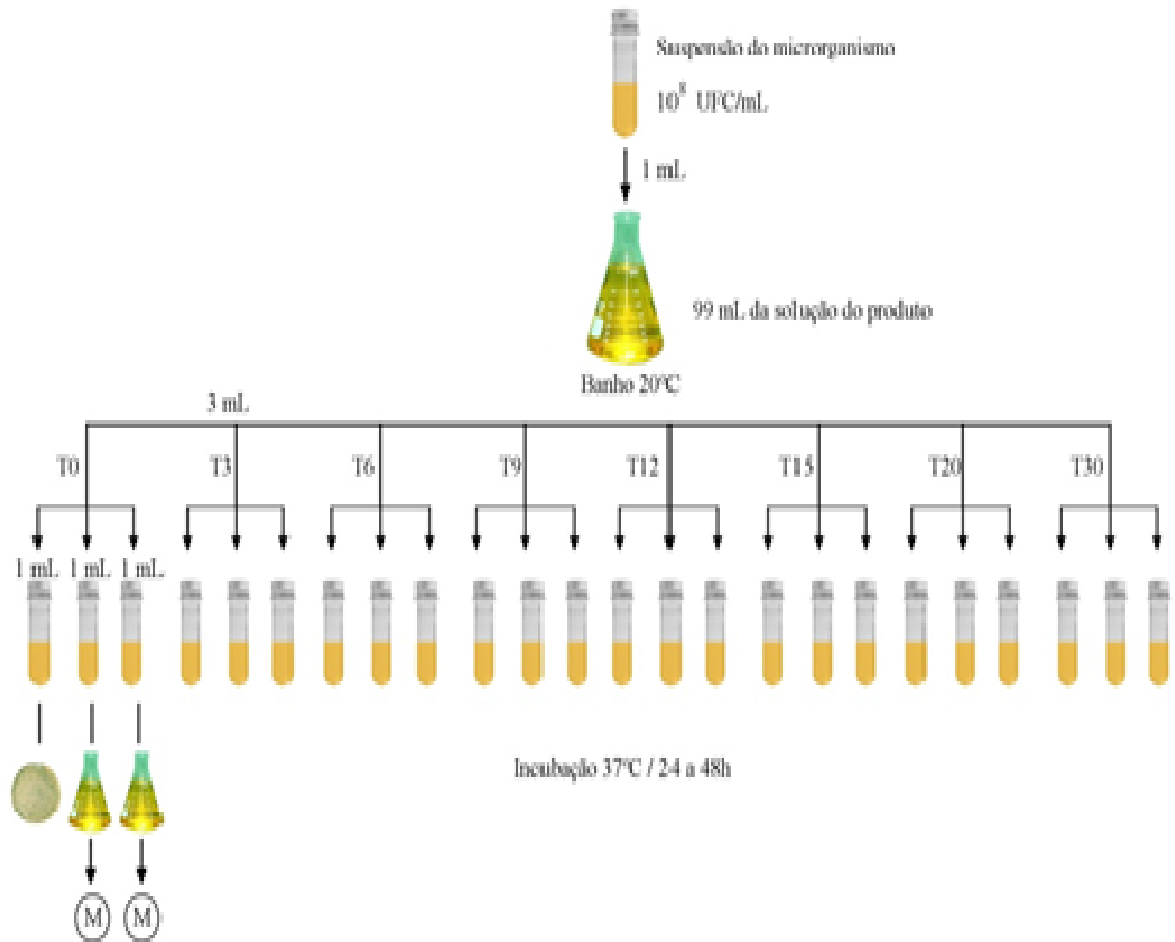
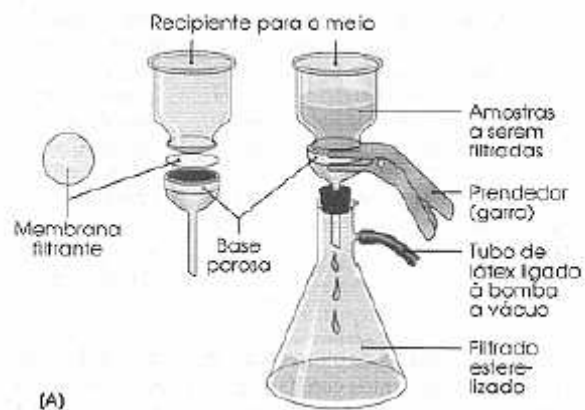


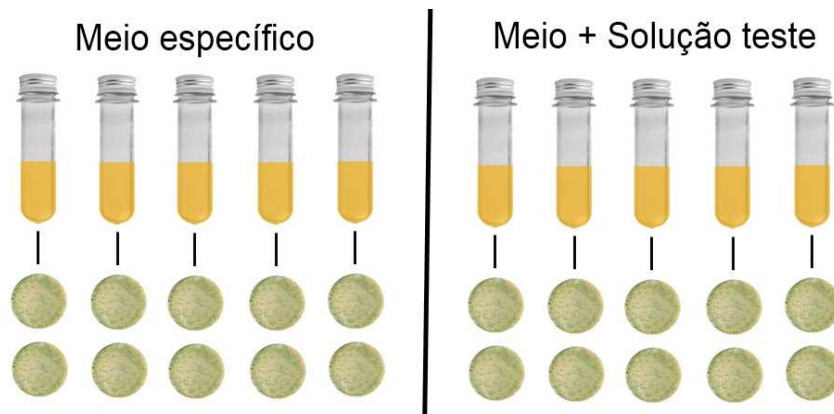
Figura 3 – Filtração por membrana.



4.5. Controle

Foi adicionado 1 mL dos micro-organismos teste da suspensão 0,5-McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL) diluído até 10^{-8} e foi adicionados em cinco tubos contendo a solução teste e caldo Mueller Hinton modificado (com 1mL de polisorbato 80 e 1 mL de lecitina de soja); imediatamente foi plaqueado metade do volume dos tubos no tempo zero (T_0) em duplicata e metade após 30 minutos (T_{30}) em duplicata. Em seguida foram incubados, e registrados os números de UFC/mL.

Figura 4. Esquema do controle



5. Critérios de aceitação:

Os produtos foram considerados antissépticos satisfatórios quando não ocorreu crescimento microbiano nos tempos de 3,6,9,12,15,20 e 30 minutos e os controles mostraram crescimento tanto na presença quanto na ausência da amostra.

6. RESULTADOS:

Foram analisadas 35 amostras à base de: álcool etílico 70% (A70%1, A70%2, A70%3, A70%4, A70%5); álcool etílico 35% (B35%1, B35%2, B35%3, B35%4, B35%5); PVP-I solução degermante 1% (C1%1, C1%2, C1%3, C1%4, C1%5); digluconato de clorhexidrina (D 0,2%1, D 0,2%2, D 1%3, D 1%4, D 4%5); nordexidina (E0,5%1, E0,5%2, E1%3, E1%4, E1%5); cloreto de benzalcônio (F1%1,F1%2,F1%3,F1%4,F1%5) e triclosano (G 0,2%1, G0,5% 2, G1% 3, G1%4, G1%5).

A Tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos antissépticos estudados, para as cepas de referência e as cepas clínicas.

Observa-se que as amostras à base de etanol a 35% foram insatisfatórias para todas as cepas e as de digluconato de clorexidina foram insatisfatórias para as cepas de micro-organismos de referência, porém, apresentaram-se satisfatórias frente às cepas de origem clínica. Assim, das 25 amostras de produtos comerciais estudadas, 20% foram insatisfatórias (Figura 5).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de produtos antissépticos frente a cepas de referência e cepas clínicas por técnica de *Time Kill*.

Amostras deantis-sépticos	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 INCQS00039	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 INCQS00025	<i>E. coli</i> ATCC 1122 INCQS900032	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 INCQS40006	Cepas Clínicas <i>S. aureus</i>	Cepas Clínicas <i>P. aeruginosa</i>	CONTROLES
	Direto/Diluido	Direto/Diluido	Direto/Diluido	Direto/Diluido	Direto/Diluido	Direto/Diluido	Direto/Diluido
A 70%1	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%2	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%3	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%4	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
A 70%5	S /	S /	S /	S /	S /	S /	+ /
B 35%1	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%2	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%3	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%4	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
B 35%5	I /	I /	I /	I /	I /	I /	+ /
C 1% 1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
C 1% 2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
C 1%3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
C 1% 4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
C 1%5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
D 0,2%1	I I	I I	I I	I I	S S	S S	+ +
D 0,2%2	I I	I I	I I	I I	S S	S S	+ +
D 1%3	I I	I I	I I	I I	S S	S S	+ +
D 1%4	I I	I I	I I	I I	S S	S S	+ +
D 4%5	I I	I I	I I	I I	S S	S S	+ +
E 0,5% 1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
E 0,5%2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
E 1%3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
E 1% 4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
E 1% 5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
F 1%1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
F 1%2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
F 1%3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
F 1%4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
F 1% 5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
G 0,2%1	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
G 0,5% 2	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
G 1% 3	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
G 1%4	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +
G 1%5	S S	S S	S S	S S	S S	S S	+ +

S- SATISFATÓRIO I- INSATISFATÓRIO + PRESENÇA DE CRESCIMENTO / NÃO REALIZADO

FIGURA.5. Porcentagem total das 25 amostras comerciais analisadas que apresentaram ausência de crescimento e presença de crescimento microbiano.



Os resultados obtidos mostraram que os produtos possuem atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados, com exceção das amostras à base de digluconato de clorexidina, que em todas as fases do teste apresentou crescimento microbiano, quando avaliadas frente às cepas de referência.

Os produtos à base de clorexidina e a solução de etanol a 35%, como foram insatisfatórias, proporcionaram uma avaliação da técnica de recuperação dos microorganismos sobreviventes através de semeadura em profundidade e por filtração em membrana. As Figuras: 6, 7 e 8 representam os resultados dos ensaios realizados com as cepas de *P. aeruginosa*.

Podemos observar que o método de semeadura em profundidade permitiu a recuperação de um número maior de micro-organismos.

FIGURA.6. Comparação entre as amostras não diluídas de Diclucionato de Clorhexidina (B) e álcool etílico a 35% (A), por semeadura em profundidade e filtração por membrana, que apresentaram presença de *P. aeruginosa*.

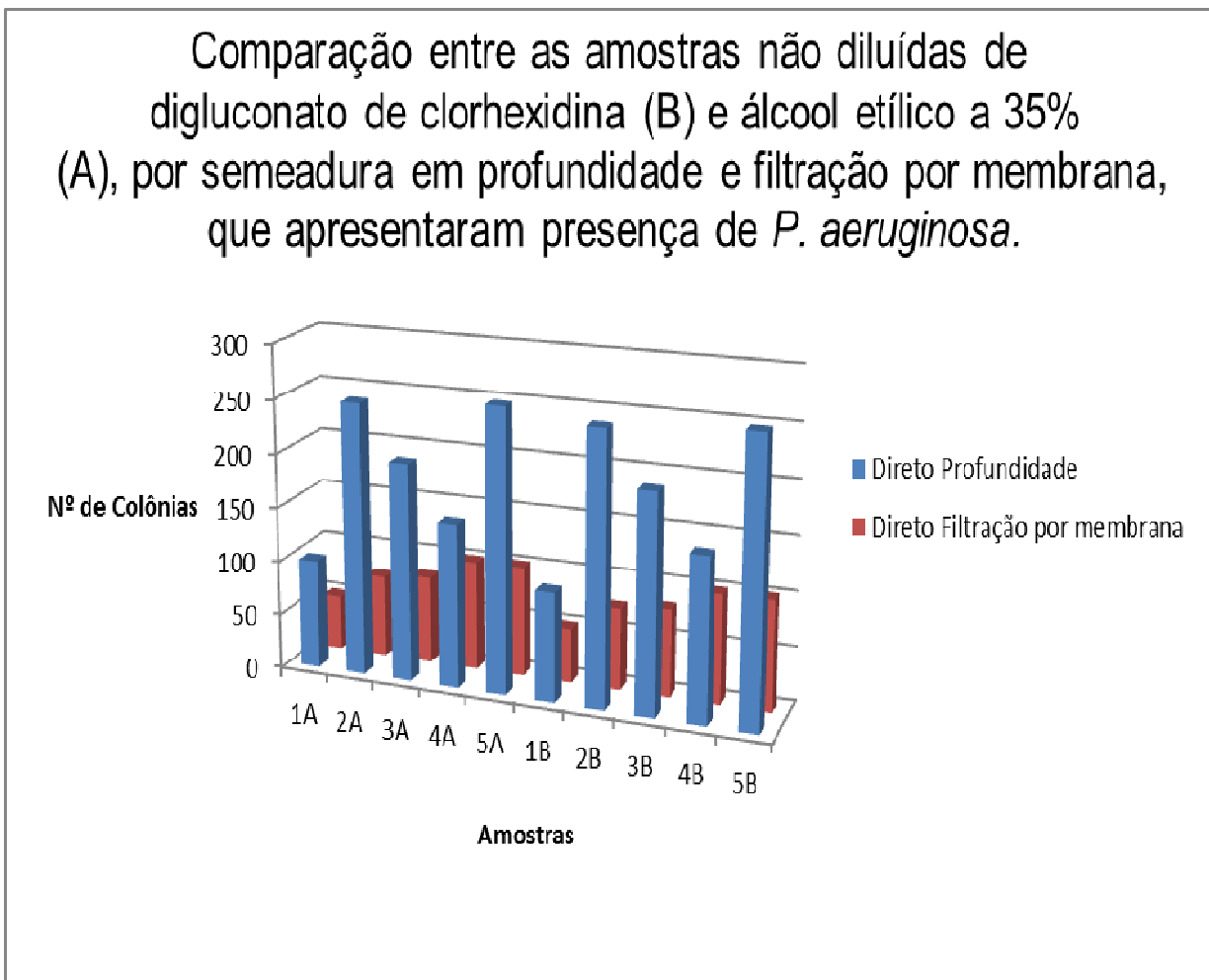


FIGURA.7. Comparação entre as amostras diluídas de Dicluconato de Clorhexidina (B) e álcool a 35% (A), semeadura em profundidade e filtração por membrana, que apresentaram presença de *P. aeruginosa*.

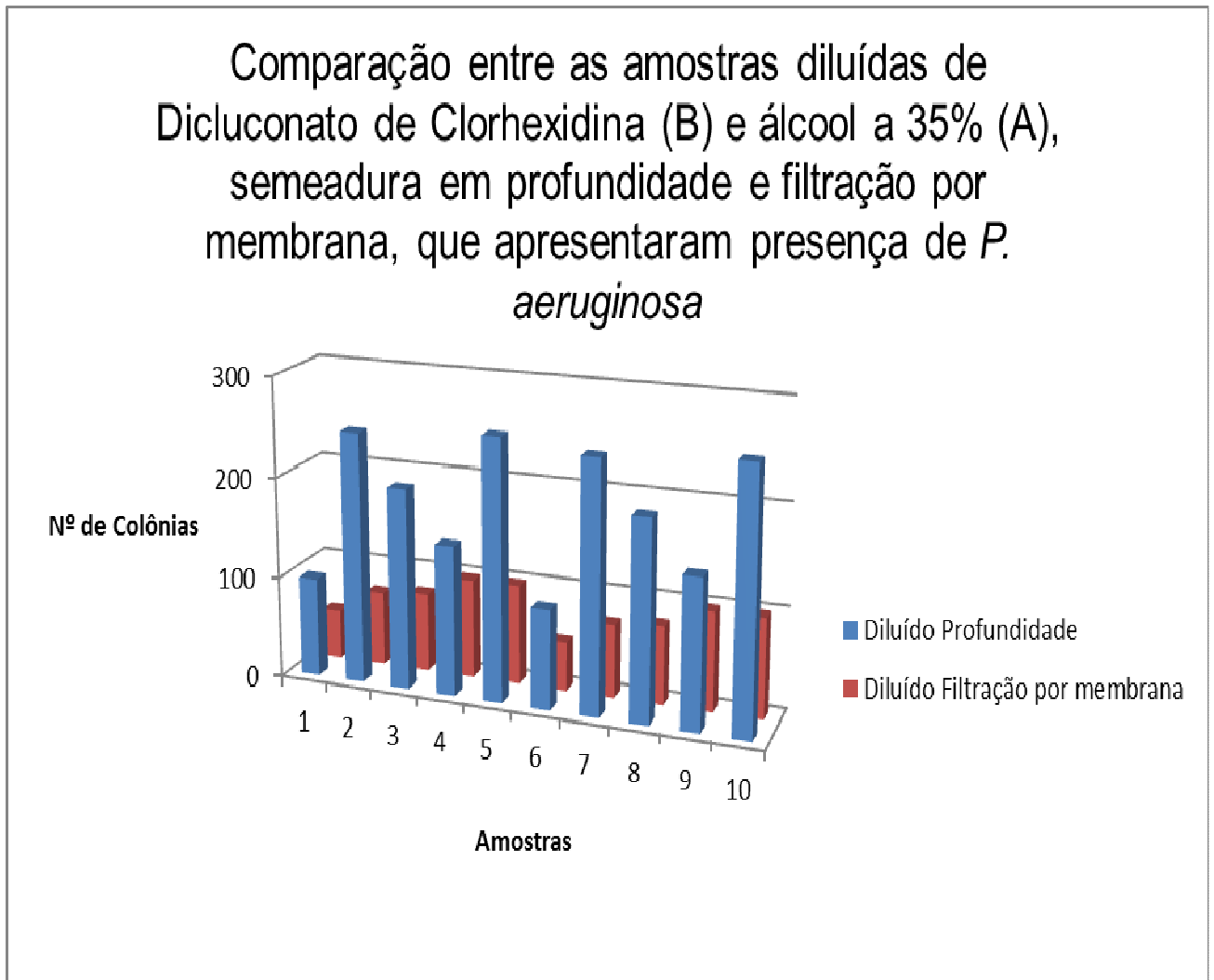
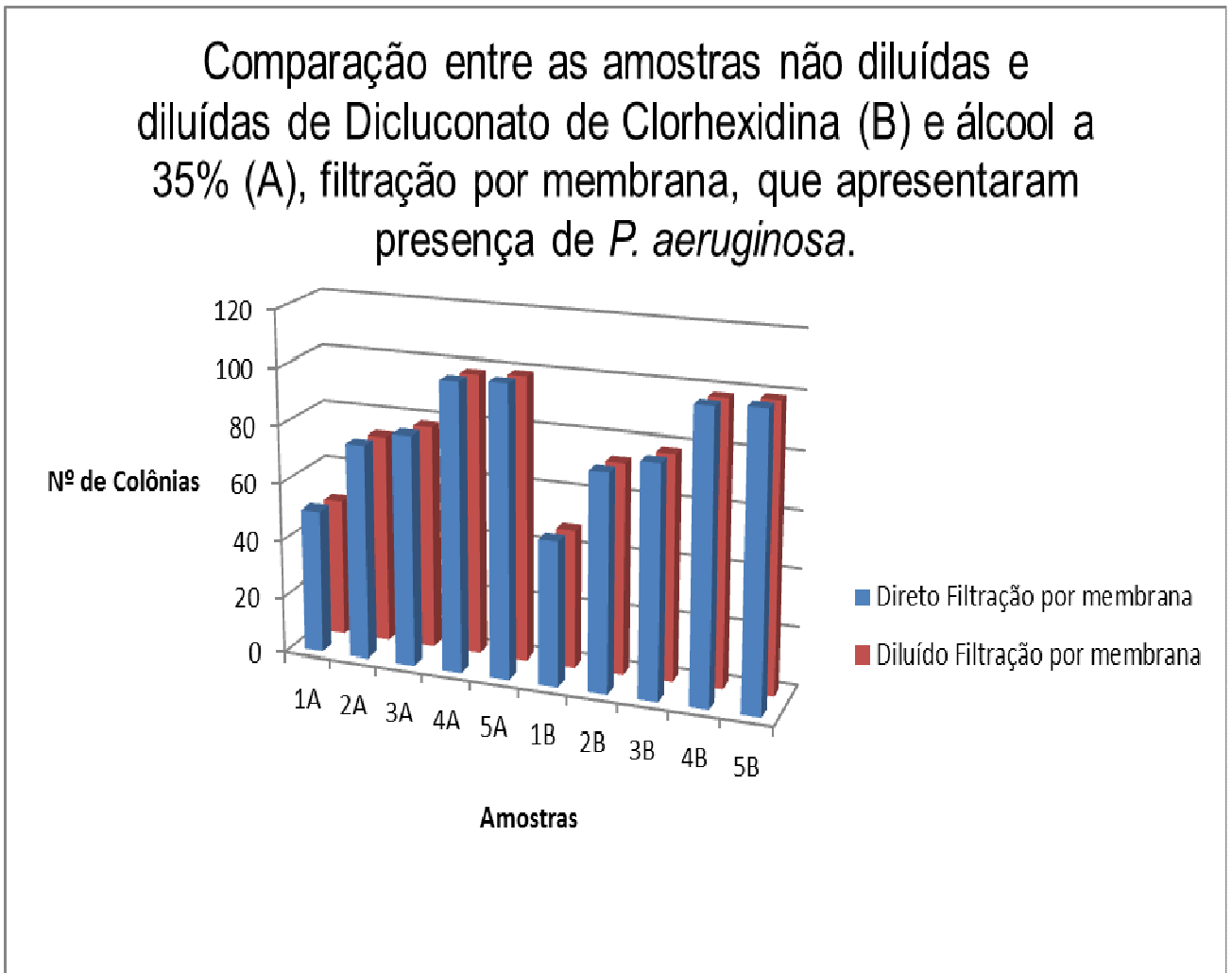


FIGURA.8. Comparação entre as amostras não diluídas e diluídas de Dicluconato de Clorhexidina (B) e álcool a 35% (A), filtração por membrana, que apresentaram presença de *P. aeruginosa*.



7. DISCUSSÃO

A lei 8080/90 (BRASIL, 1990) inclui no campo de atribuições do SUS, a execução de ações de Vigilância Sanitária, envolvendo o controle e a fiscalização de serviços, produtos e substâncias de interesse para a saúde. Entre os produtos de relevância, estão aqueles utilizados em procedimento de antisepsia.

A antisepsia da pele e de mucosas pode ser obtida pela aplicação de agentes biocidas, classificados como antissépticos e que tem extrema importância na higienização das mãos antes de procedimentos, como cirurgias, aplicação de injeções, punções, cateterismos e outros procedimentos invasivos, nos quais o rompimento das barreiras de defesa do indivíduo pode facilitar a introdução de patógenos no paciente com graves consequências.

Devido à importância das IRAS e da necessidade de medidas preventivas eficazes, a Portaria 2616/1998 (BRASIL, 1998) estabelece as diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares, incluindo, no seu Anexo V, uma relação de princípios ativos não recomendados para a finalidade de antisepsia, mas não há menção aos recomendados para uso em seres humanos. Em tal legislação também é possível constatar o fato da inexistência de uma regulamentação específica com uma metodologia para o controle da eficácia de antissépticos em geral.

Conforme já mencionado, diversos princípios ativos são utilizados na composição dos antissépticos.

O iodo, descoberto em 1812, foi considerado um dos antissépticos mais eficazes, sendo utilizado na prevenção de infecção e no tratamento de feridas. Em 1839, publicou-se o primeiro relato do seu uso específico em feridas (GOTTARDI, 2001). No entanto, sua desvantagem por causar toxicidade às células levou a novas formulações, como os iodóforos (CERQUEIRA, 1997) que se mostraram eficientes na ação da atividade antimicrobiana utilizando o teste *time kill*.

A clorexidina foi aprovada para o uso em escovas cirúrgicas em meados dos anos 1970, e como colutório a 0,12%, no final da década de 1980. Para lavagem cirúrgica, as soluções de clorexidina a 4% são de ação rápida, como os iodóforos, e possuem a substantividade do hexaclorofeno. No entanto, hoje já se encontram produtos mais eficientes. Na Europa, são utilizadas soluções de clorexidina a 0,2%

como colutórios orais desde a década de 1980. A eficácia da clorexidina nos colutórios resulta principalmente da sua substantividade inferior a outros princípios ativos, não sendo tão eficazes clinicamente quanto à solução mais forte a 4%, porém com uma redução significativa na incidência de efeitos colaterais (FDA, 2007). Não há relatos da eficácia deste produto como solução tópica até o momento. Murray (2007) confirma que, apesar da clorexidina possuir ampla atividade antimicrobiana, a inativação dos micro-organismos ocorre muito mais lentamente quando comparada com o álcool, não sendo considerada eficiente para inativar micro-organismos Gram-negativos, mas apresentando uma maior eficácia contra bactérias Gram-positivas. Por apresentar baixa toxicidade e não possuir atividade residual, tem sido muito empregada para lavagens das mãos e como colutório oral.

Os álcoois, em particular o etanol e isopropanol, foram utilizados durante muitos anos como agentes antimicrobianos e como transportadores para outros antimicrobianos insolúveis em água, como o iodo e o fenol. O álcool também está entre os antissépticos mais seguros, não só por possuir baixa toxicidade, mas também pelo seu efeito microbicida rápido e por ser de fácil aplicação. Desta forma, provê rápida antissepsia em procedimentos como punções venosas e é excepcional para higienização das mãos (SANTOS, 2002).

As concentrações atualmente utilizadas na prática dos serviços de assistência à saúde são substancialmente maiores que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os micro-organismos normalmente encontrados. Assim sendo, a contaminação de soluções antissépticas não está sendo, até o momento, associada à redução de susceptibilidade dos micro-organismos. Portanto, qualquer que seja a molécula utilizada, os valores de seu CIM devem ser conhecidos para permitir que a dosagem correta seja inferida para as necessidades de seu uso, e para que seja diluída ou inativada adequadamente antes de seu descarte. Pelo mesmo motivo, não é interessante que excesso de biocida seja utilizado, porém a dosagem não deve estar abaixo do CIM (PADOVANI, 2008).

Para que haja o emprego correto dos antissépticos, do ponto de vista de custo e qualidade, é necessário que os produtos adquiridos tenham registro na Anvisa, venham acompanhados certificado de análise do fabricante e que na utilização o estabelecimento disponha de um responsável farmacêutico para a sua avaliação, aquisição e manipulação. Ainda, o envolvimento de toda a sociedade, na promoção da educação e conscientização da comunidade leiga e especializada é

fundamental para a prevenção de acidentes causados pelo uso inadequado dos antissépticos como o álcool no ambiente domiciliar (SANTOS, 2002).

Ainda é possível afirmar que hoje, como no tempo de Semmelweis, as mãos são o principal veículo de transmissão de micro-organismos no ambiente hospitalar (ANVISA, 2000). A higienização das mãos é, isoladamente, a ação mais importante para a prevenção e controle das infecções hospitalares (BRASIL, 1998).

Como já referido por Richards (1965), atualmente a literatura existente sobre agentes químicos antimicrobianos utilizados em antissepsia ainda se apresenta confusa e contraditória, principalmente pela falta de padronização dos métodos de ensaio e conseqüentemente pela diversidade de condições experimentais (RICHARDS, 1965; MURRAY, 2007; FDA, 2007).

Considerando a missão do INCQS, que é a de contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária é importante, como já ressaltado, o estabelecimento de métodos que possam avaliar a qualidade dos produtos de interesse para a saúde, incluindo os antissépticos.

O presente estudo trata da avaliação da atividade antimicrobiana em produtos antissépticos, utilizando o método tipo *Time Kill* descrito por Hobson e Bolsen em 1991.

A neutralização é uma etapa fundamental, que valida o teste, considerando que na execução das técnicas, quantidades de substâncias de produtos biocidas como os antissépticos, por exemplo, podem ser carregadas para o meio de cultura, ocasionando resultado falso positivo, em função da atividade inibitória de certos produtos. Este processo, é frequentemente, realizado por diluição ou associação a agentes neutralizantes ou inativantes. Tais agentes geralmente contêm fosfolípidos como lecitina de soja e tensoativos não iônicos, como o polissorbatato (Tween 80) (ROMÃO, 1985).

Através dos resultados obtidos foi possível verificar que, das 25 amostras comerciais avaliadas, apenas aquelas à base de clorexidina apresentaram insatisfatoriedade para o teste, ou seja, não foram capazes de destruir os micro-organismos de referência em nenhuma das concentrações e em nenhum dos tempos de contato determinados pelo procedimento.

O objetivo principal do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das preparações antissépticas à base de álcool etílico 70%, iodo, PVP-I solução degermante, digluconato de clorhexidina, nordexidina, cloreto de benzalcônio e triclosano. As amostras foram avaliadas frente aos micro-organismos de referência *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538), *Escherichia coli* INCQS 00032 (ATCC 11229), *Candida albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231), e frente às cepas de origem clínica, com os produtos sem diluição e diluídos nos intervalos de tempo de 0 a 30 minutos.

Adicionalmente, foi avaliado o procedimento de recuperação dos micro-organismos sobreviventes, no caso das amostras insatisfatórias. Assim, foram utilizadas as técnicas de semeadura em profundidade e filtração por membrana. Com base nos dados obtidos, observamos que a técnica por filtração por membrana mostrou-se menos sensível, uma vez que o número de colônias foi menor do que o obtido pela semeadura em profundidade, esta bem mais sensível, possibilitando a detecção de um número superior de colônias.

O estudo mostrou que os antissépticos à base de digluconato de clorexidina não foram capazes de inibir o crescimento da *P. aeruginosa* ATCC 15442, INCQS 00025 e também dos outros micro-organismos (com exceção daqueles de origem clínica, que não apresentaram contagem). Esse dado é preocupante por se tratar de produto utilizado em ambiente hospitalar e pelo fato de a *P. aeruginosa* ser um dos patógenos mais frequentes em processos infecciosos de ambiente hospitalar (PIRES, 2009). Os demais produtos antissépticos apresentaram atividade antimicrobiana nos tempos de contato empregados frente às cepas de referência e às cepas clínicas.

Os estudos com digluconato de clorexidina mostram que esse antisséptico foi muito utilizado na escovação cirúrgica nos anos 1970 e como colutório na década de 1980, mas as pesquisas não abordam estudos da atividade antimicrobiana deste produto utilizando o teste *Time Kill* analisado no presente estudo. Alguns trabalhos descrevem a contaminação destas soluções, como fonte comprovada de surtos hospitalares. Ao contrário do que foi observado com o digluconato de clorexidina, os outros antissépticos testados foram capazes de inibir o crescimento de todos os micro-organismos com exceção do álcool 35% utilizado como controle negativo.

Ressalta-se a atividade dos produtos antissépticos, inclusive em sua menor concentração 0,1%, como foi também observado por Reis e colaboradores (2011),

que analisaram antissépticos à base de álcool etílico a 70% e PVPI e obtiveram resultados semelhantes aos das amostras analisadas no presente estudo, utilizando as cepas de referência (REIS et al, 2011).

Koburger e colaboradores (2010), encontraram resultados diferentes dos mostrados no presente trabalho, em relação à clorexidina. Os mesmos realizaram um estudo comparando de forma padronizada a atividade de antissépticos à base de triclosan, PVP-I, cloridrato de octanidina, polihexadina e digluconato de clorexidina determinando as concentrações mínimas inibitórias e bactericidas e a eficácia através das normas europeias EN 1040 e EN 1275. Dentre os resultados obtidos, concluíram que para clorexidina a concentração eficaz considerando os micro-organismos teste *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* no tempo de contato de 5 minutos foi de 1000 mg/L, e no tempo 10 minutos foi de 500 mg/mL, enquanto para o PVP-I nestes mesmos tempos de contato foi de 250 mg/L. concluíram ainda que o produto menos eficaz foi aquele à base de triclosan. Vale ressaltar que os autores consideraram efeitos de redução da carga microbiana e não ausência de crescimento como na presente pesquisa (KOBURGER et al, 2010).

Atayese et al. (2010), estudando a atividade de antissépticos através de um tipo de *Time Kill* testado frente à cepa de *Candida albicans*, mostraram que tais produtos foram menos efetivos frente a este micro-organismo (ATAYESE et al. 2010).

Entre todas as amostras de antissépticos testadas no presente estudo, apenas aquelas à base de clorexidina foi insatisfatória quanto à inativação de micro-organismos considerados patológicos. Apesar de se tratar de um número baixo de amostras insatisfatórias, essa falha poderia ter graves consequências em um hospital, onde a assepsia é fator primordial para garantir a segurança de seus procedimentos de rotina. Entretanto, foi observado que as cepas clínicas mostraram-se susceptíveis aos produtos.

De um modo geral, um agente antimicrobiano deve apresentar as condições ideais para que tenha um amplo espectro de ação: ser estável em solução; ser compatível química e biologicamente com outros ingredientes da formulação; ser bem tolerante para o tecido humano; não apresentar toxicidade em caso de um emprego prolongado. Na realidade, de acordo com Foster (1965), nenhum dos antissépticos usuais reúne todas estas características, fato que deve ser

cuidadosamente avaliado juntamente com as características antimicrobianas destes produtos.

De acordo com Bean (1967), a maioria dos micro-organismos cresce e se multiplica na fase aquosa dos produtos e, portanto, estes devem apresentar uma concentração letal dos agentes antimicrobianos nesta fase.

Vários trabalhos chamam atenção para os antissépticos utilizados nas lesões cutâneas que devem combater tanto a microbiota transitória quanto a permanente, que podem ser constituídas por várias bactérias patogênicas, incluindo aquelas que comumente causam infecções hospitalares, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* etc.

Muitos antissépticos se mostram mais eficazes em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas, embora esta diferença não seja tão clara como na atividade dos antibióticos. Um grupo de bactérias Gram-negativas, do gênero *Pseudomonas*, é de especial interesse (KONEMAN, 2001; LACZ, 1984; MURRAY et al., 2007), devido à sua alta resistência aos antimicrobianos, às bactérias do Gênero *Pseudomonas*, que também são comuns no ambiente e muito resistentes a diversos produtos químicos, podendo até mesmo crescer em alguns antissépticos (BALOWS, 1991), ou não ser susceptível, como foi o caso do digluconato de clorexidina, o que foi comprovado neste trabalho.

Adde (1991) e Souza (2007) recomendam o uso da clorexidina contra a *P. aeruginosa* em ginecologia e obstetrícia a 0,5% ou como colutório oral. No entanto, deve haver cautela na utilização de tais preparações, pois, como revelou o presente estudo, as cepas clínicas foram destruídas, mas as bactérias de referência não o foram. Alguns estudos descrevem a contaminação destas soluções, inclusive como fontes comprovadas de surtos hospitalares (MARRIE, COSTERTON, 1981; GOETZ, 1989; ANDERSON et. al., 1990; ARCHIBALD, 1997; BONALLEGUE, MZOUGH, WEILL, 2004). Esses surtos podem estar associados ao mau uso dos produtos antissépticos hospitalares ou mesmo à omissão da utilização destes produtos, além da lavagem inadequada das mãos ou da inexistência desse procedimento por parte dos profissionais de saúde, antes e após a manipulação de pacientes debilitados e imunocomprometidos.

Por outro lado, para a escolha de um antisséptico que atenda a todas as necessidades, é preciso conhecer as características de cada um para que se

tenham subsídios suficientes para a escolha correta do produto, evitando custos excessivos e uso inadequado (TEIXEIRA, 2010).

Por se tratar de produtos que fazem parte de programas de controle e prevenção de infecções nos estabelecimentos de saúde, estes dados são de grande relevância. Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, esta realidade pode ser mudada com a adição de novos dados às legislações que permitam a análise desses produtos.

Consideramos que o presente estudo é de grande relevância, visto que a maioria das publicações relacionadas à atividade de antissépticos discute apenas a possível contaminação desses produtos, associando esse fato ao aparecimento de surtos em estabelecimentos de saúde. Na prática assistencial, ainda são escassos os estudos sobre a qualidade e a atividade microbiana dos antissépticos disponíveis no mercado.

As análises realizadas nos permitem inferir que o teste *Time Kill* descrito por Hobson e Bolsen (1991) foi adequado para o estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos. Os resultados deste estudo trazem respostas para a prática do uso de antissépticos, que até o momento tem se mostrado apenas parcialmente eficaz do ponto de vista científico. Além disso, o presente trabalho aponta para a gravidade da inexistência de uma legislação específica. Podemos, portanto, afirmar que a utilização dos produtos estudados no processo de antissepsia é prática, segura, agregando facilidades e economia nas instituições de saúde.

8. CONCLUSÕES:

- Os produtos à base de álcool etílico, PVP-I solução degermante iodopolividona, nordexidina, cloreto de benzalcônico e triclosano, mostraram resultado satisfatório frente às cepas clínicas e de referência.
- O digluconato de clorexidrina, apesar de ser menos tóxico, não mostrou atividade frente a *P. aeruginosa* e aos outros micro-organismos de referência. Concluimos portanto que esse produto deve ser utilizado com cautela e estudos adicionais são necessários, apesar de terem se mostrado eficazes para cepas clínicas.
- A técnica de semeadura em profundidade mostrou-se mais sensível do que a de filtração em membrana para recuperação de micro-organismos sobreviventes após o contato com os antissépticos.
- Nosso estudo poderá auxiliar as ações de vigilância sanitária e saúde pública na elaboração de futuras legislações, uma vez que esses produtos são encontrados no comércio, mas não estão submetidos a nenhuma legislação específica e não existiam dados suficientes, até o momento, que atestassem sua real eficácia.

9. Meios de Cultura

9.1. ágar Mueller- Hinton:

Fórmula comum (w/v):

Infusão de carne..... 30,0%

Caseína hidrolisada..... 1,75%

Aamido.....0,15%

Ágar.....1,7%

pH 7,3 ± 0,1 a 25 ° C. Dissolver completamente em 1 litro de água destilada.

Autoclavagem 15min 121°C.

9.2. Caldo Mueller- Hinton:

Infusão de carne bovina.....300,0

Caseína Hidrolisada.....17,5

Amido.....1,5

pH 7,3 ± 0,1 a 25 ° C. Dissolver completamente em 1 litro de água destilada.

Autoclavagem 15min 121°C.

9.3. caldo Mueller Hinton modificado:

Infusão de carne bovina.....300,0

Caseína Hidrolisada.....17,5

Amido.....1,5

pH 7,3 ± 0,1 a 25 ° C. Dissolver completamente em 1 litro de água destilada.

Autoclavagem 15min 121°C. **(Mueller Hinton com Tween 80 a 1% e Lecitina de soja a 1%)**

9.4. Ágar Caseína-soja:

Digesto pancreático de caseína 15,0 g

Digesto pancreático de farinha de soja..... 5,0 g

Cloreto de sódio..... 5,0 g

Ágar..... 15,0 g

Água purificada 1000 mL

Suspender a mistura em 1 litro de água purificada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

9.5. Ágar Sabouraud-dextrose – 4%:

Dextrose..... 40g

Mistura de partes iguais de caseína tratada por suco pancreático e digesto péptico de tecido animal10 g

Ágar..... 15 g

Água purificada..... 1000 mL

Suspender a mistura em 1 litro de água purificada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. pH final: $5,6 \pm 0,2$ a 25°C

Para o preparo a partir do meio desidratado, obedecer a recomendação do fabricante.

REFERÊNCIA

ADDE, C. A, et al. Vigilância em Saúde: assistência e uso dos anti-sépticos e desinfetantes em odontologia, **Técnica em Saúde Bucal**. Santos, v. Único, 1991, 31 p.

AFNOR. **Normes & Réglementation**: Antiseptiques et Disinfectants. Paris: AFNOR, 1998.

ANDERSON, RL. et al. Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. **Appl Environ Microbiol**. 1990; 56: 3598-600.

ANVISA. **Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar**: Caderno B, Métodos de Proteção Anti-infecciosa. Brasília: Ed. MS, 2000.

ARCHIBALD L. K., et. al. *Serratia marcescens*. Outbreak associated with extrinsic contamination of 1% chloroxylenol soap. **Infect Control Hosp. Epidemiol**, 1997, 18(10): 704-9.

ASTM. **ASTM E 2315-03 (2008)**: Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. Philadelphia, 2008.

ATAYESE, et al. Comparative Study of the Antimicrobial activity of Chlorinated and Non-chlorinated Antiseptics against *C. albicans*, Department of Microbiology, College of Natural Sciences, **National Hortucultura Research Institute**, Ibadan, p.M.B. 5432, Jericho, Idi-Ishin, Ibadan, Nigeria. 2010

BALOWS, A. et al. **Manual of clinical microbiology** 5. ed. Washington, D.C: American Society of Microbiology, 1991. p. il.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de Setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1.

BRASIL, "Diretrizes para Disponibilização de Preparação Alcoólica para Fricção Antisséptica das Mãos pelos Serviços de Saúde". **Ministério da Saúde**. Portaria Nº 1.323, de 8 de junho de 2011

BATISTA, R.E.A, ANVISA, módulo 1, **Legislação e Criação de Um, Programa de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar** (infecção relacionada à assistência à saúde - IRAs) São Paulo – SP, 2004 - versão 1.0.

BLOCK, S.S. **Editor Disinfection, Sterilization, And Preservation**. 5th. ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.

BLUCHER, AG V. **Dispositivos para liberação lenta de clorexidina para prevenção de periimplantite** [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia; 2007.

BEAN, H. S. The microbiology of topical preparations in pharmaceutical practice. 2. **Pharmaceutical aspects**. Pharm. J. 199: 289 – 292, 1967.

BRASIL, Controle de Infecção Hospitalar. Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil [periódico online]**, Poder Executivo, 13 de maio de 1998 [citado em 09 set 2010]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616_98.htm

BONALLEGUE, O.; MZOUGH, R.; J. F. Outbreak of *Pseudomonas putida* bacteremia in a neonatal intensive care unit. **Hospital Infection** 2004; 57: 88-91.

BROOKS, Geo F. et al. Jawetz, Melnick e Adelberg. **microbiologia médica**. 24. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2009.

CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R., PELCZAR, M.J. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed., vol. 2. São Paulo: Ed. Makron Books, 1996.

CDC – **Guideline for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections**. MMWR, Atlanta, v. 51, n. RR-10, p. 1-26, 2002.

CARRATALA J, Mykietiuik A, Fernandez-Sabe N, et al. Health care-associated pneumonia requiring hospital admission: epidemiology, antibiotic therapy and clinical outcomes. **Arch Intern Med**. v.167, p. 1393–1399, 2007.

CERQUEIRA, M. C. M. Anti-sepsia: princípios gerais e anti-sépticos. In: RODRIGUES, E. A. C. et al. **Infecções Hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997.

CRABTREE, B.F.; MILLER, W.L. Using Codes and Code Manuals: a Template Organizing Style of Interpretation. In: _____ . **Doing Qualitative Research in Primary Care: Multiple Strategies**. 2. ed. Newbury Park, CA: Sage Publications, 1999. p. 163-177.

DEFRANCES, C.J.; HALL, M.J. National Hospital Discharge Survey. **Adv. Data**. v. 385, p. 1–20, 2007.

DYCHDALA, G.R. Chlorine and chlorine compounds. In: Block S. S. (Ed.) **Disinfection, sterilization, and preservation**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 135-157.

DOSSA, D.O.N. et al. Avaliação microbiológica de diferentes antissépticos utilizados em ambiente hospitalar de Cruz Alta - RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis, 2003, **Resumo**. [s.l.,s.n], 2003.

EUROPEAN STANDARD, Chemical disinfectants and antiseptics -**Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants** – Test method and requirements. EN1040:2005

EDMONT, M.B.; WENZEL, R.P.; PASCULLE, A.W. Vancomycin resistant staphylococcus aureus: perspectives on measures needed for Control. **Ann Intern Med.** v.124, p. 329-34, 1996.

FERREIRA, J.A.B., SILVA, Z. e ROMÃO, C.M. A., Estudo da Atividade Antimicrobiana “In Vitro” de Produtos Anti-sépticos. **XX Congresso Brasileiro de Microbiologia.** Ministério da Saúde. Centro de Convenções - Salvador - BA; 24 a 28 de outubro de 1999, MH-273, pág. 119.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of Federal Regulations**, Title 21, Food and Drugs, Part. 54: Good Clinical Practices;1999b

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Federal Register**, Volume 72, Number 238, via the Government Printing Office, Wednesday, Pages 70599-70601, December, 2007.

FOSTER J.S.H. **Preservation of Ophthalmic Solutions, Manufacturing Chemist and Aerosol News**, Part II, 43-46, 1965.

FUNKE, BR, Tortora, G. J, Case, CL. Microbiologia: **Infecções adquiridas em hospitais (nosocomiais)**. 8nd ed. Porto Alegre: Artmed: 2006. p.422-5.

GOETZ, A; Muder, RR. *Pseudomonas cepacia* infections associated with use of povidone-iodine in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis infect control. **Hosp. Epidemiol.** **1989**;10(10): 447-9.

GOMES, J.M.A.; ESCALANTE, R.D. Assepsia e Antissepsia: Mitos e Verdades. **Curso de Medicina da Universidade de Fortaleza.** Baseado no Dicionário de Termos da ANVISA. 2002.

GOTTARDI, W. Iodine and Iodine Compounds. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. pp. 159–183.

HANBERGER, H; et al. Antibiotic Susceptibility among Aerobic Gram-negative Bacilli in intensive Care Units in 5 European Countries. **Jornal of the American Medical Association**, v. 281, n. 1, p. 67-71, 1999.

HERON M. Deaths: leading causes for 2004. **Natl Vital Stat Rep.** v. 56, p. 1-96, 2007.

HOBSON D.W.; BOLSEN, K., Methods of Testing Oral and Topical Antiseptics and Antimicrobials. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, Sterilization, and Preservation.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1991. p. 1329-1358.

IARC. IARC classifies formaldehyde as carcinogenic to humans. **International Agency for Research on Cancer Press Release**. n. 153, 15 June 2004.

JONES, R. N.; HUYNH, H. K.; BIEDENBACH, D. J. Activities of doripenem (S-4661) against drug-resistant clinical pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, p. 3136–3140, 2004.

KOBURGER, T., Hubner N.-O, Braun, M., Siebert, J., and Kramer A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-Iodine, octanidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconato. **J. Antimicro Chemother** 2010, 65: 1712-1719.

KOLLEF, M.H. et al. Health care-associated pneumonia (HCAP): a critical appraisal to improve identification, management, and outcomes – proceedings of the HCAP summit. **Clin Infect Dis**. v.46, p. S296, 2008.

KOLLEFF, M.H. et al. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. **Chest**. v.128, p. 3854–3862, 2005.

KONEMAN, Elmer W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5 ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 87-90.

LACZ, C. S.; MARTINS. J.E.C. **Micologia Médica**. 7. ed. São Paulo: Savier, 1984.
LEAL, M. C. Perinatalidade no Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, supl 1, p. S4-S5, 2004.

LEAL, M. C. Perinatalidade no Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, supl 1, p. S4-S5, 2004.

MARRIE, TJ; Costerton, W. **Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine**. Appl Environ Microbial. 1981; 42 (6): 1093-102

MOREIRA AM. et al,. Ciências Farmacêuticas – **uma abordagem em Farmácia**, Atheneu, 2000, 21:380.

MICEK, S.T. et al. Health care-associated pneumonia and community-acquired pneumonia: a single-center experience. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 51, p. 3568-3573, 2007

MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 9. ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology, 2007.

MURRAY. P. R. et al, **Manual of clinical microbiology**. 7 ed. Washington D.C., American Society of Microbiology. p. 1773. 2000.

NIEDERMAN, MS. Treatment of respiratory infections with quinolones. In: ANDRIOLE, V. (Ed.). **The quinolones**, 2. ed. San Diego: McGraw-Hill; 1998. p. 229-250.

AUSTRIAN STANDARDS INSTITUTE. **EN 14885**: Chemical disinfectants and antiseptics: application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics. Ed. 2007-01-0. Wien, 2007.

ORTH, D.S. **Preservation of cosmetic products in Handbook of Cosmetic Microbiology, Cosmetic Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1993. v. 12, p. 72-102.

OSLER, T. Antiseptics in surgery. In: FRY, D.E. **Surgical infections**. Boston: Little Brown and Company, 1995, p. 119-25.

PADOVANI, C.M. et al. Avaliação microbiológica das diferentes formulações anti-séptica, polivinilpirrolidona-iodo e clorexidina, após contaminação intencional das almotolias. **Ver. Latini-Am. Enfermagem** Vol. 16 no.6 Ribeirão Preto Nov./Dec. 2008.

PASTEL, D.; ALMEIDA, R. A.; DUNLAP, J.; OLIVER S.. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, 2009.

PELLEGRINO, F.L. et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.**, v.40, n.7, p.2420-4, 2002.

PIETSCH, H. Hand antiseptics: rubs versus scrubs, alcoholic solutions versus alcoholic gel. **Jornal of hospital Infection**. v. 48, suppl. A, p. S33-S36, 2001.

PIRES, E. J.V.C., et. al. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Rev. bras. ter. intensiva** vol.21 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2009.

PRADE, S.S., et al. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Rev. Control. Infecção Hospitalar**. v. 2, n. 2, p. 11-24, 1995.

REDFERN S.M., Mitos e rituais na sala de operação. **Rer. SOBECC**. v. 3, p. 10-7, 1998

REIS, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de antissépticos e desinfetantes utilizados em serviço de saúde, Universidade Estadual de Londrina, **Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná**, Londrina-PR, Brasil, 2011.

RICHARDS, R.M.E. An Evaluation of the literature on the effectiveness of Antibacterial Agents Used as preservatives in Ophthalmic Solutions part., 1949 – 1956. **Australasian J. Pharm.** 48 Supp. 55. 586 – 589, 1967, part. II 1957 – 1965. 48.

ROMÃO, C.M.C.P.A. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana em Três Estágios de Dois Produtos Comerciais Utilizados em Desinfecção Hospitalar no Brasil.** Instituto de Microbiologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1985.

ROESSLER, W.G. Methods of Testing Antiseptics. In: BLOCK, S.S.; **Desinfecção, Esterilização e Preservação.** 3 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 100-106, 1983.

SANTOS, A.A.M. et al, Importância do álcool no Controle de Infecções em serviço de saúde, **Revista de Administração em Saúde RAS-Vol.4.NOI6-Jul-Set.2002;**

SEMMELEWEIS, I. The etiology, concept and prophylaxis of childbed fever [excerpts]. In: Buck C, Llopis A, Najera E, Terris M, editors. **The challenge of epidemiology-issues and selected readings.** Washington: PAHO Scientific Publication, 1988. p. 46-59.

SIMPOSIO BRASILEIRO DE VIGILANCIA SANITARIA, 2, 21-24 nov. 2004, Caldas Novas, GO. **Vigilância sanitária: consciência e vida.** Caldas Novas, GO: ABRASCO, 2004.

SOUZA, E. L. C. **Comparação do dogluconato de clorexidina 0,12% com e sem xylitol para controle do biofilme oral e efeitos adversos associados –** Dissertação (mestrado), Universidade Veiga de Almeida, mestrado em odontologia. Rio de Janeiro, RJ. 2007.

TEIXEIRA, P. **Biossegurança:** uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1996.

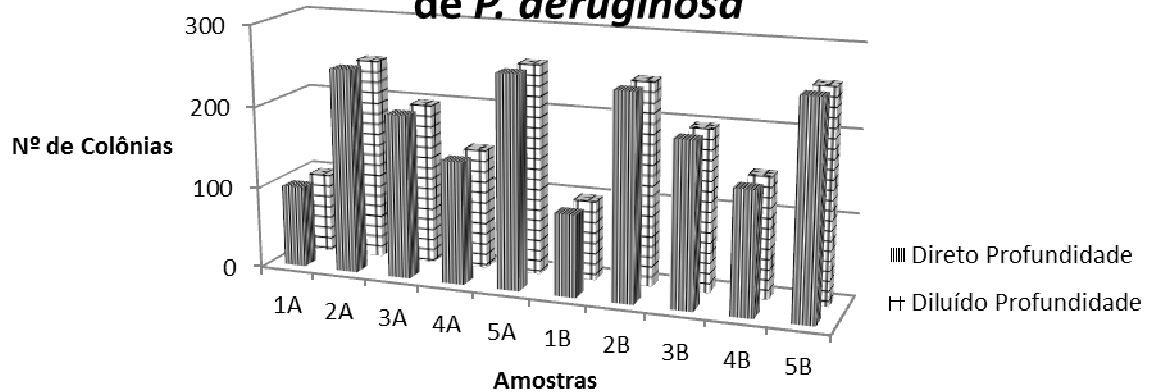
THE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Tentative Final Monograph for Health-Care Antiseptic Drug Products:** Proposed Rule 59, Federal Register 31402-31451, June 17, 1994. Washington, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 7. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2002.

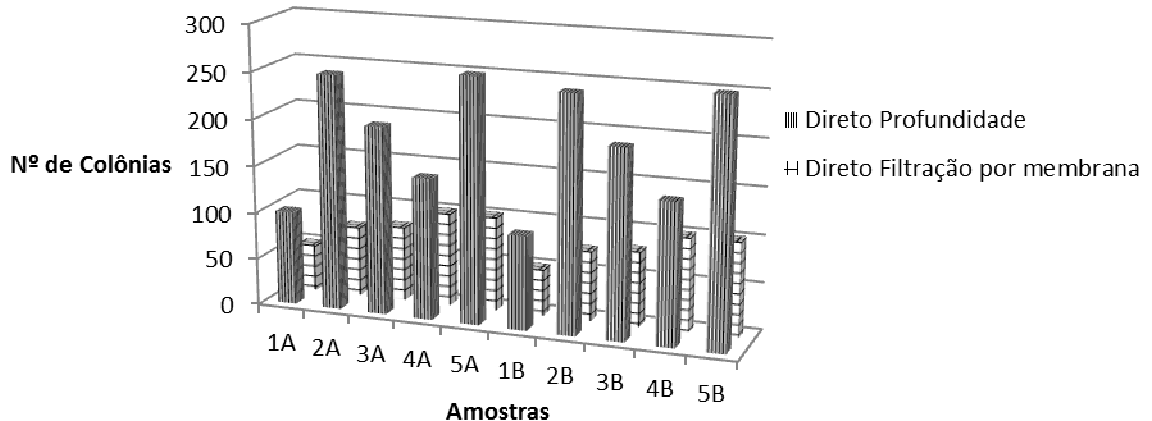
WEBER, D.J.; RUTALA, W.A. Use of germicides in the home and the healthcare setting: is there a relationship between germicide and antibiotic? **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 27, n. 10, p. 1107-1119, Oct. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevenção de Doenças Crônicas um Investimento vital.** Geneva: 2005.

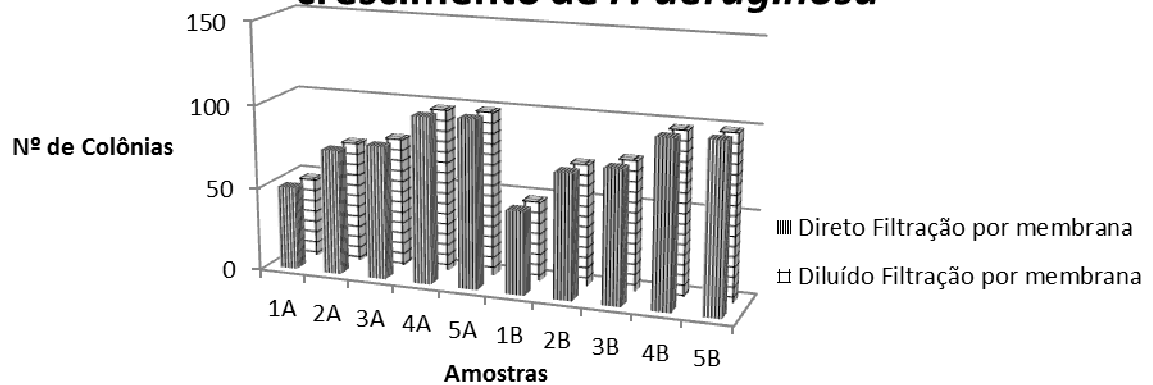
Comparação entre as amostras de Clorexidina(B) e álcool a 35%(A) diretas não diluídas e diluída, semeadura em profundidade que não inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*



Comparação entre amostras não diluídas de Clorexidina (B) e álcool a 35%(A) por semeadura em profundidade e filtração por membrana que não inibiram o crescimento da *P. aeruginosa*



Comparação entre amostras não diluídas e diluídas de Clorexidina(B) e álcool a 35%(A) por Filtração por membrana que não inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*



Comparação entre amostras diluídas de Clorexidina (1 a 5) e álcool a 35% (6 a 10) por semeadura em profundidade e Filtração por membrana que não inibiram o crescimento da *P. aeruginosa*

