

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

Amanda Fermiano da Cruz

**ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BACTERICIDA DE ÁLCOOL ETÍLICO SOB A FORMA DE GEL A 70 °INPM**

Rio de Janeiro

2020

Amanda Fermiano da Cruz

ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BACTERICIDA DE ÁLCOOL ETÍLICO SOB A FORMA DE GEL A 70 °INPM

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Dr.^a Bruna Peres Sabagh.

Preceptora: Dr.^a Maria Helena Simões
Villas Bôas.

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Cruz, Amanda Fermiano da

Adaptação e validação de método para a avaliação da atividade bactericida de álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM. / Amanda Fermiano da Cruz. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.
61 f. : fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Tutora: Bruna Peres Sabagh.

Preceptora: Maria Helena Simões Villas Bôas.

1. Controle de Qualidade. 2. Vigilância Sanitária . 3. Desinfetantes.
I. Título.

Adaptation and validation of a method for evaluating bactericidal activity of ethyl alcohol in gel form at 70 °INPM.

Amanda Fermiano da Cruz

**ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BACTERICIDA DE ÁLCOOL ETÍLICO SOB A FORMA DE GEL A 70 °INPM**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

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

Talita Coelho de Souza (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Bruna Peres Sabagh (Doutora) – Tutora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

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

Dedico este trabalho à minha mãe, Rosemara, por ser sempre presente, mesmo quando distante fisicamente; e ao meu noivo, Roger, por todo o apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me abençoado em cada escolha e etapa da minha vida.

À minha tutora e à minha preceptora, Bruna e Maria Helena, pela disponibilidade, incentivo e, principalmente, paciência.

Ao Sérgio A. Silva, da VDQuali, pelo auxílio com a parte estatística e com a elaboração do desenho experimental desse trabalho.

Aos profissionais do Setor de Cosméticos e Saneantes do Departamento de Química, pela realização das análises de teor alcoólico dos desinfetantes sob a forma de gel utilizados nesse estudo e por fornecer a matriz do desinfetante para a realização da validação do método.

Aos profissionais do Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia, por ceder uma de suas estufas bacteriológicas para a realização das análises de robustez do método.

Às bolsistas PIBIC, PEC e PIBITI do Setor de Saneantes: Paula, Verônica, Bianca e Carolaine pelo auxílio na realização dos ensaios.

Aos demais colegas e ex-colegas do Setor de Saneantes: Gabrielle, Daniela, Camila, Talita, Gessi, Karyne e Célia pelos ensinamentos, discussões de artigos, risadas e momentos de descontração.

Aos profissionais do Setor de Meio de Cultura do Departamento de Microbiologia, pelo preparo dos meios de cultura utilizados nas análises.

Aos profissionais da Central de Esterilização do Departamento de Microbiologia, pelo preparo dos materiais utilizados durante as análises.

À todos os amigos e familiares pelo apoio e carinho.

Muito obrigada!

Comece fazendo o que você quer fazer agora. Não estamos vivendo na eternidade. Temos apenas este momento, brilhando como uma estrela em nossa mão e derretendo como um floco de neve.

Francis Bacon

RESUMO

O álcool etílico a 70 °INPM é um agente bactericida de amplo espectro que tem sido comercializado sob a forma de gel no Brasil desde a publicação da RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. Atualmente, esses produtos têm sido registrados na Anvisa como antisséptico e desinfetante de superfície de uso geral e hospitalar. Contudo, não há método descrito para a realização do controle de qualidade microbiológico de desinfetantes sob a forma de gel, o que impossibilita o monitoramento da eficácia desses produtos por parte da vigilância sanitária. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo adaptar um método analítico e validá-lo para que seja possível a realização da avaliação da atividade bactericida de desinfetantes à base de álcool etílico a 70 °INPM sob a forma de gel. O método analítico proposto é uma adaptação de um método desenvolvido pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, o qual é atualmente utilizado no Setor de Saneantes para avaliar a atividade bactericida de desinfetantes na forma *spray* e aerossol. O método consiste em desafiar o desinfetante colocando-o em contato com 60 carreadores – previamente contaminados com o micro-organismo teste – durante o tempo de contato estabelecido pelo fabricante. Após esse período, os carreadores são submersos em tubos contendo meio de cultura, os quais são incubados a 36 ± 1 °C por 48 h. A contagem da densidade microbiana média dos carreadores também é realizada para validar os resultados. Os micro-organismos utilizados nesse trabalho foram *Staphylococcus aureus* CBRVS 00039 ATCC 6538, *Salmonella enterica* CBRVS 00028 ATCC 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* CBRVS 00025 ATCC 15442. Os parâmetros eleitos para a validação do método foram baseados no capítulo nº 1223 da *United States Pharmacopeia* e do guia desenvolvido pelo *Analytical Laboratory Accreditation Criteria Committee* da AOAC, sendo eles: efeito matriz, robustez e repetibilidade. Os experimentos realizados com a matriz do desinfetante (gel sem álcool) demonstraram que não há interferência do gel na eficácia do álcool etílico. Para os micro-organismos *S. enterica* e *P. aeruginosa*, resultados satisfatórios da avaliação da atividade bactericida foram obtidos quando se utilizou 50 µL de desinfetante na execução do método. Já para *S. aureus*, a atividade bactericida foi satisfatória a partir do uso de 80 µL de desinfetante. No entanto, resultados melhores foram obtidos quando se utilizou 100 µL de desinfetante, constatando-se que essa bactéria tem menor susceptibilidade ao álcool etílico a

70 °INPM que os demais micro-organismos utilizados no estudo. Esses resultados foram robustos para os tempos de incubação de 24 h, 48 h e 72 h. O método também não teve alteração do seu desempenho frente às variações de equipamentos e analistas, além de demonstrar ser repetível para os três micro-organismos empregados no ensaio. O desenvolvimento e validação desse método foram de suma importância para o monitoramento da qualidade desses produtos, além de ser o primeiro método descrito para a avaliação de desinfetantes sob a forma de gel.

Palavras-chave: Controle de Qualidade. Vigilância Sanitária. Desinfetantes.

ABSTRACT

Ethyl alcohol at 70 °INPM is a broad-spectrum bactericidal agent that has been marketed as a gel in Brazil since the publication of RDC nº 46, of February 20, 2002. Currently, these products have been registered with Anvisa as an antiseptic and general and hospital surface disinfectant. However, there is no method described for the microbiological quality control of disinfectants in the form of gel, which makes it impossible to monitor the effectiveness of these products by the Health Surveillance. Thus, the present work aimed to adapt an analytical method and validate it so that it is possible to perform the evaluation of the bactericidal activity of ethyl alcohol based disinfectants at 70 °INPM in gel form. The proposed analytical method is an adaptation of a method developed by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), which is currently used in our laboratory to evaluate the bacterial activity of disinfectants in the form of spray and aerosol. The method is to challenge the disinfectant by placing it in contact with 60 carriers - previously contaminated with the test microorganism - during the contact time established by the manufacturer. After this period, the carriers are submerged in tubes containing culture medium, which are incubated at 36 ± 1 °C for 48 h. The carrier microbial density counts are also performed to validate the results. The microorganisms used in this work were *Staphylococcus aureus* CBRVS 00039 ATCC 6538, *Salmonella enterica* CBRVS 00028 ATCC 10708 and *Pseudomonas aeruginosa* CBRVS 00025 ATCC 15442. The parameters chosen for the validation of the method were established in chapter 1223 of the United States Pharmacopeia and the guide developed by the Analytical Laboratories Criteria Committee of the Association of Official Analytical Chemists, which were: matrix effect, robustness and repeatability. The experiments performed with a disinfectant matrix (gel without alcohol) showed that there is no interference of the gel on the effectiveness of alcohol. For *S. enterica* and *P. aeruginosa* microorganisms, satisfactory results of bactericidal activity evaluation were obtained when 50 µL of disinfectant was used in the execution of the method. For *S. aureus*, the bactericidal activity was satisfactory from the use of 80 µL of disinfectant. However, better results were obtained when 100 µL of disinfectant was used, finding that this bacterium has lower susceptibility to ethyl alcohol at 70 °INPM than the other microorganisms used in the study. These results were robust for 24 h, 48 h and 72 h incubation times. The method also did not change its performance in the face of changes in equipment and analysts, besides proving to

be repeatable for the three microorganisms used in the test. The development and validation of this method were extremely important for the quality monitoring of these products, besides being the first method described for the evaluation of gel disinfectants.

Keywords: Quality Control. Health Surveillance. Disinfectants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Avaliação da atividade bactericida do álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM.....	36
--	----

EQUAÇÕES

Equação 1 - Fórmula para calcular a média geométrica da densidade de microorganismos nas lamínulas carreadoras.....	38
---	----

QUADROS

Quadro 1 – Características de alguns dos princípios ativos utilizados em desinfetantes.	20
Quadro 2 – Fatores que podem influenciar os testes de eficácia de desinfetantes...	26
Quadro 3 – Parâmetros para a validação de métodos analíticos microbiológicos. ...	28
Quadro 4 – Interferência da matriz do produto sobre o crescimento microbiano.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquemas de secagem dos carreadores para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Tabela 2 – Resultados dos ensaios utilizando diferentes volumes de desinfetante. .	44
Tabela 3 – Resultados dos ensaios incubados na estufa LUFERCO® modelo 1179.	45
Tabela 4 – Avaliação da variação dos analistas sobre o desempenho do método ...	46
Tabela 5 – Resultados da avaliação da repetibilidade do método	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABRASPEA	Associação Brasileira dos Produtores e Envasadores de Álcool
ALACC	<i>Analytical Laboratory Accreditation Criteria Committee</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APSIC	<i>Asia Pacific Society of Infection Control</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN	Bastonetes Gram-negativos
CEN	Comitê Europeu de Normalização
CGP	Cocos Gram-positivos
CN	Caldo Nutriente
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
g	Gramas
GL	Gay-Lussac
h	Horas
ICH	<i>International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LACEN	Laboratório Central
log _M	Densidade Logarítmica Média
LOS	Lei Orgânica da Saúde
min	Minutos
mL	Microlitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
nº	Número
°C	Graus Celsius

OMS	Organização Mundial da Saúde
p/p	Peso por peso
pH	Potencial Hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBQ	Sociedade Brasileira de Queimaduras
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SS	<i>Ágar Salmonella-Shigella</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TSA	<i>Ágar Triptona de Soja</i>
TSB	Caldo Triptona de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/carreador	Unidades Formadoras de Colônias por carreador
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitros
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
Visa	Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Princípios de limpeza e desinfecção de superfícies	16
1.2 Produtos saneantes	17
1.3 Desinfetantes à base de álcool etílico no Brasil	21
1.4 Controle de qualidade microbiológico de desinfetantes	23
1.5 Validação de métodos analíticos microbiológicos	26
1.6 Justificativa	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 METODOLOGIA	32
3.1 Determinação do teor de álcool etílico em desinfetantes sob a forma de gel	32
3.2 Criopreservação dos micro-organismos teste	32
3.3 Realização do ensaio	33
3.3.1 Preparo das culturas-teste	33
3.3.2 Preparo das lamínulas carreadoras	34
3.3.3 Avaliação da atividade bactericida de álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM.....	34
3.3.4 Interpretação dos resultados	36
3.3.5 Validação dos resultados do ensaio	37
3.3.5.1 <i>Contagem da carga microbiana das lamínulas carreadoras</i>	37
3.3.5.2 <i>Testes de esterilidade e de viabilidade dos meios de cultura</i>	38
3.3.5.3 <i>Confirmação da neutralização do desinfetante</i>	39
3.4 Validação do método analítico	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Escolha do produto padrão para a validação do método	40
4.2 Validação do método analítico	41
4.2.1 Avaliação do efeito matriz	41
4.2.2 Avaliação da robustez do método	43
4.2.2.1 <i>Variação do volume de desinfetante e do tempo de incubação</i>	43
4.2.2.2 <i>Variação de equipamento: incubação em diferente estufa bacteriológica</i>	45

4.2.2.3 <i>Variação dos analistas para a execução do método</i>	45
4.2.3 Avaliação da repetibilidade do método.....	46
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Princípios de limpeza e desinfecção de superfícies

A limpeza e desinfecção de superfícies e ambientes são processos que contribuem para a sensação de conforto e bem-estar das pessoas, pois evitam o acúmulo de sujeira e a proliferação de micro-organismos patógenos, rompendo a cadeia de transmissão desses agentes. A limpeza consiste na remoção da sujidade visível de um item ou superfície, de maneira que promova a conservação, manutenção e o preparo para uso do material ou ambiente que foi limpo. Já a desinfecção consiste na destruição de micro-organismos em ambientes ou objetos inanimados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012; BLOCK, 2001).

Apesar de ter objetivos parecidos, não se podem confundir os conceitos de desinfecção e esterilização. A desinfecção destrói bactérias vegetativas, fungos, vírus e, por vezes, micobactérias. Além disso, pode ser classificada em alto, intermediário e baixo nível de desinfecção. Entretanto, a desinfecção não destrói os endósporos ou esporos bacterianos, que são estruturas resistentes e capazes de proteger as bactérias das condições ambientais adversas. Já a esterilização é capaz de destruir todos os micro-organismos viáveis, incluindo os esporos bacterianos (MCDONNELL, 2007; RUTALA; WEBER, 2019).

No ambiente domiciliar e nos estabelecimentos de interesse à saúde, como academias e escolas, existem várias superfícies que demandam uma rotina de limpeza, como as superfícies de manipulação de alimentos e banheiros públicos. Mas é no ambiente hospitalar que a limpeza e desinfecção de superfícies têm uma importância maior. A limpeza e desinfecção de áreas, equipamentos e dispositivos médicos e odontológicos, objetiva não apenas preservar equipamentos e ambientes, mas também evitar a proliferação e disseminação de micro-organismos, contribuindo para a prevenção da ocorrência de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012; PEREIRA *et al.*, 2015; PROTANO *et al.*, 2019).

Atualmente, a prevenção e controle da ocorrência dessas infecções, principalmente com o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, é um assunto que tem preocupado todo o mundo (KAUR; LIU, 2016). No ambiente hospitalar, uma das principais fontes de contaminação são superfícies contaminadas

e equipamentos médicos, como mesas de raios x, macas, estetoscópios, dentre outros (BOYCE, 2007; OTTER; YEZLI; FRENCH, 2011; PALMQVIST *et al.*, 2019). Por isso, esses equipamentos e as superfícies fixas se tornam o principal foco dos protocolos de limpeza e desinfecção de hospitais e serviços que prestam assistência à saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012; LING *et al.*, 2019; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014; RUTALA *et al.*, 2008). Além disso, superfícies contaminadas podem ser fontes de transmissão de micro-organismos entre mãos (LEI *et al.*, 2020; SULEYMAN; ALANGADEN; BARDOSSY, 2018).

Para a realização da limpeza e desinfecção de superfícies se faz necessária a utilização de substâncias químicas, denominadas de produtos saneantes. Esses produtos podem diferir com relação à sua formulação e, conseqüentemente, compatibilidade de seus componentes à superfície a ser desinfetada. Por isso a escolha do produto a ser utilizado irá depender da superfície a ser limpa, do objetivo da limpeza e da compatibilidade com outros princípios ativos, no caso do uso de mais de um produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

1.2 Produtos saneantes

De acordo com a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, saneantes são definidos como substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção ou desinfestação domiciliar, em ambientes coletivos e/ou públicos, em lugares de uso comum e no tratamento da água (BRASIL, 1976). Para fins regulatórios, esses produtos podem ser classificados quanto à venda e emprego em produtos de venda livre ou de uso profissional, com venda restrita a empresa especializada; quanto à sua finalidade, em produtos de limpeza geral e afins, desinfetantes, esterilizantes, sanitizantes, desodorizantes, desinfetantes de água para o consumo humano, hortifrutícolas e piscinas, desinfestantes ou tira manchas; e quanto ao risco, em produtos de Risco I e Risco II (BRASIL, 2010a).

Os produtos de Risco I são aqueles que oferecem pequeno risco à população e precisam apenas de notificação perante o órgão regulador, por via eletrônica, conforme determina a RDC nº 42, de 13 de agosto de 2009 (BRASIL, 2009). Já os produtos de Risco II são aqueles que oferecem risco para a população por conta de suas propriedades físicas e químicas, como pH abaixo de 2 e acima de 11,5 e corrosividade; sejam à base de micro-organismos viáveis; aleguem alguma

propriedade desinfestante ou ação antimicrobiana; possuam em sua formulação ácidos inorgânicos altamente reativos: fluorídrico (HF), nítrico (HNO_3), sulfúrico (H_2SO_4) e seus sais. Esses produtos precisam de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para que possam ser comercializados no Brasil (BRASIL, 2010a).

Para que a limpeza de uma superfície seja eficiente é importante que se utilize produtos saneantes, como detergentes e sabões, devidamente notificados na Anvisa, pois se tratam de produtos de Risco I (BRASIL, 2010a). Os sabões são produtos de uma reação natural, os quais são formulados a base de ácidos graxos e sais alcalinos. Podem também apresentar tensoativos em sua composição. Os detergentes são produtos que possuem surfactantes em sua composição, os quais agem por meio da diminuição da tensão superficial da água, facilitando a dispersão e emulsificação da sujeira e resultando na sua remoção. Há detergentes que contêm íons que promovem uma ação repelente nos micro-organismos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Em locais onde há a presença de matéria orgânica, recomenda-se que após a limpeza seja feito o uso de produtos saneantes que possuam ação antimicrobiana, os denominados desinfetantes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Os desinfetantes são descritos como produtos destinados a destruir, indiscriminada ou seletivamente, micro-organismos, quando aplicados em objetos inanimados ou ambientes. Assim como os demais saneantes, os desinfetantes são produtos que estão sujeitos à vigilância sanitária, sendo classificados como produtos de Risco II e demandando comprovada ação antimicrobiana para efeito de registro (BRASIL, 2010a). No Brasil, a RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 e a RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010, regulamentam todos os saneantes com ação antimicrobiana e os desinfetantes hospitalares, respectivamente (BRASIL, 2007, 2010b).

Com relação ao princípio ativo, os desinfetantes podem ser classificados em diversos tipos que variam em aplicabilidade e espectro de ação. Por isso, além do risco associado ao tipo e nível de contaminação, existem três pontos importantes que devem ser considerados na hora de se escolher um produto: a eficácia, a segurança e a compatibilidade com outros produtos e com os materiais a serem submetidos ao processo (MCDONNELL, 2007). O Quadro 1 traz um pequeno resumo dos princípios ativos empregados nas formulações dos desinfetantes mais comumente utilizados,

seus mecanismos e espectros de ação, suas indicações e concentração de aplicação, além das principais desvantagens da sua utilização.

Embora muitas instituições de saúde possuam recursos limitados para a compra de desinfetantes, a água sanitária e o álcool etílico são considerados desinfetantes adequados quando utilizados posteriormente ao processo de limpeza. Além disso, são desinfetantes muito utilizados, pois possuem uma ação antimicrobiana de amplo espectro e com custo relativamente baixo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). A relação custo-benefício de um produto como um desinfetante é um fator muito importante a ser considerado. Principalmente quando os hospitais, em especial, os localizados em países em desenvolvimento como o Brasil, possuem recursos financeiros limitados para a compra de seus insumos.

Quadro 1 – Características de alguns dos princípios ativos utilizados em desinfetantes.

Princípio ativo	Mecanismo de ação	Espectro de ação	Indicação de uso	Concentrações utilizadas	Principais desvantagens
Álcool etílico	Dano na membrana celular e desnaturação de proteínas	Bactericida, virucida, fungicida e tuberculocida	Mobiliários em geral	60-95%	<ul style="list-style-type: none"> • Inativa-se na presença de matéria orgânica • Pouca ação residual • Pode danificar materiais • Altamente inflamável
Cloro e hipoclorito de sódio	Ainda não elucidado	Bactericida, virucida, fungicida, tuberculocida e esporocida	Superfícies fixas	500-5000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Inativa-se na presença de matéria orgânica e pela luz solar • Corrosivo para metais • Afetado pela temperatura e pH
Compostos de amônio quaternário	Dano na membrana celular e desnaturação de proteínas	Bactericida, pouca ação micobactericida, virucida.	Superfícies fixas	1000-5000 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Perdem sua atividade microbicida com águas duras, sabão, algodão ou resíduos iônicos • Contaminam-se com facilidade
Compostos fenólicos	Rompe a parede celular e precipita proteínas e inativa enzimas	Bactericida, virucida, fungicida e micobactericida	Superfícies fixas e mobiliários em geral	Conforme a recomendação do fabricante	<ul style="list-style-type: none"> • Causa despigmentação da pele • Causa hiperbilirrubinemia neonatal • Poluente ambiental
Compostos iodados	Desnatura proteínas e inativa enzimas	Bactericida, virucida, fungicida e micobactericida	Superfícies fixas	7,5-10%	<ul style="list-style-type: none"> • Pouca ação residual • Danifica algumas superfícies • Incompatíveis com produtos a base de amônio quaternário

Fonte: Da autora, 2020, adaptado de: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012; HERNÁNDEZ-NAVARRETE *et al.*, 2014; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; RUTALA; WEBER, 2016.

1.3 Desinfetantes à base de álcool etílico no Brasil

Quanto aos antissépticos ou desinfetantes à base de álcool, os princípios ativos mais utilizados são o isopropanol, também chamado de álcool isopropílico ou propan-2-ol, o *n*-propanol ou propan-1-ol e o etanol ou álcool etílico (MCDONNELL, 2007). O álcool etílico é o princípio ativo mais popular dentre os desinfetantes a base de álcool e tem sido usado desde a antiguidade. O vinho foi utilizado, tanto externamente quanto internamente, para curar qualquer tipo de doença. O conhaque era utilizado na Idade Média para tratar as feridas de militares. Mas foi a partir do século XVIII que o etanol passou a ser utilizado em feridas cirúrgicas, diminuindo o número de mortes por amputação (BLOCK, 2001).

Atualmente, o álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) tem sido utilizado como antisséptico e desinfetante de superfície (ALI *et al.*, 2001; MCDONNELL, 2007). Desinfetantes à base de etanol apresentam baixa toxicidade e podem ser utilizados em diversos tipos de superfícies, embora possam danificar alguns materiais como borracha e acrílico, pois provocam o ressecamento desses materiais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012). Possuem ação bactericida contra formas vegetativas de bactérias. Por ser um antimicrobiano inespecífico e capaz de provocar inúmeros efeitos tóxicos na célula, também é eficaz contra vírus envelopados e alguns vírus não envelopados (CHANG *et al.*, 2013; KAMPF, 2018; SHIMIZU-ONDA *et al.*, 2013; WHITEHEAD; MCCUE, 2010), fungos e leveduras (STAUF *et al.*, 2019) e há evidências que comprovam a sua ação sobre *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium terrae* (KAMPF *et al.*, 2002; KAMPF; KRAMER, 2004; RUTALA *et al.*, 1991; SMITH, 1947; VAN KLINGEREN; PULLEN, 1987). O álcool etílico não tem nenhuma ação sobre formas esporuladas de bactérias (ALI *et al.*, 2001; NYE; MALLORY, 1923).

Há poucas informações sobre o mecanismo de ação exato do álcool etílico, mas estudos sugerem que a sua ação bactericida ocorra por meio do dano à membrana celular dos micro-organismos e da desnaturação/coagulação de proteínas essenciais ao metabolismo bacteriano (ALI *et al.*, 2001; DAGLEY; DAWES; MORRISON, 1950; SYKES, 1939). O etanol em sua forma pura não apresenta nenhuma atividade bactericida, pois a desnaturação de proteínas ocorre com a adição de água. O álcool etílico é eficaz nas concentrações entre 60-95% (ALI *et al.*, 2001; HARRINGTON; WALKER, 1903; MORTON, 1950; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017),

mas sua concentração ótima está entre 60-70% (HARRINGTON; WALKER, 1903; KAMPF; KRAMER, 2004; PRICE, 1950).

Em razão de sua baixa massa molar (46,07 g/mol) e seu baixo ponto de ignição (13 °C), o etanol é extremamente volátil e inflamável (ALI *et al.*, 2001) e essas características foram responsáveis por um sério problema de saúde pública no Brasil. Até 2001, a principal causa de queimaduras envolvendo inflamáveis no país era o álcool etílico (PEREIMA *et al.*, 2001). Nesse ano, de um milhão de acidentes envolvendo queimaduras que foram registrados pela Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), 150 mil casos tinham como agente causador o álcool etílico. Desse total, 45 mil casos ocorriam com crianças menores de 12 anos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002). O principal fator que facilitava a ocorrência desses acidentes era o acesso ao álcool etílico líquido, que além de ser um produto barato, sempre foi muito utilizado no Brasil na limpeza doméstica e em churrasqueiras, como facilitador de combustão (ALDUNATE *et al.*, 2012; PEREIMA *et al.*, 2009).

Visando diminuir a incidência dos acidentes envolvendo queimaduras e a ingestão de álcool etílico, a Anvisa publicou a RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. Essa RDC proibiu a comercialização de álcool etílico na forma líquida quando em concentrações acima de 54 °GL ou 46,2 °INPM (BRASIL, 2002). Por meio dessa resolução, a Anvisa objetivou proteger a população dos riscos, uma vez que o álcool etílico na forma de gel tem a propriedade de ser viscoso, espalhando-se com dificuldade e impedindo que grandes áreas do corpo sejam queimadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002). Além disso, a mudança da RDC nº 46/2002 também assegurou a qualidade do produto, uma vez que o álcool etílico em gel possui atividade microbicida equivalente ao etanol na forma líquida (HERNANDES *et al.*, 2004; WILKINSON *et al.*, 2018).

Embora o álcool etílico sob a forma de gel ainda possa causar queimaduras (BRYANT; PEARCE; STOVER, 2002; O'LEARY; PRICE, 2011), verificou-se no ano de 2003 uma redução de 10,16% dos casos ocorridos em crianças. No entanto, em agosto de 2002, o Tribunal Regional Federal da 1ª Região, em Brasília, publicou uma liminar em favor das indústrias que faziam parte da Associação Brasileira dos Produtores e Envasadores de Álcool (ABRASPEA). De acordo com o documento, seria permitido a essas empresas realizar a venda do álcool etílico líquido a 96 °GL a supermercados, drogarias e outros estabelecimentos comerciais. A partir dessa

liminar, a Anvisa ficou impossibilitada de restringir e punir as empresas afiliadas à ABRASPEA (PEREIMA *et al.*, 2009).

Dessa forma, o álcool etílico na forma líquida continuava nas prateleiras dos mercados, gerando risco para a população. Em 2004, o número de queimaduras causadas pelo álcool etílico envolvendo crianças voltou a crescer em 2,57%. Nos anos subsequentes, os números permaneceram estáveis, demonstrando que, apesar dos problemas jurídicos, a publicação da RDC nº 46/2002 da Anvisa obteve certo sucesso em seu objetivo de reduzir o número de acidentes envolvendo crianças (PEREIMA *et al.*, 2009). No entanto, é evidente que não se pode descartar o papel da mídia da época e das campanhas de prevenção de acidentes domésticos.

Apesar de ter recorrido, a Anvisa só teve o seu direito de regulamentar a produção e comercialização do álcool etílico reconhecido pela justiça em 2012. A decisão judicial foi formalizada no ano seguinte, quando a Anvisa publicou a Resolução nº 652, de 22 de fevereiro de 2013, na qual se reconhece como medida de interesse sanitário a suspensão da fabricação, distribuição e comércio de todos os lotes de álcool etílico líquido com graduação maior que 54 °GL no país. Essa resolução também determinou que todas as empresas, inclusive as afiliadas à ABRASPEA recolhessem o produto remanescente no mercado (BRASIL, 2013). Desde então, o álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM tem sido intensamente comercializado no Brasil como antisséptico e como desinfetante de superfície.

1.4 Controle de qualidade microbiológico de desinfetantes

Desinfetantes contaminados são recorrentes fontes de micro-organismos causadores de IRAS e envolvidos em surtos hospitalares (WEBER; RUTALA; SICKBERT-BENNETT, 2007). Os principais fatores que podem comprometer a qualidade de um desinfetante envolvem etapas da fabricação e uso do produto. São exemplos de fontes que podem comprometer a eficácia do produto: o uso de concentrações inadequadas de princípio-ativo, o uso de água de qualidade duvidosa na diluição do desinfetante, o armazenamento em condições de temperatura e umidade inapropriadas, embalagens que não protegem o produto de contaminações externas e o uso do desinfetante por meio de técnicas que não seguem as especificações do fabricante com relação à diluição recomendada e o tempo de contato (MAILLARD, 2016; SANTOS *et al.*, 2002).

Para conceder ou revalidar o registro, a Anvisa exige que no dossiê técnico do produto conste um laudo técnico comprovando a sua eficácia frente aos micro-organismos exigidos pela RDC nº 14/2007 ou pela RDC nº 35/2010, em caso de desinfetante hospitalar utilizados em artigos críticos e semicríticos (BRASIL, 2007, 2010b). Recentemente, a RDC nº 313, de 10 de outubro 2019 alterou o prazo de validade do registro de saneantes de Risco II de 5 para 10 anos (BRASIL, 2019). Sendo assim, a importância desses testes não está em apenas deferir a eficácia do produto para a venda, mas também em permitir que os laboratórios de saúde pública monitorem a qualidade dos desinfetantes que já estão sendo comercializados.

Os testes de eficácia de desinfetantes podem ser classificados de acordo com diferentes critérios, como o micro-organismo testado (atividade bactericida, fungicida, esporocida ou micobactericida), o tipo de ação (ação microbicida ou microbiostática) ou o seu objetivo e princípio metodológico. De acordo com este último critério, essas metodologias podem ser diferenciadas em: testes primários ou de triagem, que são os denominados testes em suspensão; testes *in vitro* que simulam uma situação real, sendo os testes que utilizam superfícies contaminadas, as quais são denominadas de “carreadores”; e testes *in loco* ou testes de campo (CREMIEUX; FRENEY; DAVIN-REGLI, 2001; MAILLARD, 2016).

Os testes em suspensão objetivam basicamente avaliar a qualidade intrínseca do produto, estabelecendo a sua potencial atividade bactericida, fungicida, virucida ou esporocida. Esses testes consistem em avaliar o efeito microbicida de um produto adicionando-se o desinfetante à cultura do micro-organismo teste, deixando-os em contato por um tempo definido. Passado esse período, a suspensão de bactérias imersas no produto é filtrada ou transferida para uma solução neutralizante, que objetiva paralisar a ação do desinfetante. A suspensão final é inoculada em meio de cultura para avaliar o crescimento microbiano qualitativa ou quantitativamente (CREMIEUX; FRENEY; DAVIN-REGLI, 2001; MAILLARD, 2016; SPRINGTHORPE; SATTAR, 2005).

Os testes envolvendo o uso de carreadores são considerados os mais adequados para atestar a eficácia de desinfetantes em laboratório, uma vez que o carreador tem por objetivo simular a superfície e as condições nas quais o produto está sendo aplicado (MAILLARD, 2016). O princípio metodológico desses testes envolve o uso de superfícies contaminadas (carreadores) com o micro-organismo teste. Depois de submetidos a uma etapa de secagem, os carreadores são colocados

em contato com o desinfetante pelo tempo de contato definido pelo fabricante. A ação do desinfetante é paralisada quando, passado o tempo de contato, o carreador é submerso em meio de cultura com o neutralizante apropriado para posterior avaliação do crescimento microbiano (CREMIEUX; FRENEY; DAVIN-REGLI, 2001; SPRINGTHORPE; SATTAR, 2005). Assim como os testes em suspensão, a avaliação dos resultados desse tipo de teste pode ter caráter qualitativo ou quantitativo (FRAISE; LAMBERT; MAILLARD, 2004).

Os testes de campo buscam avaliar o resultado da desinfecção de uma superfície frente a um protocolo de desinfecção. Por isso, a limitação desses testes em avaliar a eficácia de um desinfetante é que o resultado não depende somente do produto, mas também do protocolo de desinfecção que está sendo aplicado. Isso interfere na confiabilidade dos resultados, principalmente quando se objetiva realizar a avaliação frente a diferentes procedimentos de desinfecção. Esses testes podem, no entanto, verificar as condições de aplicação de um desinfetante que foram previamente estabelecidas pelos testes em suspensão e pelos testes que utilizam carreadores (CREMIEUX; FRENEY; DAVIN-REGLI, 2001; MAILLARD, 2016).

É importante destacar que as metodologias utilizadas precisam passar por um estudo de validação antes de serem aplicadas no monitoramento da qualidade de um produto. Contudo, existe uma série de fatores que podem afetar a ação antimicrobiana de um desinfetante, e conseqüentemente, interferir nos resultados dos testes de eficácia (Quadro 2). Esses fatores devem ser levados em consideração durante a validação de um método. Além disso, mesmo nos métodos compendiais, deve-se estar atento às alterações dessas metodologias, uma vez que as inovações tecnológicas e o desenvolvimento de novas formulações de desinfetantes exigem adaptações (PARSHIONIKAR *et al.*, 2016).

Quadro 2 – Fatores que podem influenciar os testes de eficácia de desinfetantes.

FATORES	OBSERVAÇÕES
Formulação	Uma concentração mínima de desinfetante é necessária para agir contra patógenos em suspensão. Quando os micro-organismos se aderem em superfícies, essa concentração mínima deve ser sempre maior para garantir a eficácia da desinfecção. Além disso, os aditivos e demais componentes do produto podem afetar a sua ação antimicrobiana.
Tempo de contato	Não respeitar o tempo de contato de um produto pode resultar na sobrevivência de micro-organismos.
Matéria orgânica	A presença de matéria orgânica pode reduzir a eficácia antimicrobiana do produto.
Temperatura	Temperaturas baixas podem afetar a ação antimicrobiana do desinfetante.
pH	Pode afetar tanto os micro-organismos quanto o produto.
Umidade relativa	Pode interferir na ação dos desinfetantes, principalmente daqueles que estão em fase gasosa.
Tipo de micro-organismo	Micro-organismos variam com relação a sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Além disso, micro-organismos que formam biofilmes são mais resistentes aos desinfetantes.
Carga microbiana	Uma alta carga microbiana torna a desinfecção mais difícil.
Fase de crescimento do micro-organismo	Bactérias que estão na fase log de crescimento são mais suscetíveis aos agentes antimicrobianos que as bactérias que estão na fase estacionária.
Sistema de neutralização	Pode inativar completamente ou parcialmente a atividade de um desinfetante. Além disso, alguns neutralizantes podem apresentar toxicidade para os micro-organismos teste.
Armazenamento da amostra	As condições de armazenamento podem influenciar a validade de um desinfetante.

Fonte: Da autora, 2020, adaptado de: CREMIEUX; FRENEY; DAVIN-REGLI, 2001; MAILLARD, 2016; SPRINGTHORPE; SATTAR, 2005; SUTTON *et al.*, 2002.

1.5 Validação de métodos analíticos microbiológicos

A validação é um processo avaliativo e documental que demonstra as características de desempenho de um procedimento. Seu principal objetivo é produzir evidências de que o método pretendido atende aos requisitos necessários para que sua utilização seja considerada adequada ao que se destina (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016; WEITZEL *et al.*, 2007).

A Norma ISO/IEC 17025:2017 é uma norma internacional que dispõe sobre os requisitos gerais que devem ser atendidos pelo Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) de laboratórios de ensaio e calibração. De acordo com essa norma, um método deve ser validado nas seguintes situações: 1) o método não é normalizado; 2) o método foi desenvolvido pelo laboratório; 3) o método normalizado é modificado ou utilizado fora de seu escopo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017).

Existem diversos guias que podem ser utilizados na elaboração de um protocolo de validação de métodos analíticos, como é o caso do *Harmonised Tripartite Guideline* Q2(R1) (INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005). Entretanto, há pouco material que dispõe especificamente sobre a validação de métodos microbiológicos. Dentre os guias disponíveis estão o capítulo 1223 da USP, o Guia de Validação de Métodos Microbiológicos elaborado pela *Environmental Protection Agency* (EPA) e o guia elaborado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para orientar os laboratórios que pretendem obter a acreditação da ISO/IEC 17025 (WEITZEL *et al.*, 2007, UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016; PARSHIONIKAR *et al.*, 2016). Todos esses guias trazem as definições dos parâmetros de validação do ICH Q2(R1) aplicados aos métodos microbiológicos. A definição dos parâmetros de validação, de acordo com esses guias, e o tipo de método para os quais devem ser avaliados constam no Quadro 3.

Deve-se destacar que a determinação dos parâmetros escolhidos para a validação de um método cabe ao laboratório que está realizando o procedimento. A inclusão dos parâmetros em um processo de validação vai depender do escopo do método, do tipo de amostra testada e do objetivo do método (WEITZEL *et al.*, 2007). Isso porque alguns métodos podem não precisar de uma validação formal, considerando todos os parâmetros existentes. O mais importante é que, independente dos parâmetros eleitos, todo o processo esteja bem documentado para que o sucesso da validação esteja garantido (PARSHIONIKAR *et al.*, 2016; SHRUTI *et al.*, 2014).

Por essa razão é que se faz necessária a implantação de um SGQ, garantindo o controle de qualidade em todas as etapas da validação (PARSHIONIKAR *et al.*, 2016). Além disso, após a validação do método, deve-se elaborar um procedimento operacional padrão (POP), que deve ser escrito de maneira clara e concisa, para que o método seja reproduzido sem imprecisão. A elaboração de todos esses documentos

é uma maneira que o laboratório dispõe de comprovar a qualidade e a confiabilidade dos resultados, além da rastreabilidade dos processos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

Quadro 3 – Parâmetros para a validação de métodos analíticos microbiológicos.

PARÂMETRO	DEFINIÇÃO	TIPO DE MÉTODO
Efeito matriz	Avalia a existência de possíveis interferências de substâncias que compõem a matriz da amostra sobre os resultados do método	Qualitativo e quantitativo
Exatidão	Proximidade do resultado obtido com o resultado de um método de referência	Quantitativo
Precisão	Proximidade dos resultados obtidos em medições independentes e sob condições estipuladas.	Quantitativo
Sensibilidade e especificidade	Avalia a resposta do método frente a um micro-organismo ou um grupo de micro-organismos. A especificidade é a capacidade do método em discriminar o micro-organismo teste de outros micro-organismos.	Qualitativo e quantitativo
Limite de detecção	O menor número de micro-organismos que pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado, sob condições experimentais	Qualitativo e quantitativo
Limite de quantificação	O menor número de micro-organismos que pode ser quantificado em uma amostra, com exatidão e precisão aceitável sob condições experimentais	Quantitativo
Linearidade	Habilidade do método de produzir resultados proporcionais à concentração de micro-organismos presentes na amostra	Quantitativo
Faixa de trabalho	É o intervalo entre o mais alto e o mais baixo nível de micro-organismos que podem ser determinados com exatidão, precisão e linearidade	Quantitativo
Robustez	Capacidade do método de não sofrer interferências de pequenas variações em seus parâmetros, como volume de reagente, tempo e temperatura de incubação	Qualitativo e quantitativo
Repetibilidade	Grau de acórdância entre resultados de testes individuais repetidos inúmeras vezes	Qualitativo e quantitativo

Fonte: Da autora, 2020, adaptado de PARSHIONIKAR *et al.*, 2016; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016; WEITZEL *et al.*, 2007.

1.6 Justificativa

A Lei Orgânica da Saúde – LOS (Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990) define a vigilância sanitária (Visa) como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes

do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde” (BRASIL, 1990). Tendo, portanto, caráter preventivo, as ações da Visa são competências do Sistema Único de Saúde (SUS) e acontecem sobre ameaças à saúde associadas a produtos, insumos e serviços e também ao meio ambiente (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Para realizar suas ações, a Visa se organiza dentro do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) em três esferas: o nível federal, composto pela Anvisa e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), o qual realiza as análises laboratoriais de produtos tendo como base a legislação sanitária normatizada pela Anvisa; o nível estadual, onde estão os 27 órgãos das Secretarias Estaduais de Saúde, que contam com o apoio do Laboratório Central (LACEN) de cada unidade; e o nível municipal, que compreendem aos serviços de Vigilância Sanitária em todos os municípios do território nacional, contando também com suas próprias unidades laboratoriais (LUCCHESE, 2006).

O laboratório é um componente essencial para as ações de Visa, sendo o instrumento para o desempenho das suas ações com relação ao controle e fiscalização sanitária de produtos. O monitoramento da qualidade de produtos tem por objetivo minimizar a exposição da população a produtos que estejam fora das especificações legais e que possam oferecer algum risco à saúde. É desenvolvido pelos Laboratórios Oficiais de Saúde Pública, e inclui o controle de qualidade de alimentos, cosméticos, medicamentos, saneantes, vacinas, dentre outros produtos (COSTA, 2004).

O INCQS atua nas áreas de ensino, pesquisa e de tecnologias de laboratório que visam o controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à regulamentação pela Anvisa. Além disso, tem o papel de dar apoio laboratorial às ações de Visa e de fornecer padrões de referência ou métodos de análise de produtos para servir de parâmetro aos outros laboratórios públicos (COSTA, 2004; LUCCHESE, 2006).

No Setor de Saneantes, do Departamento de Microbiologia do INCQS, realiza-se o controle microbiológico de saneantes com ação antimicrobiana. Todas as análises realizadas no setor precisam estar de acordo com as RDC nº 14/2007 e nº 35/2010, as quais estabelecem que as metodologias aplicadas para os testes de eficácia precisam ser, principalmente, as adotadas pela AOAC ou pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN) (BRASIL, 2007, 2010b).

A comercialização do álcool etílico a 70 °INPM sob a forma de gel se iniciou, no Brasil, após publicação da RDC nº 46/2002, que proibiu a comercialização de álcool etílico na forma líquida quando em concentrações acima de 54 °GL ou 46,2 °INPM (BRASIL, 2002). Em vários países da Europa, nos Estados Unidos e no Japão, o álcool sob a forma de gel é registrado como antisséptico/sanitizante de mãos (cosmético) ou como medicamento (ALI *et al.*, 2001). No Brasil, além dessas duas modalidades, têm-se os produtos registrados como desinfetantes de superfície, sendo regularizados como os demais saneantes com ação antimicrobiana e podendo ser desinfetantes de uso geral ou hospitalar para superfícies fixas e artigos não críticos.

Apesar dos antissépticos à base de álcool etílico sob a forma de gel serem avaliados microbiologicamente por meio de métodos em suspensão, esse tipo de método só pode ser aplicado aos desinfetantes como um teste de triagem. A inexistência de um método destinado ao controle de qualidade microbiológico de desinfetantes sob a forma de gel impossibilita o monitoramento da eficácia desses desinfetantes por parte da Visa. Sendo assim, a importância desse trabalho está na adaptação e validação de um método que seja capaz de avaliar a eficácia desses desinfetantes, o que é de suma importância para o monitoramento da qualidade desses produtos. Além disso, esse será o primeiro método descrito para a avaliação de desinfetantes sob a forma de gel.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Adaptar e validar um método analítico visando a realização da avaliação da atividade bactericida de desinfetantes à base de álcool etílico a 70 °INPM sob a forma de gel.

2.2 Objetivos específicos

- Eleger o produto utilizado como padrão na validação do método;
- Observar a interferência da matriz (gel sem álcool) sobre o crescimento microbiano;
- Determinar o volume mínimo de desinfetante utilizado no ensaio, bem como o período de incubação ideal;
- Examinar o desempenho do método frente a variações das condições analíticas;
- Analisar a repetibilidade do método.

3 METODOLOGIA

3.1 Determinação do teor de álcool etílico em desinfetantes sob a forma de gel

Para a escolha da amostra padrão de desinfetante, foi feita a determinação da porcentagem de álcool etílico em três desinfetantes de marcas distintas. Essa determinação foi realizada segundo o método desenvolvido pelo Setor de Cosméticos e Saneantes do Departamento de Química do INCQS, descrito no POP 65.3110.094 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019a). A metodologia utilizada se baseia na reação de oxidação do etanol a ácido acético, utilizando uma solução de Dicromato de Potássio P.A. ($K_2Cr_2O_7$) (Sigma[®], St. Louis, Missouri, EUA) e Ácido Sulfúrico P.A. (H_2SO_4) (Merck[®], Darmstadt, Hessen, Alemanha) como agente oxidante.

Para a determinação do teor de álcool etílico, foram pesados 0,36 g da amostra em um balão volumétrico de 100 mL, o volume foi completado com água destilada. Após a homogeneização, uma alíquota de 4 mL foi transferida para um tubo de ensaio e, foram adicionados 5 mL de água destilada e 2 mL da solução ácida de dicromato de potássio. Os tubos foram agitados e incubados em banho termostático (Sieger[®], modelo Stern6) a 60 ± 1 °C pelo período de 30 min. Esse período é necessário para que ocorra a reação entre o etanol e os íons dicromato, formando ácido acético e íons crômico (Cr^{+3}). A solução final passa de um tom amarronzado para uma tonalidade esverdeada, de intensidade proporcional à concentração de íons Cr^{+3} liberados e, conseqüentemente, à concentração de etanol na amostra. Os íons Cr^{+3} formados foram quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 580 nm em espectrofotômetro (Hitachi[®], modelo U-2900). Os resultados obtidos foram comparados a uma curva-padrão realizada com diluições de Etanol P.A. (Merck[®], Darmstadt, Hessen, Alemanha) para o cálculo da quantidade de etanol da amostra (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019a).

3.2 Criopreservação dos micro-organismos teste

O preparo das culturas estoque dos micro-organismos teste seguiu o método descrito no POP 65.3240.008 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE

QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b) sobre a Avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas *Spray* e Aerossol, baseado no método 961.02 da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013). Os micro-organismos utilizados foram os preconizados pelo método, sendo as cepas de referência de *Staphylococcus aureus* CBRVS nº 00039 (ATCC 6538), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CBRVS nº 00028 (ATCC 10708) e *Pseudomonas aeruginosa* CBRVS nº 00025 (ATCC 15442). Todos esses micro-organismos foram fornecidos pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCQS.

O conteúdo da ampola contendo o micro-organismo liofilizado foi ressuscitado em caldo nutriente (CN), para *S. enterica*, ou em caldo tripton de soja (TSB) (Merck®, Darmstadt, Hessen, Alemanha), para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Essa suspensão foi transferida para outro tubo contendo o mesmo meio, o qual foi incubado por 24 ± 2 h a 36 ± 1 °C. Após o crescimento, foram semeadas de 5 a 10 placas de Petri com ágar tripton de soja (TSA), as quais foram incubadas por 24 ± 2 h a 36 ± 1 °C. Após esse período, foram adicionadas a essas placas 5 mL de solução crioprotetora (TSB ou CN com 15% de glicerol). O *pool* da suspensão de todas as placas foi distribuído em frações de 1,0 mL para cada um dos criotubos. Esses criotubos foram mantidos em freezer a -70 °C, onde podem permanecer por até 18 meses (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b). Os meios de cultura CN e TSA foram formulados em laboratório e para a solução crioprotetora foi utilizada Glicerina P.A. (Isifar®, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

3.3 Realização do ensaio

3.3.1 Preparo das culturas-teste

O preparo das culturas teste seguiu o método 961.02 da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013) e do POP 65.3240.008 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b). Um criotubo do micro-organismo a ser empregado no ensaio foi descongelado à temperatura ambiente e 10 µL foram inoculados em um tubo contendo 10 mL de caldo sintético (Difco®, Detroit, Michigan, EUA) para *S. aureus* e *S. enterica*, ou em CN, para

P. aeruginosa. O tubo inoculado foi incubado por 24 ± 2 h a 36 ± 1 °C para a ativação do micro-organismo. Para o preparo da cultura teste final, foram inoculados de um a dois tubos contendo 10 mL de caldo sintético ou caldo nutriente com 10 µL da cultura de 24h. Os novos inóculos foram incubados a 36 ± 1 °C por 48-54 h.

Para a realização dos ensaios, a cultura de 48 h do micro-organismo teste foi agitada por 3-4 segundos. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por cerca de 10 min à temperatura ambiente para a precipitação das células não viáveis. Para *P. aeruginosa*, a cultura teste só deveria ser agitada após a remoção da película de biofilme para evitar a heterogeneidade da carga microbiana entre os carreadores. Após o período de repouso de 10 min, fez-se um *pool* do crescimento microbiano dos tubos, removendo-se a porção superior das culturas bacterianas para um tubo de ensaio 25 x 150 mm estéril. Para *S. aureus* e *S. enterica* ainda foram necessárias diluições da cultura teste nas proporções de 1:2 e 1:3, respectivamente (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

3.3.2 Preparo das lamínulas carreadoras

Os carreadores utilizados para esse ensaio foram as lamínulas de vidro borossilicato (Corning®, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México) de tamanho 24x30 mm. O preparo das lamínulas seguiu o método 961.02 da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013) e do POP 65.3240.008 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b), em que as mesmas foram lavadas com detergente neutro e posteriormente colocadas em solução alcoólica a 70% (p/p) por 30 min. Em seguida, as lamínulas foram secas com gaze e colocadas, individualmente, em placas de Petri contendo uma folha de papel filtro Whatman nº 2, para serem autoclavadas a 121 °C por 20 min.

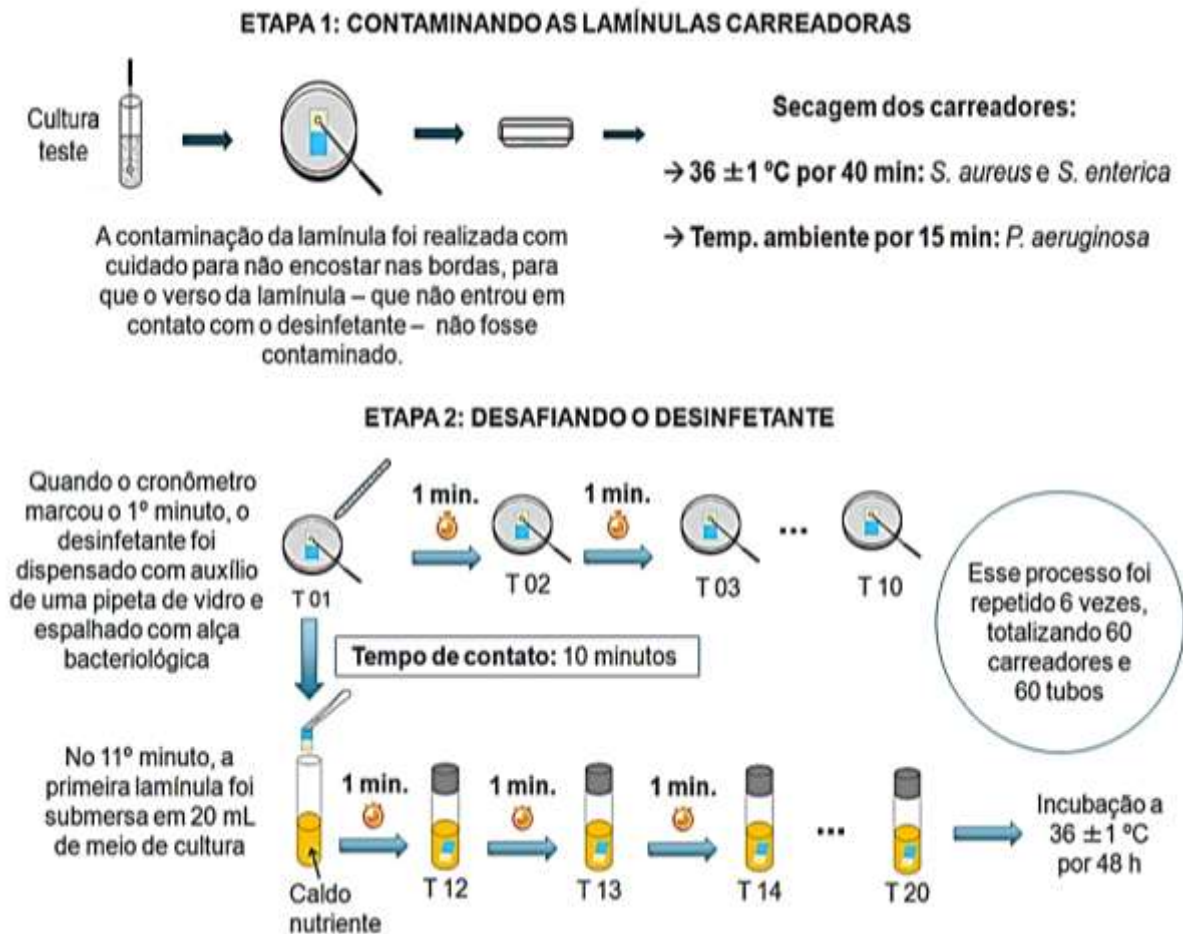
3.3.3 Avaliação da atividade bactericida de álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM

Esse método é uma adaptação do método 961.02 da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013) e do POP 65.3240.008 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b). O

método adaptado consistiu em contaminar 72 lamínulas carreadoras com 10 µL do micro-organismo teste com o auxílio de uma alça bacteriológica de 4 mm de platina, incubando-as a 36 ± 1 °C por 40 min para secagem, no caso de *S. aureus* e *S. enterica*. Para *P. aeruginosa*, a contaminação era realizada em baterias de 12 lamínulas por vez e a secagem ocorreu deixando-se as lamínulas na temperatura ambiente, em cabine de segurança biológica, pelo tempo máximo de 15 min. Após esse período de secagem, os volumes testados de desinfetante foram dispensados sobre os 60 carreadores, em baterias de 10 carreadores por vez, com o auxílio de uma pipeta graduada de vidro, sendo espalhado utilizando-se uma alça bacteriológica de platina, conforme demonstra a Figura 1.

Todo esse processo precisou ser realizado, cronometradamente, de um em um minuto para garantir que o tempo de contato estabelecido pelo fabricante, de 10 min, fosse respeitado. Passado esse intervalo, os carreadores foram submersos, também cronometradamente e com o auxílio de uma pinça de metal estéril, em tubos contendo CN, para neutralizar e paralisar a ação do desinfetante. Os 60 tubos foram incubados a 36 ± 1 °C pelo período de 48 h para a confirmação da ação antimicrobiana do produto. O ensaio foi incubado pelo período de 72 h apenas nos testes em que se avaliou o impacto do período de incubação sobre o desempenho do método. Os 12 carreadores excedentes em cada teste eram utilizados para a contagem da carga microbiana das lamínulas ou para reserva, em casos de contaminação acidental e reteste (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

Figura 1 - Avaliação da atividade bactericida do álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM.



Fonte: Da autora, 2020.

3.3.4 Interpretação dos resultados

O resultado foi considerado satisfatório quando pelo menos 59 dos 60 tubos testados permaneceram negativos para crescimento microbiano, para um nível de confiança de 95%. A confirmação dos tubos positivos se deu pela coloração de Gram e a semeadura em meio seletivo. Foram utilizados os meios ágar manitol salgado (Ionlab®, Araucária, Paraná, Brasil), ágar *Salmonella-Shigella* (Ionlab®, Araucária, Paraná, Brasil) e ágar cetrimida (Titan Biotech LTD®, Bhiwadi, Rajasthan, Índia) para a confirmação dos micro-organismos *S. aureus*, *S. enterica* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Em alguns casos, a prova da coagulase foi realizada para a confirmação de *S. aureus* (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL

CHEMISTS, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

3.3.5 Validação dos resultados do ensaio

3.3.5.1 Contagem da carga microbiana das lamínulas carreadoras

A partir do estudo de Pines *et al.* (2013), uma etapa de contagem das células viáveis dos carreadores foi incluída ao método 961.02 da AOAC (2013). Em razão disso, para que o resultado fosse considerado válido, a contagem da carga microbiana das lamínulas carreadoras deveria estar dentro de uma faixa pré-estabelecida. Foram realizados diversos experimentos objetivando a reprodução desta etapa para todos os micro-organismos empregados no ensaio, antes mesmo de se iniciar a validação do método de avaliação da atividade bactericida do álcool etílico sob a forma de gel, ou seja, a realização do ensaio propriamente dito. Inicialmente, houve dificuldade de se reproduzir esta etapa apenas para *P. aeruginosa* e, somente com a realização do experimento para a análise do efeito matriz, durante a validação do método proposto, é que se identificou a necessidade da realização de adaptações com relação ao tempo e temperatura de secagem das lamínulas carreadoras.

Para verificar a carga microbiana dos carreadores, a contagem de bactérias viáveis foi realizada em uma a cada dez lamínulas carreadoras, totalizando seis lamínulas para cada ensaio. Após a secagem, cada lamínula foi colocada, individualmente, em tubos contendo 20 mL de caldo Letheen (BD®, Sparks, Nevada, EUA). Os tubos foram agitados e realizaram-se diluições seriadas, em solução tampão fosfato diluído, até o fator 1:1000 (10^{-3}) ou 1:10000 (10^{-4}), no caso de *S. aureus*. Alíquotas de 0,1 mL das três últimas diluições foram plaqueadas em duplicata em TSA pela técnica *spread plate* ou espalhamento. As placas foram incubadas por 48 h a 36 ± 1 °C (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), em que apenas as placas com menos de 300 UFC eram consideradas para o cálculo. Para o cálculo da média geométrica da densidade de micro-organismos nas lamínulas carreadoras (\log_M), utilizou-se a fórmula da Equação 1 para se obter o valor de UFC/mL. Para se estimar o número de UFC/carreador, o valor encontrado pela aplicação da equação supracitada era

multiplicado por vinte e o \log_{10} era finalmente calculado. O valor de \log_M precisaria estar entre 5,0 e 6,5 para os micro-organismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para *S. enterica* o \log_M deveria estar entre 4,0 e 5,5. No entanto, na interpretação dos resultados considerou-se que um valor de \log_M acima do preconizado pelo método não invalidaria o ensaio, desde que não houvesse crescimento microbiano em mais de um tubo. Da mesma forma, um \log_M abaixo do preconizado exigia a repetição do ensaio, por mais que o crescimento microbiano tivesse sido negativo em todos os tubos (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

Equação 1 - Fórmula para calcular a média geométrica da densidade de micro-organismos nas lamínulas carreadoras

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{média UFC diluição } 10^{-x}) + (\text{média UFC diluição } 10^{-y}) + (\text{média UFC diluição } 10^{-z})}{10^{-x} + 10^{-y} + 10^{-z}}$$

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b.

3.3.5.2 Testes de esterilidade e de viabilidade dos meios de cultura

Além da contagem, todos os materiais envolvidos no ensaio foram testados quanto a sua esterilidade, conforme preconiza o POP 65.3240.008 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b). Esses materiais envolviam os meios de cultura, a solução tampão fosfato diluída, os lotes de pipetas e os lotes dos carreadores. Para testar a esterilidade dos meios de cultura, um dos tubos ou placas contendo o meio foi incubado a 36 ± 1 °C pelo período de 48 h. Para o teste de esterilidade da solução tampão fosfato diluído, um volume de 0,2 mL foi inoculado em um tubo contendo 10 mL de CN. Esse tubo também foi incubado a 36 ± 1 °C pelo período de 48 h.

Para o teste de esterilidade das pipetas, uma pipeta de cada lote utilizado no ensaio foi selecionada aleatoriamente e, com o auxílio de um pipetador automático, realizou-se a aspiração de CN até acima da marcação da graduação, permitindo-se a saída do caldo para o mesmo tubo. Esse procedimento foi repetido três vezes. O tubo foi incubado a 36 ± 1 °C por 48 h. Para o teste de esterilidade das lamínulas carreadoras, uma lamínula estéril foi colocada em um tubo contendo 20 mL do CN.

Esse tubo também foi incubado a 36 ± 1 °C por 48 h. Para que os resultados fossem considerados satisfatórios, nenhum dos tubos incubados poderia apresentar turvação após o período de incubação. A turvação de um dos tubos caracterizaria a invalidação do meio de cultura ou do lote de vidraria que foi utilizado, além de invalidar o resultado do ensaio (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

Os meios de cultura também foram testados com relação a sua viabilidade. Para o CN, uma das lamínulas carreadora inoculada com o micro-organismo teste era colocada dentro do tubo. Para os demais meios de cultura, cerca de 10 µL do micro-organismo teste era inoculado ou semeado por esgotamento no restante dos meios de cultura utilizados no ensaio: caldo sintético e TSA. Todos os meios eram incubados junto com o ensaio, na temperatura de 36 ± 1 °C pelo tempo de 48 h. Para que o teste de viabilidade do meio fosse considerado satisfatório, deveria haver crescimento de bactérias após o período de incubação. O não crescimento dos micro-organismos invalidaria o ensaio (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

3.3.5.3 Confirmação da neutralização do desinfetante

Uma última forma de validar os experimentos era realizada após a leitura do resultado do ensaio por meio da confirmação da neutralização do desinfetante. Essa confirmação foi realizada conforme o recomendado por Parshionikar *et al.* (2016), em que 6 dos 60 tubos testados em cada ensaio foram inoculados com 5-100 bactérias do micro-organismo empregado no ensaio. Para que o resultado do teste fosse considerado válido, esses tubos deveriam apresentar-se turvos após o período de incubação de 24 h a 36 ± 1 °C.

3.4 Validação do método analítico

Os parâmetros eleitos para a validação do método seguiram o capítulo nº 1223 da *United States Pharmacopeia* (USP, 2016) e o guia elaborado pelo *Analytical Laboratory Accreditation Criteria Committee* (ALACC) da AOAC (WEITZEL *et al.*, 2007). São eles:

- Efeito matriz: Para a avaliação desse parâmetro, foram realizados testes com 10 replicatas utilizando 100 µL da matriz sem o analito – apenas o gel– para cada um dos micro-organismos teste. A confirmação dos tubos positivos se deu pela coloração de Gram e semeadura em meio seletivo, conforme já descrito no item 3.3.4. A matriz do desinfetante utilizada nesse estudo foi fornecida pelo próprio fabricante do produto, sendo constituída de água e espessante.
- Robustez: As variáveis consideradas para avaliar a robustez do método foram 1) o volume de desinfetante utilizado na execução do método; 2) o tempo de incubação; 3) variação de equipamento; e 4) variação de analistas.

Para a análise da interferência da variação do volume de desinfetante, foram realizados ensaios utilizando três volumes diferentes de produto (50 µL, 80 µL e 100 µL) para cada um dos micro-organismos teste. Esses ensaios foram realizados em duplicata para cada volume. Os resultados foram avaliados nos tempos de incubação de 24 h, 48 h e 72 h para a avaliação da interferência dessa variável sobre o desempenho do método.

Para a análise de variação de equipamento três ensaios foram realizados, um para cada micro-organismo teste, e incubados em estufa bacteriológica da marca LUFERCO®, modelo 1179. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados obtidos nos ensaios realizados para a avaliação dos outros parâmetros, os quais foram incubados em estufa bacteriológica da marca FANEM®, modelo 095E. Para a análise da variação de analistas, dois analistas, um com experiência prévia em análises microbiológicas de saneantes e outro sem experiência, executaram o procedimento. Foram realizados seis ensaios ao todo, sendo três ensaios para cada analista e um ensaio por micro-organismo.

- Repetibilidade: Para a avaliação desse parâmetro, os ensaios foram repetidos três vezes para cada um dos micro-organismos teste.

4 RESULTADOS

4.1 Escolha do produto padrão para a validação do método

Na determinação do teor de álcool etílico dos três produtos desinfetantes eleitos para o estudo, o produto A apresentou uma concentração igual a 69,09% de etanol, e os produtos B e C apresentaram 68,29% e 63,70% de etanol em sua composição, respectivamente. O produto A foi escolhido como o produto padrão para a validação do método analítico, uma vez que sua concentração de álcool etílico esteve muito próxima do ideal de 70 °INPM.

4.2 Validação do método analítico

4.2.1 Avaliação do efeito matriz

Os resultados dos experimentos realizados com a matriz do desinfetante (gel sem álcool) estão no Quadro 4. Esses dados demonstraram que não há interferência da matriz sobre a ação bactericida do álcool etílico, bem como não há inibidores do crescimento microbiano, uma vez que houve turvação do meio de cultura nos dez carreadores testados para cada micro-organismo. Além disso, as identidades dos micro-organismos foram confirmadas pelo método da coloração de Gram e pela semeadura em meios seletivos. Para *S. aureus*, ainda foi realizado a prova da coagulase como prova complementar, que se apresentou positiva após o período de incubação de 4 h.

Para a bactéria *P. aeruginosa*, uma adaptação teve de ser realizada com relação ao tempo e temperatura de secagem das lamínulas carreadoras contaminadas. Em testes prévios com a matriz do desinfetante, observou-se que o micro-organismo não se mantinha viável após o tempo de secagem de 40 min em estufa bacteriológica a 36 ± 1 °C. Dessa forma, outros tempos e temperaturas de secagem dos carreadores foram testados para se determinar qual seria o esquema de secagem que possibilitaria a viabilidade das dez lamínulas analisadas com a matriz do desinfetante. Os resultados desses experimentos são demonstrados na Tabela 1.

Quadro 4 – Interferência da matriz do produto sobre o crescimento microbiano.

Micro-organismo	Nº de tubos positivos	Coloração de Gram	Avaliação em meio seletivo	Prova da coagulase
<i>Salmonella enterica</i>	10	Presença de BGN	Colônias transparentes com centro negro em ágar SS	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	Presença de BGN	Colônias com halo esverdeado em ágar Cetrimide	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	Presença de CGP	Colônias com halo amarelo em ágar Manitol Salgado	Positivo

Legenda: Nº - Número. BGN – Bastonetes Gram-negativos. CGP – Cocos Gram-positivos. SS – Ágar *Salmonella-Shigella*.

Fonte: Da autora, 2020.

Tabela 1 – Esquemas de secagem dos carreadores para *Pseudomonas aeruginosa*

VARIÁVEIS	Tempo de secagem	40 min.	17 min.	15 min.	10 min.
	Temperatura de secagem	36 ± 1 °C	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente
RESULTADOS	Número de carreadores viáveis	7	9	10	10
	Log _M dos carreadores	4,6	5,6	5,9	5,9
	Resultado da contagem	NC	C	C	C

Legenda: Log_M – Densidade logarítmica média. NC – não conforme. C – conforme.

Fonte: Da autora, 2020.

Concluiu-se que a melhor condição de secagem dos carreadores para esse micro-organismo era na temperatura ambiente pelo tempo máximo de 15 min. Essas condições permitiram que as lamínulas secassem quase que completamente, minimizando o risco de se produzir aerossóis ou respingos contaminados na hora da aplicação do desinfetante. Ao mesmo tempo garantiu que todas as lamínulas testadas contivessem bactérias viáveis, uma vez que houve turvação nos dez tubos testados. Além disso, a contagem da densidade média de micro-organismos esteve entre 5,0 e 6,5, conforme é estabelecido pelos critérios de conformidade do método.

4.2.2 Avaliação da robustez do método

4.2.2.1 Variação do volume de desinfetante e do tempo de incubação

Os experimentos realizados para avaliar a interferência do volume do desinfetante sobre o desempenho do método permitiram que fosse definido o volume mínimo de desinfetante a ser aplicado sobre cada carreador. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada volume, além de serem lidos nos tempos de incubação de 24 h, 48 h e 72 h para avaliar a robustez do método perante a essa variação. Os dados gerados podem ser verificados na Tabela 2.

Uma atividade bactericida satisfatória foi obtida a partir do volume de 50 μL para as bactérias *S. enterica* e *P. aeruginosa*. Já para *S. aureus*, a atividade bactericida foi satisfatória a partir do volume de 80 μL , no entanto, o método apresentou um desempenho melhor quando se usou 100 μL de desinfetante (Tabela 2). O microorganismo *S. aureus* foi, portanto, menos susceptível ao álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM que *S. enterica* e *P. aeruginosa*. Dessa forma, o volume de 100 μL foi definido como o volume padrão de desinfetante a ser adicionado nas lamínulas carreadoras para a execução do ensaio de avaliação da atividade bactericida de álcool etílico sob a forma de gel a 70 °INPM.

Todos esses resultados mantiveram-se robustos para os tempos de incubação de 24 h, 48 h e 72 h. No entanto, no tempo de incubação de 24 h os tubos que continham pouca carga microbiana poderiam não turvar, como foi verificado no resultado de um dos ensaios de *S. aureus*, para o volume de desinfetante de 50 μL (Tabela 2). O tempo de incubação de 72 h também não era adequado, pois, principalmente para as BGN, as colônias ficavam muito grandes, o que aumenta a chance de erros na contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Sendo assim, o tempo de 48 h foi adotado como o tempo ideal de incubação para a leitura e interpretação dos resultados do ensaio.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios utilizando diferentes volumes de desinfetante.

Micro-organismo	Volume de desinfetante	Nº de tubos positivos			Log _M dos carreadores			Resultado
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
<i>Salmonella enterica</i>	50 µL	0	0	0	5,2	5,3	5,3	S / S / S
		0	0	0	5,2	5,2	5,2	S / S / S
	80 µL	0	0	0	5,6	5,6	5,6	S / S / S
		0	0	0	4,8	4,8	4,8	S / S / S
	100 µL	0	0	0	5,1	5,1	5,1	S / S / S
		0	0	0	4,9	4,9	4,9	S / S / S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 µL	0	0	0	5,3	5,3	5,3	S / S / S
		0	0	0	5,5	5,5	5,5	S / S / S
	80 µL	0	0	0	5,1	5,2	5,2	S / S / S
		0	0	0	5,5	5,6	5,6	S / S / S
	100 µL	0	0	0	5,3	5,3	5,3	S / S / S
		0	0	0	5,7	5,7	5,7	S / S / S
<i>Staphylococcus aureus</i>	50 µL	4	5	5	6,5	6,5	6,5	I / I / I
		5	5	5	6,5	6,5	6,5	I / I / I
	80 µL	1	1	1	6,5	6,5	6,5	S / S / S
		1	1	1	6,6	6,6	6,6	S / S / S
	100 µL	1	1	1	6,4	6,5	6,5	S / S / S
		0	0	0	6,4	6,4	6,4	S / S / S

Legenda: N^o - Número. Log_M – Densidade logarítmica média. I – Insatisfatório. S – Satisfatório.
 Fonte: Da autora, 2020.

Os resultados de todos os ensaios realizados foram validados pela contagem da carga microbiana dos carreadores, que esteve dentro dos critérios estabelecidos pelo método. Além disso, os resultados dos testes de esterilidade das vidrarias e meios de cultura utilizados nos ensaios também foram satisfatórios, bem como os testes de viabilidade dos meios de cultura. A confirmação da neutralização do desinfetante também forneceu resultados conformes em todas as análises.

4.2.2.2 Variação de equipamento: incubação em diferente estufa bacteriológica

O método também foi avaliado com relação ao seu desempenho frente a um diferente equipamento. Nesse caso, foi escolhida a estufa bacteriológica por ser um dos equipamentos mais críticos necessários para a realização do ensaio. Foram realizados três ensaios, um para cada micro-organismo, para o equipamento avaliado.

A estufa avaliada era da marca LUFERCO®, modelo 1179 e seus resultados foram comparados aos resultados obtidos quando se utilizou a estufa da marca FANEM®, modelo 095E – que já estava sendo utilizada em ensaios anteriores para validação de outros parâmetros. No entanto, cabe ressaltar que a temperatura de incubação permaneceu a mesma utilizada nos ensaios anteriores. Na Tabela 3 é possível observar os resultados obtidos durante as análises.

Tabela 3 – Resultados dos ensaios incubados na estufa LUFERCO® modelo 1179.

Micro-organismos	Nº de carreadores positivos	Log _M dos carreadores	Resultado
<i>Salmonella enterica</i>	0	4,9	Satisfatório
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	5,6	Satisfatório
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	6,3	Satisfatório

Legenda: Nº - Número. Log_M – Densidade logarítmica média.

Fonte: Da autora, 2020.

Para todos os ensaios realizados os resultados foram satisfatórios para os três micro-organismos empregados no ensaio, uma vez que não houve turvação em nenhum dos tubos. Além disso, a contagem da carga microbiana média dos carreadores esteve dentro dos limites estabelecidos pelo método. Os testes de esterilidade, viabilidade e a confirmação da neutralização também forneceram resultados conformes para todos os ensaios. Perante esses resultados, pode-se concluir que o método se manteve robusto frente à variação do equipamento utilizado para incubação.

4.2.2.3 Variação dos analistas para a execução do método

Os ensaios realizados para avaliar o impacto da variação dos analistas sobre o desempenho do método foram realizados sob as mesmas condições de medição, como condições ambientais, lotes de meio de cultura e equipamentos, variando-se somente os analistas. Os experimentos foram realizados com dois diferentes analistas: o primeiro, sem experiência prévia com testes de eficácia microbiológica de saneantes, e o segundo analista, que já possuía uma prática com esse tipo de ensaio. Os resultados foram satisfatórios para os três micro-organismos empregados no ensaio e para cada um dos analistas (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da variação dos analistas sobre o desempenho do método

	Micro-organismos	Nº de carreadores positivos	Log _M dos carreadores	Resultado
Analista 1	<i>Salmonella enterica</i>	0	4,3	Satisfatório
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	6,3	Satisfatório
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	6,0	Satisfatório
Analista 2	<i>Salmonella enterica</i>	0	4,6	Satisfatório
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	6,6	Satisfatório
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	6,2	Satisfatório

Legenda: Nº - Número. Log_M – Densidade logarítmica média.

Fonte: Da autora, 2020.

A contagem da carga microbiana média dos carreadores também esteve dentro dos limites estabelecidos pelo método. Além disso, os resultados dos testes de esterilidade, viabilidade e a confirmação da neutralização foram satisfatórios. Sendo assim, de acordo com esses dados pode-se afirmar que os dados obtidos demonstram que o método é de fácil execução e manteve-se robusto frente à alteração dos laboratoristas que executaram o experimento.

4.2.3 Avaliação da repetibilidade do método

A repetibilidade do método foi verificada por meio da realização de três ensaios para cada micro-organismo. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições de medição, como mesmo analista, mesmos instrumentos, mesmas

condições ambientais e mesmos lotes dos meios de cultura. Os resultados apresentaram-se concordantes com relação ao número de tubos negativos para todos os micro-organismos utilizados no ensaio, conforme é possível examinar na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da avaliação da repetibilidade do método

Micro-organismos	Ensaio	Nº de carreadores positivos	Log _M dos carreadores	Resultado
<i>Salmonella enterica</i>	I	0	5,6	Satisfatório
	II	0	5,4	Satisfatório
	III	0	5,7	Satisfatório
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I	0	5,5	Satisfatório
	II	0	6,3	Satisfatório
	III	0	5,1	Satisfatório
<i>Staphylococcus aureus</i>	I	0	6,2	Satisfatório
	II	0	6,2	Satisfatório
	III	0	6,4	Satisfatório

Legenda: Nº - Número. Log_M – Densidade logarítmica média.

Fonte: Da autora, 2020.

A contagem da carga microbiana média dos carreadores também esteve dentro dos limites estabelecidos pelo método. Os testes de esterilidade, viabilidade e a confirmação da neutralização também estavam em conformidade, fornecendo, portanto, um resultado satisfatório para todos os ensaios realizados.

5 DISCUSSÃO

O principal objetivo desse trabalho foi adaptar e validar um método da AOAC para que fosse possível a realização dos testes de eficácia microbiológica de desinfetantes de uso geral e de uso hospitalar para superfícies fixas e artigos não críticos à base de álcool etílico sob a forma de gel. A importância desse método está na possibilidade da realização do monitoramento da qualidade desses produtos por parte dos órgãos públicos ligados à vigilância sanitária.

A validação desse método já havia sido pretendida anteriormente à realização do presente estudo. No entanto, na época ainda não havia um método químico que pudesse medir o teor alcoólico dos desinfetantes, o que impossibilitava a escolha de um produto padrão. A eleição de um produto com concentração muito próxima a 70% (p/p) foi fundamental para a validação do método microbiológico, pois garantiu a confiabilidade dos resultados. Por isso, a partir do desenvolvimento do método de quantificação do etanol em gel pelo Departamento de Química do INCQS, a retomada dos ensaios de validação desse método tornou-se factível.

Dos três produtos em que se determinou o teor de álcool etílico presente no gel, apenas dois estavam de acordo com o que preconiza a RDC nº 59/2010. Essa resolução estabelece que os produtos saneantes que declaram teor de princípio ativo maior ou igual a 50% têm uma variação máxima permitida de 2,5% do valor declarado na embalagem (BRASIL, 2010a). Tratando-se do etanol a 70% (p/p), essa variação estaria entre 68,25% e 71,75%. O teor de álcool etílico dos produtos A, B e C foram de 69,09%, 68,29% e 63,70%, respectivamente. Sendo assim, o produto C seria reprovado em uma análise fiscal antes mesmo de ser analisado com relação à sua eficácia antimicrobiana, embora a ação bactericida do álcool etílico possa estar entre 60-95% (ALI *et al.*, 2001; HARRINGTON; WALKER, 1903; MORTON, 1950; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). O produto A foi o que mais se aproximou da concentração ideal de 70 °INPM e por isso foi escolhido como o produto padrão para a realização dos estudos de validação do método.

As espécies de micro-organismos escolhidos para o estudo basearam-se na legislação brasileira e as cepas foram escolhidas com base no método 961.02 da AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 2013). A RDC nº 14/2007 estabelece que os micro-organismos empregados nos testes de

eficácia dos desinfetantes de uso geral são *S. aureus* e *S. enterica*. Para os desinfetantes de uso hospitalar para superfícies fixas e artigos não críticos, além desses dois micro-organismos, o produto ainda deve ser testado frente à bactéria *P. aeruginosa* (BRASIL, 2007).

S. aureus é um coco Gram-positivo, coagulase-positivo, sendo a mais importante espécie estafilocócica. Esse micro-organismo pode crescer bem em ambientes com alta pressão osmótica e baixa umidade, sendo comumente encontrado nas secreções nasais e na pele. Possui a capacidade de produzir muitas toxinas que aumentam sua patogenicidade e capacidade de invadir e danificar tecidos. Suas toxinas são importantes causadoras de intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Além disso, esse micro-organismo é responsável por infecções de cortes cirúrgicos em pacientes hospitalizados. Além disso, cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são importantes causadoras de IRAS e são comumente encontradas como contaminantes de superfície em estabelecimentos que prestam assistência à saúde (CHAQUI et al., 2019; MAMISHI et al., 2019).

Bactérias da espécie *S. enterica* são bastonetes Gram-negativos encontrados na microbiota de aves domésticas e répteis, sendo infeccioso para animais de sangue quente (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Até o momento, são descritos para essa espécie 2.637 sorovares ou sorotipos (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). A doença causada por *S. enterica* é denominada salmonelose e ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Os sintomas incluem náuseas, dores abdominais, diarreia e febre moderada. Nos casos graves, a bactéria pode transpassar a mucosa intestinal e chegar ao sistema linfático e circulatório, causando a morte devido ao choque séptico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

P. aeruginosa é um bastonete Gram-negativo geralmente encontrado no solo, na água e em outros ambientes úmidos. É um micro-organismo oportunista, pois causa doença em hospedeiros imunossuprimidos, sendo um importante patógeno hospitalar (MADIGAN et al., 2010). Pode causar infecções no trato urinário, queimaduras e feridas, além de abscessos, meningites e septicemias. Em pacientes com fibrose cística, causa importante infecção nos pulmões, podendo levar os pacientes a óbito (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Possui uma membrana externa 100 vezes menos permeável que a bactéria *Escherichia coli* (MADIGAN et al., 2010),

o que lhe confere uma importante resistência à antibióticos e desinfetantes, principalmente no ambiente hospitalar.

A validação de um método analítico é uma etapa importante para a garantia dos resultados. A escolha dos parâmetros a serem analisados é realizada pelo próprio laboratório que realiza a validação e vai depender do tipo de método que está sendo avaliado. Contudo, para os testes de eficácia de desinfetantes, existe uma série de fatores que devem ser considerados na validação de um método, pois esses fatores podem interferir de maneira significativa na ação antimicrobiana dos produtos e, conseqüentemente, nos resultados dos ensaios bacteriológicos (PARSHIONIKAR *et al.*, 2016).

Uma das fontes de erro nos resultados em testes de eficácia de desinfetantes que utilizam carreadores é a perda da viabilidade das bactérias Gram-negativas (CREMIEUX; FRENEY; DAVIN-REGLI, 2001), em especial, *P. aeruginosa* (MAILLARD, 2016). Isso foi confirmado pelos resultados da avaliação do efeito matriz para esse micro-organismo, que perdeu a sua viabilidade nos carreadores submetidos à secagem em estufa a 36 °C por 40 min. *P. aeruginosa* é um micro-organismo que vive em ambientes úmidos e que não resiste ao ressecamento, mesmo sendo uma bactéria formadora de biofilme (BROOKS *et al.*, 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

O volume de aplicação é reconhecido como uma variável importante para a antissepsia das mãos (GORONCY-BERMES; KOBURGER; MEYER, 2010), mas não é citado como um dos interferentes da ação antimicrobiana dos produtos desinfetantes (CREMIEUX; FRENEY; DAVIN-REGLI, 2001; MAILLARD, 2016; SPRINGTHORPE; SATTAR, 2005). No presente estudo, verificou-se que, tratando-se de uma substância volátil, o volume de álcool etílico utilizado para a desinfecção é uma variável tão importante quanto a concentração ou o tempo de contato. Isso porque os ensaios de variação do volume do produto para o micro-organismo *S. aureus* forneceu um resultado insatisfatório, mas não porque o produto era ineficaz, e sim porque a carga microbiana no carreador era desproporcional à quantidade de desinfetante aplicado para destruí-la. O volume de desinfetante a ser usado está, possivelmente, diretamente relacionado à eficácia do produto e deve ser levado em consideração nos ensaios de avaliação da atividade bactericida desses produtos.

Interferência semelhante foi encontrada por Pidot *et al.* (2018), uma vez que o uso de um volume insuficiente de desinfetante foi considerado como um dos

causadores do aumento da tolerância de *Enterococcus faecium* à desinfetantes a base de álcool no ambiente hospitalar. Nos experimentos de Steinhauer *et al.* (2019), o volume de desinfetante à base de álcool utilizado em superfícies contaminadas prejudicou significativamente a ação antimicrobiana do produto. Nesse estudo, volumes de 8 mL, 16 mL e 24 mL foram aplicados sobre uma superfície de PVC previamente contaminada com *Enterococcus hirae* ATCC 10541. O volume de 8 mL resultou em uma redução logarítmica de $3,58 \pm 1,03$ do número de micro-organismos viáveis, enquanto os volumes de 16 mL e 24 mL resultaram em um fator de redução logarítmico maior que 5,00 (STEINHAUER *et al.*, 2019).

Diferentes micro-organismos possuem diferentes susceptibilidades aos agentes microbicidas. As bactérias Gram-negativas possuem uma susceptibilidade menor aos agentes bactericidas (BLOCK, 2001; HERNANDÉZ-NAVARRETE, 2014; MAILLARD, 2016), devido à composição de sua parede celular. A parede celular das bactérias Gram-negativas possui uma membrana externa que é formada por uma camada interna de fosfolípidios e uma camada externa espessa de lipopolissacarídeos (BROWN *et al.*, 2015; MADIGAN *et al.*, 2010). Apesar de sua natureza química, essa membrana é altamente impermeável às substâncias de natureza hidrofóbica. Entretanto, as moléculas hidrofílicas podem permear facilmente essa membrana externa, por meio de estruturas denominadas de porinas (MADIGAN *et al.*, 2010). Os álcoois diluídos podem, portanto, penetrar facilmente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, alterando a sua composição lipídica e afetando a sua fluidez (HUFFER *et al.*, 2011).

Apesar da parede celular das bactérias Gram-positivas não possuir uma camada externa como a das Gram-negativas, esses micro-organismos apresentam uma grossa camada de peptidoglicanos, que é dissolvida com certa dificuldade pelos álcoois (BROWN *et al.*, 2015; HUFFER *et al.*, 2011). Em contrapartida, as bactérias Gram-negativas possuem uma camada de peptidoglicanos mais fina que a das bactérias Gram-positivas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Todos esses fatores reunidos parecem contribuir para que o álcool etílico desempenhe sua ação bactericida de maneira mais rápida e eficaz sobre as bactérias Gram-negativas, uma vez que, no presente estudo, a bactéria *S. aureus* (cocos Gram-positivos) demonstrou ser menos susceptível ao etanol que as bactérias *S. enterica* e *P. aeruginosa* (bastonetes Gram-negativos).

Resultados semelhantes foram encontrados por Morton (1950), que examinou a atividade bactericida de várias concentrações de álcool etílico contra uma variedade de micro-organismos, em períodos de exposição que variaram de 10 segundos a 1 hora. A bactéria *P. aeruginosa* demonstrou ser altamente suscetível ao etanol, uma vez que perdeu sua viabilidade no tempo de contato de 10 segundos por concentrações de etanol que variaram de 30% a 100% (v/v). Os micro-organismos Gram-positivos demonstraram menor susceptibilidade, uma vez que as bactérias *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes* foram destruídos no tempo de contato de 10 segundos pelas concentrações de 60% a 95% (v/v) de etanol (MORTON, 1950).

O estudo de Salvage *et al.* (2014) baseou-se em testar diversas concentrações de desinfetantes à base de álcool na forma líquida para bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas, por meio de um método padronizado pelo Comitê Europeu de Normatização (CEN). De acordo com o estudo, concentrações de 42 e 44% (v/v) de etanol foram necessárias para a obtenção de uma atividade bactericida satisfatória frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus hirae*, respectivamente. As bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* demonstraram maior susceptibilidade ao álcool etílico, uma vez que foram destruídas com concentrações de 37 e 39% (v/v) (SALVAGE *et al.*, 2014).

Apesar das diferenças entre as características físicas do álcool etílico na forma de gel e do mesmo princípio ativo na forma líquida, a atividade bactericida de produtos antissépticos sob essas duas formas de apresentação foi equivalente na pesquisa realizada por Hernandes *et al.* (2004). O álcool em gel foi um antisséptico tão eficaz quanto o álcool etílico a 70% na forma líquida para remover cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* das mãos contaminadas de voluntários (HERNANDES *et al.* (2004).

O estudo de Wilkinson *et al.* (2018) comparou as diferentes formas de apresentação do álcool etílico com relação à sua eficácia e tempo de secagem. Os resultados demonstraram que o produto na forma de gel teve um tempo secagem moderadamente maior que o produto na forma líquida, embora isso não tenha influenciado a sua eficácia antimicrobiana. O álcool etílico a 80% sob a forma de gel foi tão eficaz quanto a substância de mesma concentração na forma líquida para a destruição de *Escherichia coli* das mãos de voluntários (WILKINSON *et al.*, 2018).

A validação do método frente a diferentes equipamentos, tempos de incubação e analistas demonstrou que nenhuma dessas variáveis é capaz de interferir, de maneira significativa, em seu desempenho. Além disso, um excelente desempenho foi obtido nas análises de repetibilidade. O método proposto é, portanto, robusto, de fácil compreensão e execução, além de possuir um custo relativamente baixo uma vez que não necessita de equipamentos ultramodernos ou de *softwares* sofisticados. Isso é muito importante, pois torna o método fácil de ser implantado pelos órgãos públicos. Além disso, a validação desse método também possibilita a futura adaptação visando o monitoramento da qualidade de desinfetantes à base de outros princípios ativos, como é o caso de produtos à base de cloro e amônio quaternário que estão sendo produzidos e comercializados sob a forma de gel no Brasil.

6 CONCLUSÕES

1. Dos três produtos dispostos à venda escolhidos para a realização da medição de teor alcoólico, apenas dois estavam de acordo com a legislação brasileira. O produto A foi eleito como o desinfetante padrão para a realização do processo de validação por apresentar teor alcoólico muito próximo do ideal de 70 °INPM;
2. A matriz do desinfetante provou não ser um interferente dos resultados da avaliação bactericida do produto, uma vez que houve crescimento de micro-organismos nos tubos testados quando se utilizou o gel sem álcool como amostra;
3. Para a bactéria *P. aeruginosa* adaptações foram realizadas para a secagem das lamínulas carreadoras. A secagem à temperatura ambiente pelo tempo máximo de 15 min possibilitou que o micro-organismo não perdesse sua viabilidade, o que conseqüentemente não afetou o desempenho do método;
4. O volume de desinfetante é um fator importante a ser considerado na avaliação da atividade antimicrobiana de um produto. Durante os testes, volumes abaixo de 80 µL forneceram resultados insatisfatórios para a bactéria *Staphylococcus aureus* devido à falta de proporção entre a quantidade do produto e carga microbiana dos carreadores. O volume de 100 µL de desinfetante foi considerado o volume mínimo estabelecido para ser dispensado nas lamínulas carreadoras durante a realização do método analítico;
5. O método adaptado apresentou bom desempenho frente ao parâmetro de repetibilidade e às variações de período de incubação, analistas e equipamentos, sendo, portanto, considerado robusto.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Álcool líquido vai desaparecer dos mercados em seis meses. **Informe e Saúde**, ano VI, n. 152, fev. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Brasília: ANVISA, 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271892/Manual+de+Limpeza+e+Desinfec%C3%A7%C3%A3o+de+Superf%C3%ADcies/1c9cda1e-da04-4221-9bd1-99def896b2b5>. Acesso em: 23 jan. 2020.

ALDUNATE, J. L. C. B. *et al.* Análise de 10 anos de casos de queimaduras por álcool com necessidade de internação em hospital quaternário. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 4, p. 220-225, 2012.

ALI, Y. *et al.* Alcohols. *In*: BLOCK, S.S. (ed). **Disinfection, sterilization and preservation**. 5. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 229-253.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Method 961.02. *In*: **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Gaithersburg, MD: AOAC, 2013.

BLOCK, S. S. (ed). **Disinfection, sterilization and preservation**. 5. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

BOYCE, J. M. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, p. 50–54, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 652, de 22 de fevereiro de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 fev. 2013. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/51234077/dou-secao-1-25-02-2013-pg-47>. Acesso em: 23 jan. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 mar. 2007. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_14_2007.pdf/3eda65f3-5e07-40b5-b3fb-c85bfdcabec6. Acesso em 23 jan. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 313, de 10 de outubro de 2019. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33868/3233596/68+-+RDC+N%C2%BA+314-2019-DOU.pdf/df982a49-6356-40ca-be1c-7d87d46b4391>. Acesso em 23 jan. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010b. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 ago. 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0035_16_08_2010.html. Acesso em: 23 jan. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 13 de agosto de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 ago. 2009. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_42_2009_COMP.pdf/62101d29-c194-4819-8e9d-8228b682299f. Acesso em: 23 jan. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 fev. 2002. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_46_2002_COMP.pdf/172719b2-114a-413f-82b7-7272feaca832?version=1.0. Acesso em 23 jan. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010a. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 dez. 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0059_17_12_2010.pdf/194ebbe3-15ea-4817-b472-f73cc76441c2. Acesso em 23 jan. 2020.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 set. 1976. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6360.htm. Acesso em: 23 jan. 2020.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 set. 1990. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm. Acesso em: 23 jan. 2020.

BROOKS, G. F. *et al.* **Microbiologia médica de Jawtz, Melnick e Adelberg**. 26.ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BROWN, L. *et al.* Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.

BRYANT, K. A.; PEARCE, J.; STOVER, B. Flash fire associated with the use of alcohol-based antiseptic agent. **American Journal of Infection Control**, v. 30, n. 4, p. 256–257, 2002.

CHANG, S. C. *et al.* Efficacy of alcohols and alcohol-based hand disinfectants against human enterovirus 71. **Journal of Hospital Infection**, v. 83, n. 4, p. 288–293, 2013.

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde**. 2. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos, 2004.

CHAOUI, L. *et al.* Contamination of the Surfaces of a Health Care Environment by Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, p. 1-7, 2019.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. *In*: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. p. 15-40.

CREMIEUX, A.; FRENEY, J.; DAVIN-REGLI, A. Methods of Testing Disinfectants. *In*: BLOCK, S.S. (ed). **Disinfection, sterilization and preservation**. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1305-1311.

DAGLEY, S.; DAWES, E. A.; MORRISON, G. A. Inhibition of growth of *Aerobacter aerogenes*; the mode of action of phenols, alcohols, acetone, and ethyl acetate. **Journal of bacteriology**, v. 60, n. 4, p. 369-79, 1950.

FRAISE, A. P.; LAMBERT, P. A.; MAILLARD, J-Y. **Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 4. ed. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2004. 678 p.

GORONCY-BERMES, P.; KOBURGER, T.; MEYER, B. Impact of the amount of hand rub applied in hygienic hand disinfection on the reduction of microbial counts on hands. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 3, p. 212–218, 2010.

HARRINGTON, C.; WALKER, H. The Germicidal Action of Alcohol. **The Boston Medical and Surgical Journal**, v. 148, n. 21, p. 548–552, 1903.

HERNANDES, S. E. D. *et al.* The effectiveness of alcohol gel and other hand-cleansing agents against important nosocomial pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p 33-39, 2004.

HERNÁNDEZ-NAVARRETE, M. *et al.* Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 10, p. 681-688, 2014.

HUFFER, S. *et al.* Role of Alcohols in Growth, Lipid Composition, and Membrane Fluidity of Yeasts, Bacteria, and Archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6400–6408, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3240.008**: avaliação da Atividade Bactericida de Desinfetantes nas Formas de “Spray” e Aerossol. Rev. 02. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019b. 23 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3110.094**: determinação do Teor de Álcool Etilico na Forma de Gel. Rev. 00. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019a. 06 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (Brasil). **Doc-cgcre-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 23 jan. 2020.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Amsterdã: Agência Europeia de Medicamentos, 2005. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf. Acesso em: 23 jan. 2020.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. *et al.* Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

KAMPF, G. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, n. 4, p. 331–338, 2018.

KAMPF, G. *et al.* Spectrum of antimicrobial activity and user acceptability of the hand disinfectant agent Sterillium® Gel. **Journal of Hospital Infection**, v. 52, n. 2, p. 141–147, 2002.

KAMPF, G.; KRAMER, A. Epidemiologic Background of Hand Hygiene and Evaluation of the Most Important Agents for Scrubs and Rubs. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 863-893, 2004.

KAUR, R.; LIU, S. Antibacterial surface design – Contact kill. **Progress in Surface Science**, v. 91, p. 136–153, 2016.

LEI, H. Hand hygiene and surface cleaning should be paired for prevention of fomite transmission. **Indoor Air**, v. 30, n. 1, p. 49-59, 2020.

LING, M. L. *et al.* APSIC guidelines for the prevention of surgical site infections. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 8, n. 174, 2019.

LUCCHESI, G. A Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde. *In*: SETA, M. H.; PEPE, V. L. E; O'DWYER, G. **Gestão e Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. p. 33-47.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAILLARD, J.-Y. Testing the Effectiveness of Disinfectants and Sanitizers. *In*: LELIEVELD, H. L. M.; HOLAH, J.; GABRIC, D. (ed.). **Handbook of Hygiene Control in the Food Industry**. 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016. p. 569–586.

MAMISHI, S. *et al.* Antibiotic Resistance And Genotyping Of Gram-Positive Bacteria Causing Hospital-Acquired Infection In Patients Referring To Children's Medical Center. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3719–3726, 2019.

MCDONNELL, G. E. **Antisepsis, disinfection and sterilization**. Washington, D.C: American Society for Microbiology Press, 2007. 361 p.

MORTON, H. E. The relationship of concentration and germicidal efficiency of ethyl alcohol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 53, n. 1, p. 191–196, 1950.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NYE, R. N.; MALLORY, T. B. A Note on the Fallacy of Using Alcohol for the Sterilization of Surgical Instruments. **The Boston Medical and Surgical Journal**, v. 189, n. 16, p. 561–563, 1923.

O'LEARY, F. M.; PRICE, G. J. Alcohol hand gel – a potential fire hazard. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 64, n. 1, p. 131–132, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Infection prevention and control of epidemic – and pandemic – prone acute respiratory infections in health care**. Geneva: OMS, 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112656/9789241507134_eng.pdf;jsessionid=C7E3D778A5B611A4503ED9009DCE14D0?sequence=1. Acesso em: 23 jan. 2020.

OTTER, J. A.; YEZLI, S.; FRENCH, G. L. The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 32, n. 07, p. 687–699, 2011.

PALMQVIST, C. *et al.* Surface Contamination of CT and MRI Equipment – A Potential Source for Transmission of Hospital-Acquired Infections. **Journal of Radiology Nursing**, v. 38, n. 4, p. 254-260, 2019.

PARSHIONIKAR, S. *et al.* **Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis**. Washington: EPA, 2016. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf. Acesso em: 23 jan. 2020.

PEREIRA M. J. *et al.* Análise da incidência e da gravidade de queimaduras por álcool em crianças no período de 2001 a 2006: impacto da Resolução 46. **Rev Bras Queimaduras**, v. 8, n. 2, p. 51-59, 2009.

PEREIRA, S. *et al.* Desinfecção com hipoclorito de sódio em superfícies ambientais hospitalares na redução de contaminação e prevenção de infecção: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, n. 4, p. 0681-0688, 2015.

PIDOT, S. J. *et al.* Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 452, 2018.

PINES, R. M. *et al.* Procedural Revision to the AOAC Germicidal Spray Products as Disinfectants Test Method: Establishment of Minimum and Maximum Log Density Values for Test Microbes on Inoculated Carriers. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 3, 2013.

PINTO, T. S. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. Desinfetantes e sanitizantes – aspectos gerais e de aplicação. *In*: PINTO, T. S. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. Barueri, SP: Manole, 2015. p. 291-306.

PRICE, P. B. Reevaluation of ethyl alcohol as a germicide. **Archives of Surgery**, v. 60, n. 3, p. 492, 1950.

PROTANO, C. *et al.* Hospital environment as a reservoir for cross transmission: cleaning and disinfection procedures. **Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunita**, v. 31, p. 436-448, 2019.

RUTALA, W. A. *et al.* **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**. Condado de DeKalb: CDC, 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2020.

RUTALA, W. A. *et al.* Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by 14 hospital disinfectants. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 267–271, 1991.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection, sterilization and antisepsis: An overview. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 5, p. e1–e6, 2016.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection, sterilization, and antisepsis: An overview. **American Journal of Infection Control**, v. 47, p. A3–A9, 2019.

SALVAGE, R. *et al.* Use of 70% alcohol for the routine removal of microbial hard surface bioburden in life science cleanrooms. **Future Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1123-1130, 2014.

SANTOS, A. A. M. *et al.* Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. **Revista de Administração em Saúde**, v. 4, n. 16, jul.-set. 2002.

SHIMIZU-ONDA, Y. *et al.* The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 779–781, 2013.

SHRUTHI, N. K. *et al.* USFDA Guidelines on Process Validation - A Review. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 6, n. 3, p. 920-923, jul.-ago. 2014.

SMITH, C. R. Alcohol as a Disinfectant against the Tubercle Bacillus. **Public Health Reports**, v. 62, n. 36, p. 1285, 1947.

SPRINGTHORPE, V. S.; SATTAR, S. A. Carrier tests to assess microbicidal activities of chemical disinfectants for use on medical devices and environmental surfaces. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 1, p. 182-201, 2005.

STAUF, R. *et al.* In-vitro activity of active ingredients of disinfectants against drug-resistant fungi. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 4, p. 468-473, dez. 2019.

STEINHAEUER, K. *et al.* Why volume matters - Implications of applied volume of alcohol-based disinfectants for infection prevention. **Journal of Hospital Infection**, v. 101, n. 4, p. 423-425, 2019.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G.; BARDOSSY, A. C. The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 6, 2018.

SUTTON, V. W. *et al.* Validation of Microbial Recovery From Disinfectants. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 56, n. 5, set.-out. de 2002.

SYKES, G. The influence of germicides on the dehydrogenases of *Bact. coli*: I. The succinic acid dehydrogenase of *Bact. coli*. **The Journal of hygiene**, v. 39, n. 4, p. 463–469, 1939.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **General Chapters 1223**: validation of alternative microbiological. 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016. 20 p.

VAN KLINGEREN, B.; PULLEN, W. Comparative testing of disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium terrae* in a quantitative suspension test. **Journal of Hospital Infection**, v. 10, n. 3, p. 292–298, 1987.

WEBER, D. J.; RUTALA, W. A.; SICKBERT-BENNETT, E. E. Outbreaks Associated with Contaminated Antiseptics and Disinfectants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4217–4224, 2007.

WEITZEL, *et al.* **How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification**. Gaithersburg: AOAC, 2007. Disponível em: http://members.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/lptp/alacc_guide_2008.pdf. Acesso em: 23 jan. 2020.

WHITEHEAD, K.; MCCUE, K. A. Virucidal efficacy of disinfectant actives against feline calicivirus, a surrogate for norovirus, in a short contact time. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 1, p. 26–30, 2010.

WILKINSON, M. A. C. *et al.* Comparison of the efficacy and drying times of liquid, gel and foam formats of alcohol-based hand rubs. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, n. 4, p. 359–364, 2018.