**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM**

JULIANA RIZZO GNATTA

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE SABONETES
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE TEA TREE (*Melaleuca alternifolia*) E
TRICLOSAN NA HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS ARTIFICIALMENTE
CONTAMINADAS**

**SÃO PAULO
2012**

JULIANA RIZZO GNATTA

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE SABONETES
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE TEA TREE (*Melaleuca alternifolia*) E
TRICLOSAN NA HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS ARTIFICIALMENTE
CONTAMINADAS

Dissertação apresentada à Escola de
Enfermagem da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Enfermagem na
Saúde do Adulto

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Júlia Paes da
Silva

SÃO PAULO

2012

Nome: Juliana Rizzo Gnatta

Título: Comparação da eficácia antimicrobiana de sabonetes contendo óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) e triclosan na higienização de mãos artificialmente contaminadas.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por me possibilitarem alcançar tudo que conquistei até o momento.

Às minhas irmãs, Luciana e Mariana, toda a minha gratidão pelos momentos de apoio e auxílio.

Ao meu querido Thiago, por seu companheirismo, apoio e pela compreensão nos momentos mais difíceis. Muito obrigada!

À minha futura família: Marly, Haroldo e Thaty, o meu agradecimento pelo acolhimento.

À minha orientadora, Prof^a Maria Júlia – sempre um modelo para a Enfermagem – por sonhar junto comigo que podemos fazer um cuidado melhor utilizando as Práticas Complementares em Saúde.

A todos que contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional: família, amigos, docentes, colegas, profissionais e funcionários da Universidade de São Paulo. Cada um teve uma contribuição muito especial e essencial nesta construção.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª Dr^a Maria Júlia Paes da Silva, pela competência e dedicação a este trabalho e pela prontidão na resolução de todos os obstáculos durante o percurso.

À Prof^ª Dr^a Kazuko Uchikawa Graziano, pelas preciosas orientações de microbiologia e pela permissão em realizar a pesquisa no LEM.

À Prof^ª Dr^a Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, pelas valiosas contribuições durante o Exame de Qualificação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Aos membros do grupo de pesquisa “Estudos das Práticas Alternativas ou Complementares de Saúde”, pela parceria e seriedade.

Aos membros do grupo de pesquisa “Controle de Infecção Relacionada com Procedimentos de Saúde”, em especial à Alda, Camila, Flávia, Giovana, Liliam e Rafael, pela participação ativa durante a coleta de dados.

A todos aqueles que participaram voluntariamente como sujeitos deste estudo. Muito obrigada!

Tatiana de Freitas Costa de Carvalho, pelas contribuições em microbiologia.

À Verônica Thereza Gonçalves, Natália Brandão Gobbato, Sebastião Gonçalves e aos demais membros da Biocenter Microbiológica, pela ajuda prestimosa na validação dos neutralizantes e organização laboratorial da coleta.

Lucas Petri Damiani, pela orientação estatística do trabalho.

Empresas GOJO, Higinato e Rioquímica, pela autorização e fornecimento dos produtos utilizados na pesquisa.

À Prof^a Dr^a Rúbia Aparecida Lacerda por me iniciar nos estudos em controle de infecção.

Enfermeiras Isa Rodrigues da Silveira Cabral de Menezes, do HCU-USP, e Ana Cristina Bálamo, pelo acolhimento e ensinamentos práticos em Controle de Infecção.

Leonice Fumiko Sato Kurebayashi e Talita Pavarini Borges, pelo apoio e pela prestimosa amizade.

EPÍGRAFE

"Educar é educar-se na prática da liberdade, é tarefa daqueles que sabem que pouco sabem - por isso sabem algo e podem assim chegar a saber mais - em diálogo com aqueles que, quase sempre, pensam que nada sabem, para estes, transformando seu pensar que nada sabem em saber que pouco sabem, possam igualmente saber mais."

(Paulo Freire, São Paulo, 2006)

Gnatta JR. Comparação da eficácia antimicrobiana de sabonetes contendo óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) e triclosan na higienização de mãos artificialmente contaminadas [dissertação]. São Paulo (SP), Brasil: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2012.

RESUMO

Introdução. Os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais têm sido relatados na literatura científica, sobretudo referentes ao óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). Tal óleo essencial tem demonstrado propriedades antissépticas e pode representar uma alternativa de um produto natural para higienização das mãos nos estabelecimentos de assistência à saúde que por ora utilizam predominantemente produtos à base de triclosan e clorexidina. **Objetivo.** Avaliar a eficácia da higiene das mãos na redução da carga microbiana realizada com duas formulações de sabonetes líquidos já disponíveis no mercado, contendo: óleo essencial de Tea Tree 0,3% e sabonete com triclosan na concentração de 0,5%; comparar dois procedimentos referência, sendo um da metodologia oficial (*soft soap*) e o outro da versão draft (*soft soap* + propan-2-ol). **Método.** Foram utilizadas as diretrizes da metodologia do Comitê Europeu de Padronização, EN 1499, indicada para avaliar a eficácia antimicrobiana de produtos para higiene das mãos. A metodologia recomenda a contaminação artificial das mãos de 12 a 15 voluntários sadios com *Escherichia coli* K12, seguida pela higienização das mãos com cada produto em avaliação. Ainda segundo a metodologia, os resultados além de serem comparados entre si, são comparados com um sabão de referência (*soft soap*), no mesmo voluntário, dia e sob condições ambientais semelhantes. Foi realizada a contagem do número de microrganismos antes (pré-valores) e após (pós-valores) cada procedimento. O fator de redução logaritmica entre os pré e pós-valores representou a atividade antimicrobiana de cada produto testado, permitindo evidenciar a eficácia dos produtos em teste comparativamente ao produto referência (*soft soap* seguido ou não por propan-2-ol). **Resultados.** Em termos de redução logaritmica, o sabonete contendo óleo essencial de Tea Tree à 0,3% foi mais eficaz do que o sabonete contendo triclosan à 0,5% ($3,89 \log_{10} \times 3,59 \log_{10}$), porém, pelo teste de Wilcoxon, não houve diferença estatisticamente significativa. Em relação à eficácia antimicrobiana, nenhum dos dois sabonetes apresentou desempenho superior a nenhum dos dois procedimentos referência (*soft soap* ou *soft soap* + propan-2-ol). O procedimento de higienização das mãos de referência utilizando *soft soap* + propan-2-ol (proposto pela versão *draft* da metodologia EN 1499), demonstrou-se mais eficaz do que apenas o uso do *soft soap* (descrito na metodologia oficial).

PALAVRAS-CHAVE: Lavagem de mãos. Óleo essencial de Tea Tree. Triclosan. EN 1499. Controle de infecção.

Gnatta JR. Comparison of antimicrobial effectiveness of soaps containing essential oil of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) and triclosan in hand hygiene artificially contaminated. [dissertação] São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2012.

ABSTRACT

Introduction. The antimicrobial effects of essential oils have been reported in scientific literature, especially about essential oil of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). This essential oil has shown antiseptic properties and may represent a natural and alternative product for hand hygiene in health care establishments that currently use products based on triclosan and chlorhexidine. **Objective.** Evaluate the efficacy of hand hygiene in reducing microbial load performed with two different formulations of liquid soaps available: Tea Tree essential oil 0.3% soap and triclosan 0.5% soap; compare two references procedure, one of the official methodology (soft soap) and one of the draft version (soft soap + propan-2-ol). **Method.** Was used the guidelines of the European Committee for Standardization, EN1499 methodology, indicated to evaluate the efficacy of antiseptics for hand hygiene. The methodology recommends the artificial contamination of hands from 12 to 15 healthy volunteers with *Escherichia coli* K12 followed by washing hands with each product under evaluation. According to the methodology, results should be compared between products and with a reference soap ("soft soap"), in the same subject, same day and under similar environmental conditions. Were counted the number of microorganisms before (pre-values) and after (post-values) handwashing. The logarithmic reduction factor between pre-and post-values represents the antimicrobial activity of each product under test, showing the efficacy of products under test compared to the reference product (soft soap followed or not followed by propan-2-ol). **Results.** In terms of logarithmic reduction, the soap containing the tea tree essential oil 0.3% was more efficacious than the soap containing 0.5% triclosan ($3,89 \log_{10} \times 3,59 \log_{10}$). However, the Wilcoxon test does not detected statistically significant difference. Regarding the antimicrobial efficacy, none of the two soaps showed superior performance to either references procedure (*soft soap* or *soft soap* + propan-2-ol). The procedure for reference hand hygiene using soft soap + propan-2-ol, (proposed by the draft version of the methodology EN 1499) showed to be more efficacious than use only soft soap (described in the official methodology).

KEYWORDS: Handwashing. Tea Tree oil. Triclosan. EN 1499. Infection control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fluxograma da ação dos OE no organismo	35
Figura 2 –	Estrutura química molecular do terpinen-4-ol	37
Figura 3 –	Técnica de higienização simples das mãos	55-57
Figura 4 –	Técnica de fricção antisséptica das mãos com preparações alcoólicas	58-59
Figura 5 –	Técnica de antissepsia cirúrgica das mãos ou preparo pré-operatório das mãos	61
Figura 6 –	Os cinco momentos para higiene das mãos	63
Figura 7 –	Ativação de cepa de <i>Escherichia coli</i> K12 conforme instruções do fornecedor	74
Figura 8 –	Crescimento da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 em placa de TSA (à esquerda) e TSSA (à direita)	76
Figura 9 –	Preparo do fluido de contaminação	81
Figura 10 –	Fluxograma do estudo	90
Figura 11 –	Dispensação de 5 mL de <i>soft soap</i> em seringas identificadas por etiquetas amarelas	93
Figura 12 –	Dispensação de 3 mL de propan-2-ol em seringas identificadas por etiquetas prateadas e dispensação de 1,5 mL de sabonete contendo triclosan (etiqueta preta) e 1,5 mL de sabonete contendo Tea Tree (etiqueta verde)	93
Figura 13 –	Sujeito realizando a técnica de higienização simples das	

	mãos com <i>soft soap</i> sob supervisão do monitor e com o auxílio de figura contendo orientações sobre procedimento	94
Figura 14 –	Sujeito enxaguando as mãos em água mineral do sentido distal para proximal, durante o período de 15 segundos.	94
Figura 15 –	Sujeito contaminando as mãos com a suspensão do Ensaio	95
Figura 16 -	Sujeitos aguardando a secagem das mãos na posição horizontal após a contaminação, com movimentos de rotação dos punhos	95
Figura 17 –	Sujeito esfregando as pontas dos dedos em fundo de placa de Petri contendo TSB, durante 60 segundos, para coleta dos pré-valores.	96
Figura 18 –	Sujeito realizando a técnica de higienização simples das mãos com produto teste sob supervisão do monitor e com o auxílio de figura contendo orientações sobre procedimento.	96
Figura 19 –	Sujeito esfregando as pontas dos dedos em fundo de placa de Petri contendo D/E (neutralizante para o sabonete contendo triclosan), durante 60 segundos, para coleta dos pós-valores	97
Figura 20 –	Média e IC 95% para logaritmo dos pré-valores obtidos das mãos dos sujeitos para cada um dos produtos em teste	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Espectro antimicrobiano e características dos agentes antissépticos para higienização das mãos	51
Tabela 2 –	UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o procedimento de higienização das mãos com <i>soft soap</i>	108
Tabela 3 –	UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o procedimento de higienização das mãos com <i>soft soap</i> seguido pelo propan-2-ol	109
Tabela 4 –	UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o procedimento de higienização das mãos com sabonete contendo óleo essencial de Tea Tree à 0,3%	110
Tabela 5 –	UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o procedimento de higienização das mãos com sabonete contendo triclosan à 0,5%	111

Tabela 6 –	Correlação entre a contaminação das mãos direita e esquerda dos sujeitos, antes (pré-valores) e após (pós-valores) o procedimento de higienização das mãos	112
Tabela 7 –	Logaritmos referentes aos pré e pós-valores e fator de redução logaritmica (FR) para cada um dos procedimentos de higienização das mãos de cada sujeito, de acordo com o grupo	115
Tabela 8 –	ANOVA para avaliação do modelo quadrado latino para efeitos de grupo, coluna e tratamento	116
Tabela 9 –	Aplicação do teste de Wilcoxon nos FR para cada um dos produtos em teste em relação ao procedimento de referência com <i>soft soap</i> + propan-2-ol	118
Tabela 10 –	Aplicação do teste de Wilcoxon nos FR para cada um dos produtos em teste em relação ao procedimento de referência com <i>soft soap</i>	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Propostas de formulações de neutralizantes, segundo metodologia oficial EN 1499 e versão <i>draft</i> , para agentes antimicrobianos	84
Quadro 2 –	Avaliação da toxicidade e do método de neutralização dos neutralizantes propostos pela versão <i>draft</i> segundo a mesma metodologia	85
Quadro 3 –	Avaliação da toxicidade e do método de neutralização do D/E associado ou não à histidina, segundo metodologia da versão <i>draft</i>	87
Quadro 4 –	Neutralizantes utilizados no ensaio para cada um dos agentes antimicrobianos presentes nos produtos em teste	88

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APIC	Associação para Profissionais de Controle de Infecções (<i>Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology</i>)
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CHIP	<i>Comprehensive Hospital Infections Project</i>
COFEN	Conselho Federal de Enfermagem
EEUSP	Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIPAC	Comitê consultivo em Práticas de Controle de Infecções (<i>Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee</i>)
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IRAS	Infecções relacionadas à Assistência à Saúde
LEM	Laboratório de Ensaios Microbiológicos do Departamento de Enfermagem Médico-Cirúrgica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MS	Ministério da Saúde
NNCAM	<i>National Center for Complementary and Alternative Medicine</i>

OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
OTT	Óleo essencial de Tea Tree (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
PCS	Práticas Complementares em Saúde
PCIH	Programa de Controle de Infecções Hospitalares
PGE2	Prostaglandina E2
PS	Profissionais de Saúde
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
SHEA	Sociedade Americana de Epidemiologistas dos Serviços de Saúde (<i>Society for Healthcare Epidemiology of America</i>)
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alpha
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
®	marca registrada
h	horas
min	minutos

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Lista de quadros

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 AROMATERAPIA, AROMACOLOGIA E AROMATOLOGIA.....	25
2.2 AROMATERAPIA: HISTÓRICO.....	26
2.3 AROMATERAPIA E ENFERMAGEM.....	28
2.4 FARMACOGNOSIA: EXTRAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DOS OE.....	31
2.5 ÓLEO ESSENCIAL DE TEA TREE (OTT).....	35
2.6 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS): CENÁRIO.....	42
2.6.1 A ocorrência mundial.....	42
2.6.2 Panorama das IRAS no Brasil.....	44
2.7 HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS NA PREVENÇÃO DAS IRAS.....	45
2.8 MICROBIOTA DAS MÃOS.....	47
2.9 CONCEITO DE HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS.....	48
2.9.1 Higienização simples das mãos.....	49
2.9.1.1 Higienização simples das mãos com sabão não-antimicrobiano.....	49
2.9.1.2 Higienização simples das mãos com produto antisséptico.....	50
2.9.1.2.1 Alcóois.....	52
2.9.1.2.2 Clorexidina.....	53
2.9.1.2.3 Iodóforos.....	53
2.9.1.2.4 Triclosan.....	54
2.9.2 Técnica de higienização simples das mãos.....	54
2.9.3 Técnica de fricção antisséptica das mãos com	

preparações alcoólicas.....	57
2.9.4 Técnica de antissepsia cirúrgica das mãos ou preparo pré-operatório das mãos.....	59
2.9.5 Situações indicadas para realizar higienização das mãos..	62
2.9.6 Barreiras de adesão à higienização das mãos.....	63
3 JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	65
4 OBJETIVOS.....	67
4.1 OBJETIVO GERAL.....	67
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
5 HIPÓTESES.....	68
5.1 HIPÓTESE NULA.....	68
5.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA.....	68
6 VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	69
6.1 INDEPENDENTE.....	69
6.2 DEPENDENTE.....	69
7 MATERIAL E MÉTODO	70
7.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	70
7.2 LOCAL DO ESTUDO.....	70
7.3 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	71
7.4 PRINCÍPIOS DO ENSAIO.....	71
7.5 AMOSTRA.....	72
7.6 MATERIAIS.....	73
7.6.1 Microrganismo teste.....	73
7.6.2 Meios de cultura.....	75
7.6.3 Sabão de referência (<i>soft soap</i>).....	77
7.6.4 Água.....	77
7.6.5 Álcool de referência (propan-2-ol).....	78
7.6.6 Produtos utilizados para teste.....	78
7.6.7 Cronômetro.....	79
7.6.8 Neutralizantes.....	79
7.7 PROCEDIMENTOS PARA A COLETA DE DADOS.....	80
7.7.1 Preparo do fluido de contaminação.....	80
7.7.2 Metodologia para validação dos neutralizantes.....	81
7.7.2.1 Validação da ausência de toxicidade do neutralizante...	82
7.7.2.2 Validação do método de neutralização.....	82
7.7.3 Procedimento para validação dos neutralizantes.....	83
7.7.4 Desenho do estudo.....	89
7.7.5 Controle microbiológico dos produtos utilizados no estudo.....	91
7.7.6 Procedimento para a coleta dos valores microbianos e contaminação das mãos com a suspensão do ensaio.....	91

7.7.7 Procedimento referência de higienização das mãos.....	97
7.7.8 Procedimento de higienização com produto em teste.....	98
7.7.9 Obtenção dos pré-valores.....	99
7.7.10 Obtenção dos pós-valores.....	100
7.7.11 Procedimento para obtenção dos dados e cálculos.....	101
7.7.12 Validade do teste.....	102
7.7.13 Tratamento dos dados.....	103
8 RESULTADOS.....	104
8.1 SUJEITOS DO ESTUDO.....	104
8.2 VALORES INICIAIS DE <i>Escherichia coli</i> K12 PRESENTE NAS MÃOS DIREITA E ESQUERDA DOS SUJEITOS (PRÉ-VALORES).....	104
8.3 VALORES PRÉ E PÓS DE <i>Escherichia coli</i> K12 PRESENTE NAS MÃOS DIREITA E ESQUERDA DOS SUJEITOS.....	106
8.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAMINAÇÃO DAS MÃOS DOS SUJEITOS NOS PRÉ E PÓS-VALORES.....	112
8.5 LOGARITMOS DOS PRÉ E PÓS-VALORES E FATOR DE REDUÇÃO LOGARITIMICA.....	113
8.6 ANÁLISE DO MODELO QUADRADO LATINO.....	116
8.7 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS PRODUTOS EM TESTE.....	117
9 DISCUSSÃO.....	120
10 CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS.....	126
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

As Terapias Naturais, Alternativas ou Complementares são definidas pela Lei Municipal de São Paulo 13.717, implementada em 2004, como “todas as práticas de promoção de saúde e prevenção de doenças que utilizem basicamente recursos naturais”¹. São consideradas como práticas Alternativas quando utilizadas em substituição à Medicina Alopática, ou Complementares quando aliadas à técnica médica convencional².

Em âmbito mundial, assim como a medicina convencional é reconhecida pelos seus avanços científicos, o uso das Práticas Complementares em Saúde (PCS) tem ganhado destaque. Um estudo americano pelo *National Center for Complementary and Alternative Medicine* (NNCAM) e *National Center for Health Statistics* apontou que em 2007, aproximadamente 38% da população adulta havia utilizado algum tipo de terapia alternativa nos últimos 12 meses³. Essa nova tendência de cuidados à saúde está sendo incentivada pela própria Organização Mundial de Saúde (OMS) desde a década de 1970, quando esta organização designou a instituição das Medicinas Alternativas como um instrumento válido e significativo para a promoção da saúde das populações⁴. Em 2004, novamente a OMS reforçou a necessidade de fortalecer políticas que favoreçam o uso racional das PCS nos sistemas nacionais de atenção à saúde, além de priorizar o desenvolvimento de pesquisas que verifiquem a efetividade e segurança dessas práticas⁵.

A Aromaterapia está inclusa nas técnicas que compreendem as PCS e é uma prática que utiliza concentrados voláteis extraído de vegetais, conhecidos como óleos essenciais (OE). Estes são compostos por moléculas químicas de alta complexidade e obtidos a partir dos materiais destilados das plantas⁶.

Os OE podem produzir diversos efeitos. Os efeitos mais sutis, com atuação semelhante aos florais de Bach ou preparados homeopáticos, são

obtidos principalmente pela inalação dos OE, uma vez que as moléculas dos óleos estimulam os nervos olfativos. Estes têm uma ligação direta com o Sistema Nervoso Central e levam o estímulo ao Sistema Límbico, o qual é responsável por aspectos psicológicos e emocionais do indivíduo. Efeitos físicos podem ser obtidos por meio do uso tópico de OE, pois através da via cutânea as moléculas são absorvidas e caem na circulação sanguínea, sendo conduzidas até os órgãos e tecidos do corpo⁷.

Tem sido crescente na literatura mundial estudos sobre os efeitos antimicrobianos dos OE⁸⁻⁹. Desta forma, os OE, principalmente o óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) conhecido por suas propriedades antissépticas, podem representar uma alternativa ao controle de bactérias e outros microrganismos patogênicos¹⁰⁻¹².

As “infecções hospitalares” são definidas pelo Ministério da Saúde (MS) como qualquer infecção adquirida após a internação do paciente, podendo se manifestar durante a internação ou mesmo após a alta hospitalar¹³. Atualmente, o termo “infecção hospitalar” tem perdido espaço para a expressão “infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS)” uma vez que as infecções podem ser adquiridas em outros cenários além dos hospitais.

As IRAS estão entre os principais problemas de Saúde Pública, pois além de elevarem os níveis de morbidade e mortalidade, aumentam o tempo de hospitalização e, conseqüentemente, encarecem o tratamento do doente. Estima-se que aproximadamente 5% dos pacientes hospitalizados passarão pela experiência de vivenciar uma infecção durante sua institucionalização¹⁴. Nos Estados Unidos da América (EUA), calcula-se um gasto anual com o tratamento de IRAS entre 28,4 a 35,7 bilhões de dólares¹⁵ e que cerca de 2 milhões de IRAS ocorrem anualmente, resultando em 80 000 mortes¹⁶. Na Inglaterra, a estimativa é de que há, ao menos, 100 000 casos anuais de IRAS que ocasionam 5000 mortes e um custo extra de 1,6 bilhões de Euros¹⁷.

Em geral, as IRAS são decorrentes das complicações dos pacientes graves, somado ao desequilíbrio ocasionado entre a microbiota normal e seus próprios mecanismos de defesa¹⁸, ou seja, são infecções que resultam de interações complexas e multicausais entre as práticas de assistência realizadas e o estado do próprio paciente.

Os princípios para se prevenir e controlar as IRAS são conhecidos há inúmeras décadas, sendo que o principal e mais simples deles – a higienização das mãos – foi citado a primeira vez por Semmelweis em seu trabalho de epidemiologia, publicado em 1861, o qual demonstrou que a infecção puerperal poderia ser prevenida por meio da antissepsia das mãos com produto clorado¹⁹.

Apesar do reconhecimento de que ainda hoje a técnica de higienização das mãos é, sem dúvida, o principal ato para se prevenir e controlar a incidência de IRAS, a adesão dos profissionais de saúde (PS) a tal prática é baixa, variando de 30 a 50%²⁰, o que influencia diretamente na qualidade da assistência prestada. Somado a este fator, a técnica da lavagem de mãos tem sido descrita como insuficiente em termos de duração, ou seja, com um tempo menor do que o recomendado e técnica inadequada²⁰, apesar dos serviços de Controle de Infecção das instituições realizarem treinamentos e insistirem no aprimoramento de tal prática.

Além das falhas durante o processo, existem outros fatores que acarretam na baixa adesão à técnica correta da lavagem de mãos. Dentre eles destacam-se: falta de tempo por elevada carga de trabalho, dificuldade estrutural para acessar pias, indisponibilidade de recursos como papel toalha e sabão líquido e a baixa aceitabilidade deste produto por parte dos profissionais devido aos danos que o mesmo causa à pele²¹.

Desde a década de 1980 são relatados pelos profissionais de saúde danos à integridade da pele causados por produtos recomendados pelos próprios programas de controle de infecção, como por exemplo, os sabonetes à base de triclosan ou clorexidina²². Segundo Larson *et al.*²³, há dois tipos de

reações da pele aos produtos de higiene das mãos. O primeiro e o mais comum é a dermatite de contato que apresenta como sintomas ressecamentos, vermelhidão, rachaduras e até sangramentos. O segundo é a dermatite de contato alérgica que pode ocasionar sintomas locais ou generalizados, causando inclusive desconforto respiratório e reação anafilática.

Além das reações dermatológicas já citadas, lesões no sistema tegumentar podem propiciar uma mudança na microbiota transitória da pele, por meio de um aumento na colonização da mesma por bactérias, aumentando o risco de transmissão de microrganismos²⁰ aos pacientes, podendo ser responsável por infecção cruzada.

A higiene das mãos efetiva é aquela que, por meio de agentes de higienização, não causa um impacto negativo na condição da pele, mas sim, a preserva. O *guideline* para higiene das mãos publicado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA – CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) recomenda que os agentes para higiene das mãos devem ser bem aceitos, bem tolerados e formulados com a garantia de evitar qualquer possível irritação²⁴.

Segundo Larson *et al.*²³, a seleção de produtos para higiene das mãos com boa aceitabilidade e, ao mesmo tempo, que sejam eficazes é um componente fundamental para a promoção e aumento da adesão à prática. Tal afirmação delineia o princípio norteador deste estudo, uma vez que a proposta será verificar se um sabonete líquido com um princípio ativo natural – óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) – é capaz de assegurar eficácia antimicrobiana e ser uma alternativa aos sabonetes antissépticos convencionais que contêm triclosan.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AROMATERAPIA, AROMACOLOGIA E AROMATOLOGIA

A palavra Aromaterapia foi utilizada pela primeira vez em 1928 pelo perfumista francês René Maurice Gatefossé. O início de seus estudos sobre os óleos essenciais resultou de um incidente de trabalho. Durante uma destilação no laboratório sofreu uma queimadura nas mãos e as mergulhou no frasco mais próximo que continha líquido e que, por acaso, era óleo de lavanda. Ele notou que, além do alívio quase imediato da dor, o ferimento curou-se mais rapidamente, praticamente sem deixar cicatrizes²⁵. Gatefossé percebeu que as propriedades curativas do óleo de lavanda eram muito maiores do que as preparações sintéticas em que ele estava trabalhando, estimulando-o a pesquisar sobre outros OE.

A justaposição das palavras aroma/terapia indicam, respectivamente, cheiro e cura, ou seja, referem-se à definição de Aromaterapia que é a busca da cura por meio do uso de óleos essenciais com o objetivo de melhorar o bem-estar físico, mental e emocional.

O termo Aromacologia foi criado em 1989 pela Fundação de Pesquisa para o Olfato de Nova Iorque, denominada *Sense of Smell Institute*, com a finalidade de designar o estudo das inter-relações entre os aromas e seus efeitos psicofisiológicos²⁶, principalmente no que diz respeito ao Sistema Límbico. Assim, a Aromacologia define-se como uma ciência em

desenvolvimento que dará fundamento à Aromaterapia por meio da integração de diversas áreas do conhecimento, como a química, farmacologia, neurofisiologia, psicologia, cosmetologia, entre outras²⁶.

Em 2002, o *Scientific Institute of Aromathology* na França referiu-se ao novo termo “Aromatologia” como sendo o estudo da ação psicológica dos OE, através do estudo do perfil da personalidade cada indivíduo, a fim de melhorar a qualidade de vida.

Apesar dos termos “Aromacologia” e “Aromatologia” serem recentes, eles ainda não apresentam uma definição clara e distinta entre si. Como o significado das duas concepções remetem à Aromaterapia, e esta tem sido praticada há milhares de anos, será este o termo de escolha utilizado no presente trabalho.

2.2 AROMATERAPIA: HISTÓRICO

Desde os tempos mais remotos, quando a humanidade passou a dominar a técnica do fogo, o conhecimento sobre plantas e raízes foi considerado precioso e transmitido ao longo dos anos por gerações²⁵. Além disso, a percepção de que o odor da fumaça gerada pela queima de vegetais poderia ser modificado pelo emprego de diferentes ervas aromáticas deu origem às primeiras formas de incensos.

O uso de óleos essenciais relaciona-se com a história das grandes civilizações e, em geral, sempre esteve atrelado a manifestações divinas, espirituais e/ou curativas²⁷. Muitas culturas acreditavam, e ainda acreditam, que os odores perfumados agradavam aos deuses e que as ervas curativas tinham qualidades mágicas²⁵.

As tradicionais medicinas milenares da Índia e da China, respectivamente Medicina Ayurvédica e Medicina Tradicional Chinesa, além de terem em comum os princípios do holismo para o cuidado, já se utilizavam de plantas e ervas curativas diluídas em preparações químicas ou através de fitoterápicos.

No Egito, os óleos essenciais já eram utilizados desde os tempos dos faraós. Por volta de 3.500 a.C. os OE de cedro e mirra eram empregados no processo de mumificação²⁵. Os sacerdotes egípcios também faziam uso dos OE em cosméticos, óleos para massagem, medicamentos e rituais religiosos, representando, portanto, os primeiros aromaterapeutas da história. Na região mesopotâmica há registros em tabuletas de argila feitas pelos “médicos” babilônios sobre a indicação de óleos essenciais, entretanto sem especificar quantidades²⁵.

Com os egípcios, os gregos aprenderam as propriedades e utilizações dos OE. Esse conhecimento, posteriormente, passou aos Romanos por meio dos médicos provenientes da Grécia que trabalhavam em Roma⁷.

Por volta do século X, Avicena, médico alquimista árabe, foi pioneiro na descoberta do processo de destilação do óleo de Rosas. Paracelso, também médico da Arábia, foi o primeiro a empregar o termo “óleo essencial”, uma vez que tal extrato referia-se à “essência” ou “alma” da planta²⁶. Chegando ao século XII, na Europa, as Cruzadas foram as principais responsáveis por trazerem os óleos essenciais ao Ocidente. Durante a Idade Média as grandes pestes favoreceram a popularização do uso de aromas, pois acreditavam que a queima de ervas aromáticas era capaz de purificar o ar contaminado pelos doentes²⁵.

No período do Renascimento europeu a alquimia e as terapias naturais passaram a ser estudadas, atuando como precursoras da cosmetologia, medicina e perfumaria⁷. Já no século XX destacou-se a figura do químico

francês Gattefossé, o primeiro a utilizar o termo “*aromatherapie*” e a descrever utilizações terapêuticas dos óleos essenciais.

Em meados da década de 1930, Dr. Godissart fundou uma clínica em Los Angeles - EUA que utilizava óleos essenciais em emplastos e inalações com finalidade terapêutica para o tratamento de úlceras, gangrenas e câncer de pele²⁶. Um cirurgião francês, Jean Valnet, fez uso de OE durante a Segunda grande Guerra para tratar os feridos²⁵, o que mais tarde o levou a escrever o livro “Aromaterapia – tratamento das enfermidades pelas essências das plantas”. Foi a partir dos relatos da prática de estudiosos como Gattefossé e Valnet que a Aromaterapia passou a integrar o meio científico.

A Aromaterapia está mais consolidada como ciência na Inglaterra e na França, sendo que nesta última constitui-se como uma especialidade médica, enquanto que entre os ingleses apresenta uma conotação de terapia complementar. A prática também é utilizada em outros países como EUA, Austrália e, culturalmente, em países do Oriente.

2.3 AROMATERAPIA E ENFERMAGEM

Os legados deixados por Florence Nightingale não só para a Enfermagem, mas também para outras áreas do conhecimento, são amplamente conhecidos e isso se aplica igualmente à Aromaterapia. Florence foi pioneira na introdução de OE no cuidado assistencial. Durante a Guerra da Criméia ela foi responsável por indicar a aplicação de OE de Lavanda na frente dos soldados feridos com a finalidade de acalmá-los, pois afirmava que era fundamental modificar os aspectos nocivos do ambiente para favorecer a reabilitação dos enfermos²⁸.

Entretanto, a primeira Enfermeira Aromaterapeuta foi Marguerite Maury, atualmente considerada um ícone da Aromaterapia moderna²⁶. Nascida na Áustria em 1885, Marguerite casou-se aos dezessete anos e após sofrer três grandes perdas (seu filho com dois anos de idade, seu marido durante a primeira guerra e seu pai cometeu suicídio) volta aos estudos, formando-se Enfermeira e assistente cirúrgica. Em seguida, mudou-se para a França onde entrou em contato com a Aromaterapia através de um livro. Em meados dos anos de 1930, Marguerite conheceu um médico, Dr. Maury, que se interessava pela cura por meio de formas naturais como Homeopatia, Acupuntura, Radiestesia, Meditação, Zen, Yoga, entre outras. Juntos passaram a estudar essas práticas complementares de saúde. O reconhecimento de Maury como referência na Aromaterapia deve-se ao fato de ter integrado os princípios holísticos da Enfermagem à elaboração de prescrições terapêuticas individuais para massagem associada ao uso de OE²⁹. Além disso, por meio de seus estudos, Marguerite tentou demonstrar a atuação dos OE sobre o sistema nervoso, particularmente no Sistema Límbico. A partir daí ela ministrou cursos e palestras por toda a Europa difundindo o mecanismo de ação dos óleos essenciais e abriu a primeira clínica Aromaterápica em Londres²⁹ e outras unidades, posteriormente, na França e Suíça. Devido a essa vertente de estudos desenvolvida por Maury, ela passou a ser mais conhecida por sua atuação como bioquímica do que Enfermeira.

Atualmente, a Aromaterapia tem despertado o interesse da comunidade científica, inclusive da Enfermagem, pelo fato de ser uma prática passível de ser aplicada em diversas áreas da saúde, além de apresentar evidências de resultados positivos³⁰.

Pelo fato do Enfermeiro ter uma formação holística e lidar diretamente com a atenção integral à saúde da comunidade, a Aromaterapia representa a este profissional uma nova ferramenta para assistência³¹. Tal prática pode ser utilizada tanto no apoio a desequilíbrios físicos quanto emocionais. Nesse sentido, transpondo-se a Aromaterapia para a perspectiva das Teorias de

Enfermagem, essa terapia atuaria como instrumento capaz de restabelecer o equilíbrio, conforme proposto por Horta³² ou, segundo Rogers³², trabalharia no cuidado para que os indivíduos atinjam seu potencial máximo de saúde tanto em âmbito físico quanto emocional.

Para Myra Levine – outra teórica de Enfermagem – o ser humano deve ser visto como um todo, complexo e dependente da interação com os outros e com o ambiente³². Cabe, portanto, ao Enfermeiro estar ciente dessa dependência e auxiliar no processo de transformação, evitando que o estresse causado por algum desequilíbrio modifique o funcionamento do organismo humano³², promovendo sua integridade. Neste outro ângulo entraria novamente a Aromaterapia. Pelo fato do homem sempre estar inserido num meio no qual gera influências e é influenciado, e sabendo-se que originalmente seu habitat é em meio a natureza, os OE atuam como uma “ponte” capaz de transpor o ser humano moderno aos seus instintos mais primitivos (olfato), restabelecendo uma ligação com o seu meio de origem e melhorando a resposta do organismo frente aos agentes estressores.

É importante ressaltar que, dentre as profissões da saúde, a Enfermagem foi pioneira em reconhecer as práticas complementares em saúde por meio da Resolução 197 de 1997 do Conselho Federal de Enfermagem³³. Em tal resolução as PCS estão estabelecidas como uma Especialidade de competência do profissional de Enfermagem, desde que este conclua algum curso na área específica, em instituição reconhecida de ensino e com carga horária mínima de 360 horas³³.

A regulamentação das PCS pelo COFEN³³ garante a segurança do profissional não somente para atrelar o uso das mesmas à assistência, como na indicação de óleos essenciais como complemento das Intervenções de Enfermagem, mas também como respaldo aos Enfermeiros-pesquisadores para que se desenvolvam estudos científicos. Tais ações asseguram a afirmação da Enfermagem como profissão por meio do crescimento da prática baseada em evidências.

2.4 FARMACOGNOSIA: EXTRAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DOS OE

Em Farmacognosia é considerado droga toda parte, órgão ou derivados de produtos vegetais ou animais que após passarem por um processo de coleta, preparo e conservação, servindo de base para medicamento³⁴.

A colheita da matéria prima é fundamental para se obter princípios ativos de qualidade, sendo que a concentração dessas substâncias também é influenciada pelo horário em que ela é feita. Os óleos essenciais têm sua quantidade mais reduzida por volta do meio-dia, a qual também varia de acordo com a época do ano e estágio de desenvolvimento do vegetal³⁴.

Os óleos essenciais são substâncias altamente voláteis extraídas dos vegetais e que possuem algum princípio ativo devido à sua complexa composição química. As propriedades singulares desses compostos extremamente concentrados decorrem justamente dessa característica química de conter inúmeras substâncias, impedindo que um óleo natural seja substituído por outro sintético, apesar de sua semelhança olfativa. Enquanto os produtos sintéticos, denominados “essências”, atuam de uma única maneira no organismo, os OE agem de forma mais abrangente²⁶ devido ao *blend* químico de sua composição.

Os OE podem ser extraídos de diversas partes dos vegetais: das flores, folhas, caules, raízes, sementes, frutos ou mesmo da resina. A extração dos óleos essenciais pode ser feita por quatro mecanismos distintos: destilação, *enfleurage*, através do uso de solventes ou prensas mecânicas. A destilação consiste em colocar o material vegetal em um alambique, dentro do qual passa-

se vapor fazendo com que os OE evaporem juntamente com água e outras substâncias. Posteriormente, o destilado é resfriado e os óleos essenciais são separados da água, já que são imiscíveis. O método de extração de OE por meio do uso de gorduras é conhecido por *enfleurage*. Coloca-se a planta num vidro contendo óleo vegetal e deixa-se exposto ao sol por duas semanas. Após esse período, a planta é espremida e novas ervas são colocadas no óleo aromático²⁷.

A extração de OE por meio de solventes é feita através da imersão do material vegetal no solvente como, por exemplo, acetona ou álcool, e a separação é feita por meio de destilação. Toma-se cuidado com a precisão das temperaturas, uma vez que apenas o OE deve ser condensado para que se garanta a qualidade do produto. Se um OE contiver vestígios do solvente utilizado ele torna-se inadequado para fins aromaterapêuticos²⁷.

Por fim, a extração mecânica utiliza prensas que realizam a expressão da matéria vegetal de interesse, em geral cascas de frutas cítricas, até se obter o óleo essencial misturado com um pouco do suco. Para completar o processo, pode-se aplicar o método da destilação⁷.

Na legislação brasileira é interessante notar que a definição de óleo essencial encontra-se no anexo da RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007 – ANVISA que dispõe sobre o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes para alimentos. Nesta resolução consta que OE “são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico”³⁵, processos estes já descritos anteriormente. Existem alguns produtos no mercado que embora tenham sido elaborados para fins terapêuticos se utilizam do Anexo I da RDC nº 278, de 22 de setembro de 2005, que dispõe uma lista de alimentos e embalagens dispensados da obrigatoriedade de registro. Neste caso, o óleo essencial se enquadraria na categoria de “óleo vegetal” e se apresentaria como dispensado de registro na agência reguladora. Entretanto, em resolução anterior a estas duas citadas, a RDC nº 48, de 16 de março de 2004, informa no seu item “definições” que produtos de extração da matéria prima vegetal são derivados

de droga vegetal, constando dentre eles óleos, os quais deverão ser registrados como fitoterápicos³⁶.

Apesar de ser possível registrar um OE como fitoterápico é importante salientar que a aromaterapia se distingue da fitoterapia porque apesar das duas linhas terapêuticas trabalharem diretamente com produtos vegetais e ambas serem capazes de produzir efeitos farmacológicos, na primeira existe também a atuação no sistema olfativo³⁷.

Os OE são produzidos pelo metabolismo secundário da planta, pois são elaborados a partir de metabólitos primários e produtos utilizados pelo próprio vegetal para proteção contra patógenos e atração de polinizadores³⁸. Dentre os componentes químicos dos OE destacam-se os fenilpropanoides e terpenos, sendo este último encontrado em maior frequência³⁹. As grandes variações encontradas nas composições dos OE dependem da origem do vegetal, do estágio de desenvolvimento e da parte utilizada para a extração do óleo⁴⁰.

Os efeitos positivos dos óleos essenciais estão associados aos seus princípios ativos e compostos secundários⁴¹. Princípio ativo é uma substância ou um conjunto de substâncias quimicamente bem definidas que produzem ação farmacodinâmica³⁴. São os princípios ativos que conferem uma característica terapêutica às plantas e seus derivados. Portanto, os OE são considerados princípios ativos pelo fato de conseguirem penetrar através da membrana celular e participar do metabolismo da célula.

Em nível celular não se conhece ao certo qual o mecanismo de ação exato dos OE. Acredita-se que a maioria dos óleos essenciais exerça efeito antimicrobiano atuando na estrutura da parede celular do microrganismo patogênico, desnaturando e coagulando proteínas. A atuação se daria na alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática devido ao caráter lipofílico dos OE, o que interromperia os processos vitais da célula, tais como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas. Essas ações resultariam na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, ocasionando a morte do patógeno⁴².

Em seres humanos e animais, o reconhecimento e discriminação de odores resulta em influências profundas em seus comportamentos⁴³ e, baseando-se neste preceito é que a Aromaterapia atua. A forma de atuação dos OE nesses seres depende da via pela qual a substância entra em contato com o organismo, que pode ser através da inalação, contato cutâneo ou ingestão (representadas na Figura 1). Pela via olfativa, os OE estimulam os nervos olfativos que, por sua vez, têm uma ligação direta com o Sistema Límbico⁶, o qual é responsável por emoções, sentimentos e impulsos motivacionais.

Embora o mecanismo de ação fisiológica da Aromaterapia não esteja bem estabelecido, infere-se que esta produza um estímulo que resulte na liberação de neurotransmissores, como encefalinas e endorfinas, os quais têm efeito analgésico e produzem sensação de bem-estar e relaxamento⁴⁴. Quando se inala um OE, as moléculas atravessam as vias respiratórias superiores chegando às vias inferiores, onde são absorvidas pelos vasos sanguíneos pulmonares e distribuídos pelos órgãos e tecidos por meio da circulação⁶. Ao ser administrado pela via cutânea, o OE penetra na pele ou mucosa, é absorvido e entra na corrente sanguínea para ser distribuído pelos diferentes tecidos corporais. Se ingeridos, os OE são absorvidos nos intestinos, alcançando a corrente sanguínea e distribuídos por todo o organismo⁶. Nas duas últimas vias de atuação, além da estimulação nervosa e sensorial há ação do princípio ativo presente no OE.

Figura 1. Fluxograma da ação dos OE no organismo. São Paulo, 2012.

2.5 ÓLEO ESSENCIAL DE TEA TREE (OTT)

O nome “Tea Tree” pode-se referir a qualquer planta do gênero *Melaleuca* ou *Leptospermum*, ambas pertencentes à família das Mirtáceas (*Myrtaceae*). Entretanto, este trabalho refere-se ao “Tea Tree” cujo termo foi utilizado pela primeira vez, em 1777, pelo capitão James Cook durante sua segunda viagem à Austrália. Cook e seus homens observaram que os aborígenes da região norte de *New South Wales* elaboravam um chá a partir

das folhas verdes escuras de um arbusto o qual denominaram “Tea Tree”⁴⁵. Além de bastante aromática, os nativos diziam que tal bebida apresentava propriedades medicinais⁴⁵.

O óleo essencial de Tea Tree (OTT), já tão utilizado há milênios pelos aborígenes, atualmente tem sido empregado como princípio ativo de formulações tópicas para tratar infecções, principalmente cutâneas, devido as suas propriedades antimicrobianas¹¹. O uso desse OE em diversos compostos com finalidade terapêutica destaca-se na Austrália, países Europeus e na América do Norte¹¹.

O OE da *Melaleuca alternifolia* é obtido por meio da destilação de suas folhas e a rentabilidade da produção depende tanto do rendimento da folha quanto da concentração do óleo na mesma no momento da colheita⁴⁶. Nos meses mais frios, a concentração do óleo reduz quando comparada com épocas mais quentes, entretanto essas variações não são muito significativas. Em relação ao período do dia, o teor é maior por volta das 9h30 da manhã⁴⁶.

No ano de 1989, em um dos primeiros estudos sobre a composição do OTT, pesquisadores, após avaliarem a cromatografia gasosa de mais de 800 amostras distintas do óleo, constataram a presença de aproximadamente cem componentes diferentes neste tipo de OE⁴⁷.

Quimicamente o OTT é constituído principalmente por hidrocarbonetos terpênicos, como monoterpenos, sesquiterpenos, 1,8-cineol e terpenen-4-ol. Penfold, segundo Knight e Hausen, em 1925, atribuiu a atividade antimicrobiana do OE de *Melaleuca alternifolia* ao principal componente, o qual apresenta uma representatividade em torno de 40% na constituição do óleo, que é o terpenen-4-ol⁴⁸ (Figura 2). Este componente apresenta uma relação inversamente proporcional à concentração do 1,8-cineol presente na planta⁴⁸.

Figura 2. Estrutura química molecular do terpinen-4-ol.

Fonte: Brophy *et al.* Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca* Terpinen-4-ol Type (Australian Tea Tree). *J Agr Food Chem.* 1989; 37(5):1330-1335. p.1333.

De acordo com o Comitê Australiano de Padronização⁴⁹ (Australian Standard AS2782, 2009), o OTT deve conter 1,8-cineol em quantidades menores que 15% e terpinen-4-ol acima de 30%⁴⁹. Tais recomendações devem-se ao fato de o 1,8-cineol ser um irritante para a pele em potencial⁵⁰ em altas dosagens, e o terpinen-4-ol o principal responsável pela atividade antimicrobiana dentre os componentes do OE, justificando assim a necessidade de maiores concentrações⁵¹.

Embora o OTT tenha sido incluído apenas recentemente nas referências científicas de estudos sobre PCS, nas literaturas tradicionais sobre Aromaterapia são encontrados diversos efeitos benéficos desse óleo. Suas principais propriedades estão descritas como imunoestimulante, antifeccioso, fungicida, antiinflamatório e antisséptico^{6-7,25,27}.

Na literatura científica o OTT também tem demonstrado atividades antimicrobianas, dentre eles antibacteriana¹¹, antifúngica^{10,52-54} e antiviral^{12,55-56}, além de efeito antiinflamatório⁵⁷⁻⁵⁸. Tais estudos discorrem sobre diversas aplicações do OTT por via cutânea e *in vitro*, principalmente no que diz respeito ao tratamento de infecções.

Um exemplo desses estudos é em relação à propriedade imunoestimulante e antiinflamatória do óleo essencial de Tea Tree. Pesquisas experimentais laboratoriais demonstraram que o OTT pode ser benéfico para tratar inflamações de pele, pois os componentes desse OE suprimem a produção de mediadores inflamatórios através da ativação de monócitos humanos, sem que haja a ativação de neutrófilos⁵⁷⁻⁵⁸. Tais estudos verificaram que o terpenen-4-ol, o principal composto do OTT, reduz significativamente a produção de lipossacarídeos pelos monócitos ativados, dos mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucinas 1 e 8 e prostaglandina E2 (PGE2), bem como a regulação de citocinas e anti-inflamatórios, IL-10.

Em relação à propriedade antibacteriana do OTT estudos têm evidenciado esta atividade frente a uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus¹¹. Inclusive já foi examinado o efeito do OTT sobre o desenvolvimento de resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* indicando que este óleo e o terpinen-4-ol, seu principal componente ativo, têm pouco impacto sobre o desenvolvimento da resistência antimicrobiana⁵⁹.

Pesquisadores australianos demonstraram ações *in vitro* do OTT para se determinar as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas para diversas cepas de microrganismos presentes na microbiota da pele⁵⁰. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com a concentração de OTT variando em torno de 0,06 à 5,00% para a grande maioria dos microrganismos. As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas foram as mesmas para cada um dos Gram-negativos testados; já para os Gram-positivos elas foram variáveis⁵⁰. Este estudo ainda sugere um possível efeito residual contra microbiota transitória e que preparações contendo OTT para lavagem das mãos devem ser investigadas quanto a sua eficácia.

Tratando-se ainda de microbiota da pele, um outro estudo testou a eficácia de formulações para a higienização das mãos por dois métodos. Para

um modelo *in vivo*, seguiu-se o método europeu para produtos de lavagem de mãos (EN1499⁶⁰). Foi avaliada a eficácia antimicrobiana frente *Escherichia coli* K12 de dois produtos contendo OTT: solução alcoólica à 10% + 5% OTT; Polissorbato 80 à 0,001% + OTT 5% frente a um sabão de referência (*soft soap*)⁶¹. Para o modelo *ex vivo* foram utilizadas amostras de pele obtidas de cirurgias plásticas de mama e abdominal nas quais se inoculou a mesma bactéria-teste. As formulações testadas foram mais eficazes no teste realizado *in vivo*, demonstraram-se, em média 0,6 a 1,28 vezes mais ativos do que em *ex-vivo*. Além disso, tanto as higienizações realizadas com solução alcoólica + OTT quanto Polissorbato 80 + OTT foram mais eficazes do que o procedimento feito com o produto referência⁶¹.

O OTT tem sido considerado um agente promissor na questão da descolonização nasal em pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)⁶². Caelli *et al.*⁶³ conduziram um ensaio clínico randomizado com 30 pacientes adultos infectados ou colonizados por MRSA, que comparou a descolonização por mupirocina 2% pomada nasal e lavagem corporal com triclosan *versus* descolonização nasal com pomada de Tea Tree 4% e óleo corporal para banho com OTT à 5%, por ao menos 3 dias. Ressalta-se que todos os pacientes receberam vancomicina via endovenosa. Constatou-se que embora a dupla de produtos contendo *Melaleuca* tenha apresentado um desempenho melhor do que o uso de triclosan e mupirocina, o número de pacientes foi pequeno para demonstrar diferenças estatisticamente significativas, entretanto os resultados obtidos pelos dos grupos foram similares⁶³.

Um outro ensaio clínico randomizado também comparou dois protocolos para descolonização de MRSA⁶⁴. O protocolo padrão, realizado em 114 pacientes, aplicou mupirocina nasal 2% (3 vezes ao dia por 5 dias), banho com sabonete com clorexidina 4% (pelo menos 1 vez ao dia por 5 dias) e aplicação diária por cinco dias de sulfadiazina de prata 1% em lesões, feridas ou úlceras. O protocolo que utilizou OTT em 110 pacientes aplicou um creme com Tea Tree

à 10% em narinas (3 vezes ao dia por 5 dias), banho com um sabonete contendo OTT 5% (pelo menos 1 vez ao dia por 5 dias) e creme com OTT 10% em lesões, feridas ou úlceras. Os resultados demonstraram que a mupirocina nasal foi mais eficaz do que o OTT. Contudo, as preparações com o óleo de Tea Tree para banho e lesões de pele foram mais eficazes do que a clorexidina ou a sulfadiazina de prata, respectivamente.

Sobre a atividade antifúngica do óleo de *Melaleuca*, um estudo realizado com leveduras mostrou que *Candida albicans* tratadas com OTT em concentrações entre 0,25 a 1,00% tiveram alterações da permeabilidade e fluidez da membrana⁵³.

Em relação à atividade antiviral do OTT estudos reportaram que este OE exibe um efeito antierpético quando aplicado numa formulação em gel, numa concentração de 6% deste princípio ativo⁵⁵. Além disso, outro artigo se refere ao OTT como um agente tópico terapêutico promissor no tratamento da infecção por herpes recorrente⁵⁶.

Já foram testados alguns cosméticos que continham OTT como principal agente anti-séptico⁶⁵⁻⁶⁶ para o tratamento de caspa. Acredita-se que tal afecção seja ocasionada pela levedura *Pityrosporum ovale*. A concentração de *Melaleuca alternifolia* à 5% foi utilizada na formulação de um xampu anticaspacasma⁶⁵. Este ensaio clínico randomizado, simples cego, realizado com 126 pacientes que tinham problemas com caspa leve a moderada, demonstrou que não ocorreram efeitos adversos⁶⁵. Grupos controle e intervenção utilizaram placebo ou xampu com OTT 5%, respectivamente, durante quatro semanas e, após esse período, houve redução no grupo intervenção de 41% das lesões do couro cabeludo se comparado à 11% do grupo controle⁶⁵.

Pesquisadores desenvolveram um sabonete íntimo com a concentração de 0,45% de OTT, com pH adequado. Verificaram que a temperatura influencia na estabilidade da formulação, recomendando a sua conservação em

temperaturas mais amenas⁶⁶. Entretanto, não houve pesquisa para apontar o produto como sendo ou não eficaz no tratamento de candidíase vaginal.

Há relatos de aplicação de OTT diretamente na pele que apontam a ocorrência ou não de reações alérgicas. Estudos sobre reações dermatológicas de hipersensibilidade após a exposição ao níquel constataram que a aplicação de OTT diretamente na área afetada reduz a urticária⁶⁷⁻⁶⁸. Em um deles utilizou-se OTT à 100% comparado à loção placebo (sem OTT), loção com óleo de macadâmia ou loção com OTT à 5% que foi mais eficaz na redução do eritema⁶⁷. Já Wallengren⁶⁸ usou diluições de 20 e 50% do OTT e comparou-as com outros produtos para tratamento de dermatite de contato, como óxido de zinco e butirato de clobetasol. O OTT apresentou um resultado semelhante ao obtido pelo clobetasol, o qual apresentou o melhor desempenho, e superior em relação aos demais produtos testados.

Existem também casos relatados na literatura sobre reações adversas após o uso de OTT. São dois casos australianos e datam de 1991⁶⁹. No ano seguinte, foi publicado um relato de caso sobre um paciente com dermatite de contato decorrente da exposição ao óleo de Tea Tree, exacerbada pela ingestão do mesmo óleo essencial⁷⁰. Knight e Hausen⁴⁸ descreveram sete casos de pacientes que apresentaram dermatite alérgica de contato após exposição ao OTT à 100%, entretanto ressaltaram que outros produtos que contenham baixa concentração de óleo de *Melaleuca*, ao serem usados sobre a pele íntegra, não necessariamente causarão reações de sensibilização⁴⁸. Este estudo ainda ressaltou que dos componentes do OTT testados, os que mais comumente causaram reações alérgicas foram o d-limoneno seguido pelo aromadendreno e α -terpeno. Os menos sensibilizantes foram o terpinen-4-ol, *p*-cimeno e α -felandreno⁴⁸. Uma revisão retrospectiva de 41 casos de alergia ao OTT, em concentrações de 5% e 10%, evidenciou que os casos são mais comuns na formulação de maior concentração e desencorajou a aplicação de soluções com concentrações acima desses valores⁷¹.

A permeabilidade do OTT através da pele humana foi investigada por meio de um estudo *in vitro* que utilizou pele retirada durante uma cirurgia plástica, o qual verificou que o terpenen-4-ol, o principal componente deste OE, permeia facilmente através da epiderme, sendo que preparações semi-sólidas penetram mais rapidamente do que emulsões, seguidas por cremes⁷². Isso reforça as formas de atuação da Aromaterapia, pois tal estudo demonstra que o OE, no caso de Tea Tree, penetra através da pele até atingir a corrente sanguínea, a partir da qual é distribuído pelos órgãos e tecidos corporais.

Recentemente, publicações sobre série de casos⁷³ e relato de caso a respeito do tratamento de feridas crônicas⁷⁴, sendo algumas colonizadas por MRSA, demonstraram sucesso ao realizar curativos impregnados com OTT nas concentrações de 3,3 e 10%, respectivamente. Estudos como esses refletem uma nova possibilidade para a utilização dos OE na área da Enfermagem: na estomatoterapia.

2.6 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS): CENÁRIO

2.6.1 A ocorrência mundial

A ocorrência das IRAS passou a ser mensurada a partir da década de 1970, pelo CDC sediado em Atlanta - EUA, tendo como projeto-piloto avaliar as taxas de infecções hospitalares em oito hospitais comunitários, sendo que a taxa média encontrada foi de 5% e ficou conhecido como CHIP

(*Comprehensive Hospital Infections Project*)⁷⁵. Fundamentado neste estudo, o CDC instituiu o programa *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS), com o objetivo de monitorar, avaliar e identificar a epidemiologia das IRAS⁷⁶.

Ainda na década de 1970 teve início o projeto SENIC (*Study of Efficacy of Nosocomial Infection Control*), desenvolvido durante o período de dez anos e que contou com 338 hospitais participantes. Os resultados foram concluídos em 1985 e demonstraram a prevalência das principais IRAS: Infecções do Trato Urinário (ITU) – 45%, Infecções de Sítio Cirúrgico (ISC) – 29%, Pneumonias – 19%, Infecções de Corrente Sanguínea – 2%, outros – 6%⁷⁶.

No período de 1983 a 1985, a OMS realizou um estudo com a finalidade de verificar os índices de IRAS em 14 países. A avaliação foi feita por meio de um protocolo padrão aplicado por médicos e enfermeiros e teve como resultado taxas de infecção variando entre 3% a 21%⁷⁷. Os próprios pesquisadores reconhecem que a amostra do estudo não foi altamente representativa, entretanto foi importante para destacar a relevância das IRAS nas práticas de saúde.

A Organização Panamericana de Saúde (OPAS) reuniu-se em 1990 em Washington, juntamente com a Sociedade Americana de Epidemiologistas dos Serviços de Saúde (SHEA), e realizaram uma Conferência Regional sobre Prevenção e Controle de IRAS. Esse encontro envolveu profissionais da Argentina, Bermuda, Brasil, Canadá, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Chile, Equador, Estados Unidos, Guatemala, Jamaica, México, Panamá, Peru, Porto Rico, Uruguai e Venezuela. De tal reunião resultaram algumas recomendações, dentre as quais destacam-se a criação e manutenção das comissões nacionais de prevenção e controle de IRAS nos países em que ainda não existiam; instauração de programas de controle de IRAS nos hospitais; inclusão do tema de IRAS nos cursos da saúde e realização de análises epidemiológicas por meio de ações conjuntas entre instituições públicas e universitárias nos respectivos países⁷⁸.

2.6.2 Panorama das IRAS no Brasil

No país, a problemática das IRAS só passou a fazer parte das preocupações do Estado a partir da década de 1970, quando se observou que a demanda dos serviços de saúde havia aumentado sem que houvesse melhora da qualidade da assistência prestada.

Com o falecimento do ex-presidente Tancredo Neves por IRAS, o assunto tornou-se foco de interesse da mídia que passou a explorar o tema dispondo sobre os riscos e realizando denúncias⁷⁹. A partir desse contexto representado pela piora da assistência, o MS promulga a Portaria 196/83, na qual ficam estabelecidos critérios para classificação das infecções hospitalares e determina sobre a criação das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) nos hospitais⁸⁰.

Após a publicação da Portaria 196/83, o MS capacitou mais de 14000 funcionários, que posteriormente, em 1994, participaram do primeiro estudo brasileiro sobre IRAS. O projeto denominado Estudo Brasileiro da Magnitude das Infecções Hospitalares e Avaliação da Qualidade das Ações de Controle de Infecção Hospitalar incluiu 99 hospitais terciários, localizados nas capitais brasileiras, e seus pacientes com internação superior a 24 horas. Segundo os dados, foram avaliadas as taxas de IRAS e constatou-se que estas eram maiores nos hospitais públicos (18,4%) do que nos hospitais privados sem fins lucrativos (10,0%). Em relação às regiões, as taxas encontradas foram de 16,4% na região Sudeste, 13,1% na região Nordeste, 11,5 na região Norte, 9,0% na região Sul e 7,2% na região Centro-oeste⁸¹.

No ano de 1997 foi promulgada a Lei nº 9.431 que delineia sobre a obrigatoriedade do Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH) nos hospitais por meio do desenvolvimento de ações sistemáticas com finalidade de reduzir as IRAS⁸².

Com a Portaria do Ministério da Saúde 2616/98¹³ foi reforçada a presença do PCIH por meio de sua execução por um órgão institucional: a CCIH, responsável pela organização, cumprimento do programa e determinações sobre as atividades destinadas a um Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH). Essa normatização recomenda a instauração de um sistema de vigilância epidemiológica das IRAS por meio do registro e observações sobre a incidência e prevalência das infecções, visando avaliar a real assistência prestada.

Em junho de 2000 foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar, por meio da Resolução RDC nº 48 de 02/06/2000⁸³, a fim de implementar ações que contribuam para redução dos índices de IRAS. Essas afecções são a principal causa de adoecimento e morte entre pacientes hospitalizados, sendo que cerca de 20 a 40% de tais ocorrências são resultantes de infecções cruzadas transmitidas via mãos de PS⁸⁴.

2.7 HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS NA PREVENÇÃO DAS IRAS

A importância de higienizar as mãos está no fato de que esta técnica evita a transferência de microrganismos de uma superfície para outra, seja por contato direto ou indireto. Isso ocorre porque as mãos dos PS são capazes de veicular quantidades consideráveis de microrganismos de paciente para paciente, ou do próprio ambiente para pacientes, possibilitando a ocorrência de transmissões cruzadas, as quais aumentam os índices de IRAS²⁴. A contaminação das mãos dos PS ocorre frequentemente como resultado do contato com superfícies ambientais contaminadas⁸⁴.

Os primeiros guias sobre lavagem de mãos foram publicados entre 1975 e 1985 pelo CDC-EUA²⁴. Tais guias recomendavam que as mãos fossem lavadas com sabonete não-antimicrobiano antes e após o contato com os pacientes e com sabonete antisséptico antes e após procedimentos invasivos ou ao prestar assistência a pacientes críticos. Soluções alcoólicas ou antissépticos hidratados eram recomendados apenas em situações de emergência ou em áreas não providas de pias.

Outros guias sobre lavagem das mãos foram publicados pela Associação para Profissionais de Controle de Infecções – APIC (*Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*) entre 1988 e 1995, com indicações similares às recomendadas pelo CDC. A primeira sugestão do uso de sabão com antisséptico ou uso de produto não-hidratado para higiene das mãos pós-cuidados de pacientes com patógenos multirresistentes foi feita pelo Comitê consultivo em Práticas de Controle de Infecções do CDC - HIPAC (*Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee*)⁸⁵.

Em nova publicação, o CDC, em 2002, alterou o termo “lavagem das mãos” para “higienização das mãos” visto que este último é de maior abrangência e inclui os diversos tipos de produtos utilizados para este procedimento, inclusive as preparações alcoólicas sem enxágüe²⁴.

Ainda em âmbito internacional, desde de 2006, a OMS tem como uma de suas seis metas reduzir o risco de infecções associadas aos cuidados de saúde e, de acordo com suas diretrizes, a higiene das mãos é uma medida primária fundamental para se atingir este objetivo⁸⁶.

No Brasil, em 1989, o MS editou um manual intitulado “Lavar as Mãos: informações para os profissionais de saúde” com a finalidade de normatizar a técnica e atualizar os PS⁸⁷. A higiene das mãos continua sendo preconizado pelo MS, tanto que no Anexo IV da Portaria nº 2616/98, a qual discorre a respeito do Programa de Controle de Infecções Hospitalares, foram incluídas recomendações sobre o processo de higienização das mãos¹³. Mais

recentemente, a ANVISA disponibilizou duas publicações que versam sobre a relevância desta prática, inclusive, orientando sobre a forma de realizar a técnica correta e quais os produtos indicados para cada situação da assistência^{35,88}.

2.8 MICROBIOTA DAS MÃOS

Na microbiota da pele temos presente duas populações: a residente e a transitória⁸⁹. A microbiota residente está localizada nos estratos mais profundos da camada córnea e, em situações normais, é capaz de se manter em equilíbrio com as defesas de seu hospedeiro. São microrganismos de difícil remoção através da escovação, entretanto, podem ser reduzidos pela aplicação de antisépticos. Apesar de estarem menos associadas à ocorrência das IRAS, podem ser responsáveis por infecções sistêmicas graves em pacientes imunodeprimidos ou submetidos a procedimentos invasivos¹⁸. A microbiota residente, por estar localizada às camadas mais profundas do tecido epitelial, é mais resistente à remoção apenas por água e sabonete⁸⁸.

A microbiota transitória é composta por microrganismos de fontes exógenas que se depositam na superfície da pele, os quais são viáveis por apenas um curto período e podem ser removidos facilmente por meio da ação mecânica da lavagem de mãos, pela aplicação de formulações alcóolicas ou degermantes⁸⁸. Pode ser adquirida por meio do contato direto com pacientes ou contato com superfícies e materiais contaminados. Em geral é constituída por bactérias Gram-negativas, como as Enterobacterias, *Pseudomonas spp*, bactérias aeróbicas formadoras de esporos, fungos e vírus. Esta microbiota das mãos é composta pelos microrganismos mais comuns encontrados em casos

de IRAS, o que demonstra a importância das mãos como veículo de transmissão¹⁸.

Em publicação específica sobre higienização das mãos, a ANVISA referiu que os microrganismos mais relevantes causadores de IRAS presentes na microbiota transitória são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e leveduras do gênero *Candida*⁹⁰. Dentre os patógenos citados destacam-se ainda os que apresentam multi-resistência como *S. aureus* e *S. epidermidis*, resistentes à oxacilina/meticilina; *Enterococcus* spp., resistente à vancomicina; *Enterobacteriaceae*, resistente às cefalosporinas de 3ª geração e *Pseudomonas aeruginosa*, resistente aos carbapenêmicos⁹⁰.

2.9 CONCEITO DE HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS

A higienização das mãos é a medida mais antiga, simples e menos dispendiosa para se prevenir a disseminação de IRAS⁹⁰ e tem como finalidade remover a microbiota transitória da pele e reduzir parte da microbiota residente.

As mãos dos PS podem ser higienizadas de duas maneiras: higienização simples das mãos com sabão não antimicrobiano ou com produtos antissépticos (associado ou não à escovação). A seleção do método para higiene das mãos varia de acordo com o nível de contaminação, tipo de procedimento a ser realizado e necessidade de manter ou não uma atividade antimicrobiana.

2.9.1 Higienização simples das mãos

2.9.1.1 Higienização simples das mãos com sabão não-antimicrobiano

É realizada com sabonete comum que não contém agentes assépticos, apenas conservantes. Recomenda-se o uso de sabonete líquido e tipo refil em serviços de saúde com a finalidade de se reduzir o risco de contaminação do produto⁸⁸.

Este tipo de higienização remove apenas a microbiota transitória, sendo indicado para a maioria das atividades realizadas nos serviços de saúde. Entretanto, a eficácia desta prática vai depender da qualidade da técnica que foi empregada durante o procedimento e sua duração deve ser de 40 a 60 segundos⁸⁸.

A redução logarítmica da microbiota transitória das mãos aumenta com a duração da higienização simples das mãos. Observando-se PS verificou-se que o tempo de uma lavagem de mãos variava de 6 a 24 segundos. Portanto, uma expectativa realista é uma redução de 0,6 a 1,1 $\log_{10}$ após um episódio típico de 15 segundos de higiene simples das mãos⁹¹.

A higienização simples das mãos com sabão comum é indicada quando as mãos estão visivelmente sujas, após usar toalete, antes das refeições ou preparo destas, antes de manipular medicações e ao iniciar um turno de trabalho²⁴.

2.9.1.2 Higienização simples das mãos com produto antisséptico

Antissépticos são substâncias aplicadas na pele com o objetivo de reduzir a carga de microrganismos que constitui a microbiota. Os principais agentes antissépticos utilizados são: álcoois, clorexidina, compostos de iodo, iodóforos, triclosan⁸⁸ e o quartenário de amônia²⁴ em alguns países, mas de pouca relevância no Brasil. Na Tabela 1 estão representados os principais tipos de antissépticos utilizados para higienização das mãos, bem como seu espectro e velocidade de ação.

Tabela 1. Espectro antimicrobiano e características dos agentes antissépticos* para higienização das mãos. Atlanta – EUA, 2002.

Grupo	Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas	Mico-bactérias	Fungos	Vírus	Ação	Comentários
Álcoois	+++	+++	+++	+++	+++	R	Concentração ótima: 70%; não apresenta efeito residual.
Clorexidina (2% ou 4%)	+++	++	+	+	+++	I	Apresenta efeito residual; raras reações alérgicas.
Compostos de Iodo	+++	+++	+++	++	+++	I	Causa queimaduras na pele; irritantes quando usados na higienização antisséptica das mãos.
Iodóforos	+++	+++	+	++	++	I	Irritação de pele menor que a de compostos de iodo; apresenta efeito residual; aceitabilidade variável.
Triclosan	+++	++	+	-	+++	I	Aceitabilidade variável para as mãos.
Compostos de Quaternário de Amônia	+	++	-	-	+	L	Usado somente em combinação com alcóois; preocupação ecológica.

+++ = excelente; ++ = bom, mas não inclui todo espectro de bactérias; + = regular; - = sem atividade ou insuficiente. R = rápida; I = intermediária; L = lenta

*Hexaclorofeno não está incluído por não ser mais aceito como produto antisséptico para mãos

Fonte: CDC. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. 2002; MMWR, 51(RR-16) p.454.

A higienização das mãos com detergentes antissépticos é indicada em casos de precaução de contato de pacientes portadores de microrganismos multirresistentes e em situações de surtos⁹⁰. Já o uso de preparações alcoólicas é indicado para as mesmas situações que os detergentes com ou sem antissépticos, exceto quando as mãos encontram-se visivelmente sujas⁹².

2.9.1.2.1 Alcoóis

São considerados antimicrobianos não específicos porque possuem múltiplos modos de atuação, porém seu principal mecanismo de ação é coagulando/desnaturando proteína. O álcool induz a coagulação das proteínas na parede celular, na membrana citoplasmática e em proteínas plasmáticas⁹³. Os álcoois têm rápida ação microbicida contra bactérias e fungos e pouca atividade contra esporos e oocistos de protozoários^{24,86,94} sendo necessária a remoção mecânica destas formas vegetativas através da higiene das mãos com água e sabão⁸⁸.

Álcoois, quando aplicados na pele, não apresentam ação residual, porém a recolonização bacteriana ocorre lentamente após a utilização de antissépticos alcoólicos. Fatores como tipo de formulação alcoólica, concentração duração e superfície do contato, fricção mecânica, volume do produto e presença de água nas mãos afetam a eficácia da antissepsia^{24,86,94}.

As principais formulações alcoólicas para higienização das mãos contêm propan-2-ol (álcool isopropílico) ou n-propanol, podendo também ser uma combinação de dois destes produtos, ou ainda o etanol (álcool etílico), sendo este último o mais utilizado no Brasil⁸⁸.

2.9.1.2.2 Clorexidina

O gluconado de clorexidina é uma biguanida catiônica que apresenta atividade antimicrobiana sobre um largo espectro de microrganismos Gram-positivos e negativos e vírus envelopados, porém tem efeito reduzido sobre micobactérias, esporos e a maioria dos vírus^{24,86,95}. Em baixas concentrações apresenta atividade bacteriostática, e em altas concentrações, bactericida⁹³. Sua atividade antimicrobiana possivelmente é devido à sua ligação química que, além de apresentar uma rápida atração pela célula bacteriana, ocasiona a ruptura da membrana citoplasmática, resultando em precipitação ou coagulação de proteínas e ácidos nucleicos. Devido à forte afinidade pelos tecidos, a clorexidina apresenta efeito residual de até 6 horas^{24,86,94}.

2.9.1.2.3 Iodóforos

A classe dos iodóforos inclui todos os antissépticos que apresentam em sua composição iodo associado a um polímero denominado polivinilpirrolidona. Tal combinação aumenta a solubilidade da substância e aprovisiona o reservatório de iodo. A quantidade de liberação deste elemento químico é que determina a sua ação antimicrobiana^{24,86,94}.

Sua ação microbicida ocorre a partir da penetração do iodo na parede celular do microrganismo, ligando-se a aminoácidos e ácidos graxos insaturados e formando complexos, o que causa a inativação da célula. O espectro da atividade antimicrobiana dos iodóforos abrange Gram-positivos,

Gram-negativos, *Mycobacterium tuberculosis*, fungos e vírus, com exceção de Enterovírus. Não são eficazes como esporicidas^{24,86,94}.

2.9.1.2.4 Triclosan

É um derivado fenólico que apresenta a fórmula química éter 2,4,4'-triclouro-2'-hidroxofenil⁹³. Sua ação antimicrobiana ocorre pela difusão do produto na parede celular que passa a inibir a síntese de membrana, ácido ribonucléico, lipídeos, e proteínas, o que ocasiona inibição ou morte do microrganismo. Também há indícios de que o triclosan se liga ao sítio ativo da redutase protéica enoil-acil, bloqueando a síntese lipídica⁸⁸.

Apresenta atividade bactericida, sendo maior contra Gram-positivos do que Gram-negativos, atividade razoável contra micobactérias e *Candida sp.* e limitada contra fungos filamentosos. Esse antisséptico é bacteriostático com concentrações inibitórias mínimas de 0,1 a 10 µg/mL, e bactericida em concentrações de 25-500 µg/mL por 10 minutos de exposição⁹⁴.

2.9.2 Técnica de higienização simples das mãos

Tanto a técnica para a higienização simples das mãos quanto a higienização com detergente antisséptico são absolutamente iguais, diferindo apenas no produto utilizado. O período de duração para se realizar o procedimento deve seguir a recomendação do fabricante do produto, contudo o

ideal é que seja despendido de 40 a 60 segundos para realização do procedimento, pois a eficácia da higienização depende da duração e da técnica empregada⁹⁰.

Segue (Figura 3) a técnica de higienização das mãos conforme ilustrada em publicação da ANVISA⁸⁸.

- 1** Abrir a torneira e molhar as mãos, evitando encostar-se a pia.

- 2** Aplicar na palma da mão quantidade suficiente de sabonete líquido para cobrir todas as superfícies das mãos (seguir a quantidade recomendada pelo fabricante).

- 3** Ensaboar as palmas das mãos, friccionando-as entre si.

- 4** Esfregar a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa.

- 5 Entrelaçar os dedos e friccionar os espaços interdigitais.

- 6 Esfregar o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos, com movimento de vai-e-vem e vice-versa

- 7 Esfregar o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda, utilizando-se movimento circular e vice-versa.

- 8 Friccionar as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fechada em concha, fazendo movimento circular e vice-versa.

- 9 Esfregar o punho esquerdo, com o auxílio da palma da mão direita, utilizando movimento circular e vice-versa.

- 10 Enxaguar as mãos, retirando os resíduos de sabonete. Evitar contato direto das mãos ensaboadas com a torneira.

- 11** Secar as mãos com papel toalha descartável, iniciando pelas mãos e seguindo pelos punhos. No caso de torneiras com contato manual para fechamento, sempre utilize papel toalha.

Figura 3. Técnica de higienização simples das mãos.

Fonte: ANVISA/MS. Segurança do paciente – higienização das mãos. Brasília (DF); 2008.

2.9.3 Técnica de fricção antisséptica das mãos com preparações alcoólicas

É realizada com a finalidade de reduzir a carga microbiana das mãos, contudo, não há remoção de sujeira. É preconizado o uso de gel alcoólico à 70% ou solução alcoólica à 70% glicerinada (1 a 3%). A recomendação é que o procedimento dure de 20 a 40 segundos⁸⁸. A Figura 4 ilustra a técnica indicada pela ANVISA.

- 1 Aplicar na palma da mão quantidade suficiente do produto para cobrir todas as superfícies das mãos (seguir a quantidade recomendada pelo fabricante).

- 2 Friccionar as palmas das mãos entre si.

- 3 Friccionar a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa.

- 4 Friccionar a palma das mãos entre si com os dedos entrelaçados.

- 5 Friccionar o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos e vice-versa.

- 6 Friccionar o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda, utilizando-se movimento circular e vice-versa.

- 7 Friccionar as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fazendo um movimento circular e vice-versa.

- 8 Friccionar os punhos com movimentos circulares.

- 9 Friccionar até secar. Não utilizar papel toalha

Figura 4. Técnica de fricção antisséptica das mãos com preparações alcoólicas.

Fonte: ANVISA/MS. Segurança do paciente – higienização das mãos. Brasília (DF); 2008.

2.9.4 Técnica de antisepsia cirúrgica das mãos ou preparo pré-operatório das mãos

Desde o final do século XVIII, quando Lister promoveu a aplicação do ácido carbólico para as mãos dos cirurgiões antes de procedimentos, a limpeza

pré-operatória das mãos e antebraços com um agente antisséptico tem sido uma prática aceita para redução da ocorrência de infecções de sítio cirúrgico⁹⁶.

A técnica de antissepsia cirúrgica das mãos tem como finalidade eliminar a microbiota transitória da pele e reduzir a microbiota residente, produzindo efeito residual na pele do PS. O tempo recomendado para realização do procedimento varia de 2-6 minutos para o *guideline* do CDC americano e de 3-5 minutos para o manual sobre higienização das mãos publicado pela ANVISA^{24,88}.

Embora os *guidelines*^{24,88} recomendem a escovação na realização da prática, atualmente, o emprego de artefatos durante a antissepsia cirúrgica das mãos é uma questão controversa. Um estudo que comparou a redução da carga microbiana da pele após a degermação cirúrgica das mãos com gluconato de clorexidina a 2% sob fricção com escova, fricção com esponja e fricção sem artefato utilizando a técnica “caldo de luva” em 29 voluntários, verificou que a eficácia foi equivalente nos três métodos. Portanto, evidencia-se que o uso de artefatos como escovas ou esponjas possa ser excluído dos procedimentos de degermação das mãos e antebraço da equipe cirúrgica como preparo pré-operatório⁹⁷.

É referendado pelo CDC que estudos têm demonstrado que o uso de formulações contendo 60%-95% somente de álcool ou 50%-95% de álcool combinado com um composto de quartenário de amônio, hexaclorofeno, ou gluconato de clorexidina, induzem uma contagem bacteriana menor na pele imediatamente após a escovação, sendo mais eficaz do que outros agentes antissépticos. Os agentes mais ativos em ordem decrescente de atividade são: gluconato de clorexidina, iodóforos, triclosan e sabão não antimicrobiano²⁴.

Segue a ilustração (Figura 5) da técnica de antissepsia cirúrgica das mãos ou preparo pré-operatório das mãos, conforme indicado pela ANVISA⁸⁸.

- 1 Abrir a torneira, molhar as mãos, antebraços e cotovelos.

- 2 Recolher, com as mãos em concha, o anti-séptico e espalhar nas mãos, antebraço e cotovelo. No caso de escova impregnada com anti-séptico, pressione a parte da esponja contra a pele e espalhe por todas as partes.

- 3 Limpar sob as unhas com as cerdas da escova.

- 4 Friccionar as mãos, observando espaços interdigitais e antebraço por no mínimo 3 a 5 minutos, mantendo as mãos acima dos cotovelos.

- 5 Enxaguar as mãos em água corrente, no sentido das mãos para cotovelos, retirando todo resíduo do produto. Fechar a torneira com o cotovelo, joelho ou pés, se a torneira não possuir foto sensor.

- 6 Enxugar as mãos em toalhas ou compressas estéreis, com movimentos compressivos, iniciando pelas mãos e seguindo pelo antebraço e cotovelo, atentando para utilizar as diferentes dobras da toalha/compressa para regiões distintas.

Figura 5. Técnica de antisepsia cirúrgica das mãos ou preparo pré-operatório das mãos.
Fonte: ANVISA/MS. Segurança do paciente – higienização das mãos. Brasília (DF); 2008.

2.9.5 Situações indicadas para realizar higiene das mãos

De acordo com Sax *et al.*⁹⁸ são cinco os momentos indicados para higienização das mãos, que inclusive acabou sendo referendado pela OMS na Aliança Mundial de Segurança do Paciente, discutida desde 2004. Tal publicação foi citada como uma das mais relevantes da década 2000-2010, de acordo com o *Fifth Decennial International Conference on Healthcare-Associated Infection* (2010). Os cinco momentos estão representados na Figura 6 e são⁹⁸:

- Antes de entrar em contato com o paciente;
- Antes de realizar um procedimento limpo ou asséptico;
- Após exposição ou risco de contato com fluidos corpóreos ou secreções;
- Após o contato com o paciente;
- Após entrar em contato com superfícies ambientais e objetos inanimados que estejam próximos ao paciente.

Figura 6. Os cinco momentos para higiene das mãos.
Adaptado de World Alliance for Patient Safety – Organização Mundial da Saúde.

2.9.6 Barreiras de adesão à higienização das mãos

A falta de conhecimento a respeito de guias que orientem o PS sobre momento adequado para a higiene das mãos somada à inabilidade para reconhecer as oportunidades de realizá-la são fatores que influenciam diretamente na não-adesão à prática. Podem ser citados como outros fatores: dermatites alérgicas originadas pelos produtos destinados à higienização, oferta insuficiente de materiais para higiene, o cuidado tomado como foco principal do trabalho em detrimento da cautela em relação à prevenção de infecções, falta de atualização dos profissionais e de acesso à informação científica. Além desses fatores, estudos apontam também a alta carga de trabalho e o número reduzido de funcionários para suprirem a demanda de tempo destinado ao cuidado^{99,100-101} como situações que reduzem a adesão à prática.

No primeiro estudo realizado sobre a associação entre sobrecarga de trabalho e baixa adesão à higiene das mãos é relatado que tal relação pode ter sido a causa de disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina e de *Enterococcus sp.* resistente a vancomicina¹⁰¹. Resultados de estudos como este reforçam a higiene das mãos como o mais importante método para reduzir o risco de infecções cruzadas veiculadas de paciente para paciente por meio das mãos dos PS¹⁰².

O impacto do uso de luvas na adesão à higiene das mãos deve ser considerado, embora ainda não tenha sido bem definido. Entretanto, é de suma importância ressaltar que a higiene das mãos é indispensável independentemente da retirada ou troca de luvas. O ato de não se retirar as luvas após o contato com pacientes ou entre partes do corpo “contaminadas” e “limpas” de um mesmo paciente deve ser considerado com não-adesão às diretrizes de higiene das mãos⁹⁸.

Pesquisas demonstram que a frequência da lavagem ou antissepsia é influenciada pela facilidade ou dificuldade de acesso às instalações¹⁰³. Unidades que possuem somente uma pia para vários pacientes ou a localização da mesma distante dos leitos podem desestimular a higienização das mãos pelos profissionais que prestam o cuidado. Deve-se verificar se o acesso às pias não está sendo bloqueado por leitos ou equipamentos. Já os dispensadores de formulações alcoólicas, como não necessitam de encanamentos, podem ser instalados ao lado dos leitos e em localizações estratégicas, em que seja frequente a passagem dos cuidadores²⁰. É importante conferir a funcionabilidade dos dispensadores, tanto de sabões quanto de soluções alcoólicas.

3 JUSTIFICATIVA / RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Na literatura científica, estudos apontam que alguns agentes antissépticos para higiene das mãos, já bem difundidos no ambiente hospitalar, ainda apresentam desempenho semelhante ao do sabão comum não-antimicrobiano. Um experimento avaliou a higienização antisséptica das mãos durante um minuto com triclosan à 0,1%, após contaminação intencional, e houve uma redução bacteriana de $2,8 \log_{10}$ ⁹⁴. Tal resultado foi semelhante ao obtido pela higienização simples das mãos com água e sabonete comum (redução de $2,7 \log_{10}$). Outros estudos verificaram que as reduções logarítmicas foram menores com triclosan do que quando comparadas à higienização realizada com clorexidina, PVPI e produtos alcoólicos^{24,86}. Além disso, o triclosan foi classificado, em 1994, pelo FDA americano (*Food and Drug Administration*) como um agente ativo com dados insuficientes para determiná-lo como seguro e efetivo para higiene das mãos^{24,86*}.

O presente estudo tem como proposta avaliar a atividade antimicrobiana de um sabonete líquido que contém como princípio ativo o OTT. Pesquisadores australianos demonstraram que o OTT atua de maneira mais eficaz sobre a microbiota transitória da pele, ou seja, sua ação microbicida se dá principalmente sobre a microbiota responsável pela maioria das IRAS. Além disso, o óleo de *Melaleuca alternifolia* tem sido amplamente empregado em

* Segundo o CDC (2002), numa escala de representação do potencial de atividade antimicrobiana, a clorexidina apresenta um melhor desempenho do que o triclosan. Portanto, considerou-se relevante que ao se avaliar a eficácia de um novo produto, também com finalidade antisséptica, o mesmo fosse comparado justamente com esses dois agentes já disponíveis no mercado e utilizados em estabelecimentos de assistência à saúde. Desta forma, seria possível comparar em termos de reduções logarítmicas da carga microbiana a eficácia de cada um dos agentes antimicrobianos, bem como estabelecer uma classificação para o desempenho do novo produto tomando como parâmetro sabonetes que já estão em uso na prática. Por isso, a proposta inicial deste estudo era comparar também a redução microbiana de sabonete contendo clorexidina à 2,0% aos demais produtos. Entretanto, como não foi possível validar um neutralizante para sabonetes que continham tal princípio ativo, o produto foi excluído dos materiais em teste.

inúmeras formulações tópicas usadas para o tratamento de infecções cutâneas devido às suas propriedades antimicrobianas⁵⁰.

Há estudos sugerindo que o uso repetido de formulações contendo OTT não ocasiona problemas dermatológicos¹⁰⁴ ou danos à integridade da pele, o que poderia ser empregado para incentivar os trabalhadores da área da saúde a melhorar a adesão à higienização das mãos.

O uso de OE potencialmente antissépticos, como o OTT, pode, portanto, representar um instrumento eficaz no auxílio à prática de higienização das mãos, tanto em termos de atuação antimicrobiana quanto ser uma alternativa natural aos antissépticos sintéticos presentes no mercado, melhorando a adesão dos PS. Assim, considera-se relevante avaliar a eficácia antimicrobiana de um produto já disponível para uso e que contém um óleo essencial como princípio ativo natural.

Embora não seja o objetivo deste estudo, o uso de OTT em formulações para higienização das mãos, além do efeito antimicrobiano ocasionado pelo princípio ativo, poderá produzir efeito aromaterapêutico nas pessoas que utilizarem o produto. Neste caso, o uso do OTT provocaria efeitos imunoestimulante e melhora no desempenho do sistema respiratório^{6,7,27}, possibilidade a ser investigada em estudos futuros.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a eficácia da higiene das mãos realizada com sabonete líquido contendo óleo essencial de Tea Tree à 0,3% e sabonete líquido com triclosan na concentração de 0,5%, seguindo a metodologia europeia EN 1499⁶⁰.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a eficácia antimicrobiana do sabonete líquido contendo óleo essencial de Tea Tree à 0,3% e sabonete líquido com triclosan na concentração de 0,5% na redução da carga microbiana desafio presente nas mãos contaminadas artificialmente contaminadas.

Comparar a eficácia antimicrobiana das duas formulações de sabonetes.

Comparar a eficácia antimicrobiana das duas higienizações das mãos de referência propostas pela metodologia que utilizam um sabão de referência (*soft soap*) seguido ou não pelo uso de propan-2-ol à 60%.

5 HIPÓTESES

5.1 HIPÓTESE NULA

A formulação do sabonete líquido contendo óleo essencial de Tea Tree à 0,3% apresentará pior redução da carga microbiana em relação ao sabonete com triclosan à 0,5%.

5.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA

A formulação do sabonete líquido contendo óleo essencial de Tea Tree à 0,3% apresentará redução da carga microbiana igual ou superior ao sabonete com triclosan à 0,5%.

6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

6.1 INDEPENDENTE

Foram consideradas variáveis independentes deste estudo as duas formulações de sabonetes líquidos para higiene das mãos:

Produto teste 1: Sabonete líquido Doctornatu® da Higinatu – com óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) à 0,3%.

Produto teste 2: Sabonete Rioderme® da Rioquímica – com triclosan à 0,5%.

6.2 DEPENDENTE

Foi considerada como variável dependente o nível de redução da carga microbiana desafio inoculada no tecido epitelial das mãos após a utilização dos produtos em teste.

7 MATERIAL E MÉTODO

7.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo laboratorial, experimental, comparativo, controlado, do tipo *cross-over* e duplo-cego (sujeito e estatístico), com abordagem quantitativa.

7.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Ensaaios Microbiológicos (LEM) do Departamento de Enfermagem Médico-Cirúrgica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. Tal laboratório tem exercido papel de destaque na formação de enfermeiros-pesquisadores, principalmente no que diz respeito a pesquisas experimentais. O LEM tem desenvolvido pesquisas na área de processamento de materiais de assistência à saúde, avaliando aspectos de esterilidade e de recuperação de carga microbiana em instrumentais. Além disso, esse espaço tem sido cenário de diversos estudos com resultados já divulgados em periódicos de repercussão internacional.

7.3 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

O estudo atendeu à Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, ao envolver seres humanos na pesquisa. Foi entregue um impresso, em duas vias, com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1), sendo que uma permaneceu com o sujeito de pesquisa e a outra com o pesquisador. Quando consentida, a autorização de cada um dos voluntários para participar da pesquisa foi obtida antes de se dar início à coleta de dados. Foram garantidos anonimato e confidencialidade dos dados.

A pesquisa somente foi iniciada após ter o aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo e da Comissão de Pesquisa da mesma Instituição sob o Processo n° 1069/2011CEP-EEUSP - SISNEP CAAE - 0082.0.196.000-11 (Anexo 2).

7.4 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

Para realização do ensaio proposto foi utilizada uma metodologia européia⁶⁰ (EN 1499, 1997) proposta pelo Comitê Europeu de Padronização – *European Standard* – e já validada internacionalmente. Esta mesma metodologia, por estar em vigor desde 1997, possui uma versão *draft*¹⁰⁵ (EN 1499, 2001) proposta em abril de 2011 e que ainda se encontra em avaliação. O presente trabalho tomou como referencial teórico a metodologia atualmente em vigência⁶⁰, porém algumas considerações que foram feitas na versão

*draft*¹⁰⁵ ponderadas como relevantes pela autora foram acrescentadas à metodologia e serão descritas ao longo do método.

Na padronização da metodologia EN 1499 é indicada a contaminação artificial das mãos de 12 a 15 voluntários sadios com o microrganismo teste, no caso, *Escherichia coli* K12⁶⁰. Realiza-se a contagem do número de microrganismos antes (pré-valores) e após (pós-valores) a higiene das mãos com os produtos em avaliação para se verificar a eficácia dos mesmos. A relação entre pré e pós-valores representa a atividade antimicrobiana de cada produto testado. Para compensar possíveis influências externas é recomendada a comparação da redução da carga microbiana pela higiene das mãos com o produto sob avaliação com uma lavagem de mãos feita com um sabão de referência, ambas feitas pelo mesmo voluntário, no mesmo dia e sob condições ambientais semelhantes.

Conforme determinado pela metodologia, antes do experimento com os sujeitos, um neutralizante adequado para cada tipo dos produtos teste deve ser manipulado e validado com a finalidade de assegurar que a atividade bactericida e/ou bacteriostática dos princípios ativos antissépticos seja neutralizada ou suprimida, não interferindo durante o período de incubação dos microrganismos viáveis coletados após a realização da higienização.

7.5 AMOSTRA

A Amostra foi constituída por 15 voluntários que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1). Os sujeitos constituíram quatro grupos, sendo três com quatro

sujeitos e um com três participantes, delineando um quadrado latino conforme indicado pela metodologia *European Standard* EN 1499⁶⁰.

Os critérios de inclusão foram: ter entre 18 a 55 anos de idade (uma vez que há alterações na constituição da microbiota da pele após os 60 anos); não ter tido contato com anti-séptico de efeito residual nas últimas 48 horas; não apresentar sinais aparentes de ressecamento das mãos ou lesões; estar com as unhas limpas, curtas e sem esmalte no momento da coleta; dispor-se a assinar o TCLE; receber o treinamento imediatamente antes à coleta sobre a técnica padronizada para a higienização das mãos e ser capaz de reproduzir o procedimento; não utilizar artefatos nas mãos ou punhos durante a coleta de dados. Constitui-se critério de exclusão ter conhecimento prévio sobre alergia a alguma das substâncias a serem utilizadas no estudo, estar grávida ou recusar-se a permanecer no estudo.

7.6 MATERIAIS

Foram utilizados no estudo os materiais descritos a seguir.

7.6.1 Microrganismo teste

O microrganismo teste recomendado pela EN 1499 é a *Escherichia coli* K12 NCTC 10538⁶⁰. Na versão *draft* de 2011 são indicados como microrganismo teste as cepas de *E. coli* K12 NCTC 10538, CIP 54.117 ou

NCIMB 10083¹⁰⁵. Contudo, ambas referem que estirpes correspondentes fornecidas por outras coleções de culturas podem ser utilizadas, desde que sejam capazes de demonstrar os mesmos resultados.

Como houve dificuldade para conseguir tais microrganismos recomendados, optou-se pela cepa de *E.coli* K12 ATCC 14948, semelhante aos números de coleções NCTC 10538 e NCIMB 10083, justamente para atender às questões de segurança à saúde e considerações levantadas por Comitês de Ética. Esta bactéria provém de uma cepa de origem da microbiota natural da face humana e é internacionalmente reconhecida como não-patogênica.

A *E. coli* K12 utilizada foi adquirida na forma liofilizada e reativada conforme recomendações do fornecedor (Anexo 3).

Figura 7. Ativação de cepa de *Escherichia coli* K12 conforme instruções do fornecedor. São Paulo, 2012.

7.6.2 Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura indicados pela metodologia EN 1499⁶⁰, já disponíveis comercialmente, com a finalidade de assegurar a reprodutibilidade. As instruções do fabricante para o preparo dos meios foram seguidas rigorosamente.

- **Ágar tríptico de soja (Tryptone soya agar – TSA - Difco[®]):** para manutenção e crescimento do microrganismo durante o processo de validação dos neutralizantes.

- **Caldo tríptico de soja (Tryptone soya broth – TSB - Difco[®]):** para o preparo do fluido de contaminação, obtenção dos fluidos de amostragem e diluições da cepa durante o procedimento de validação dos neutralizantes. Também aplicado como neutralizante para o sabonete contendo o óleo essencial de Tea Tree, para o *soft soap* e para o propan-2-ol (Difco[®]).

- **Agar tríptico de soja seletivo (Tryptone Soya Selective Agar – TSSA - Difco[®]):** trata-se do TSA enriquecido com 0,5 g de desoxicolato de sódio a cada 1000 mL do meio de cultura. Utilizado como meio para culturas quantitativas dos fluidos de amostragem e suas diluições com a finalidade de evitar o crescimento de *Staphylococcus sp.* presente na pele dos sujeitos de pesquisa, conforme sugestão da metodologia EN 1499 versão *draft*¹⁰⁵. Sua eficácia foi testada microbiologicamente inoculando-se 1 mL de suspensão contendo 10⁸ de *S. aureus* ATCC 6538 em placas com TSA e TSSA, em duplicata (Figura 8).

Figura 8. Crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em placa de TSA (à esquerda) e TSSA (à direita). São Paulo, 2012.

- **Difco® D/E Neutralizing Broth:** trata-se de um neutralizante de amplo espectro, empregado largamente pela indústria de cosméticos para neutralizar diversos tipos de conservantes de produtos. Utilizado no presente estudo como neutralizante para o sabonete contendo triclosan.

Todos os meios de cultura descritos anteriormente apresentaram o pH de 7,2 à 20°C , conforme recomendado pela metodologia EN 1499⁶⁰.

7.6.3 Sabão de referência (*soft soap*)

Formulado conforme indicação da metodologia EN 1499 versão *draft*¹⁰⁵, no LEM, com auxílio técnico profissional em química, sendo sua composição:

Óleo de linhaça	50,0 partes por peso
Hidróxido de potássio	9.5 partes por peso
Etanol 95%	7,0 partes por peso
Água quente destilada ($75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)	o quanto for necessário

Após a manipulação do produto, o mesmo foi armazenado em frascos apropriados e autoclavado. O *soft soap* foi utilizado como sabão para dois procedimentos referência de higienização das mãos, seguido ou não do uso de propan-2-ol.

7.6.4 Água

Utilizou-se para preparo dos meios de cultura e neutralizantes apenas água destilada, não desmineralizada e estéril conforme recomendado pela EN 1499⁶⁰.

Para enxágüe das mãos dos sujeitos de pesquisa, a metodologia recomenda que seja utilizada água de torneira com garantia de que a mesma

seja própria para consumo humano⁶⁰. No caso deste teste optou-se pelo uso de água mineral em garrafas de uso único, disponíveis comercialmente.

7.6.5 Álcool de referência (propan-2-ol)

Recomendado pela metodologia EN 1499 versão *draft*¹⁰⁵, o propan-2-ol à 60% pós higienização das mãos com *soft soap* para o procedimento de referência.

7.6.6 Produtos utilizados para teste

Os sabonetes líquidos propostos a serem avaliados sob a perspectiva de desempenho como agentes antimicrobianos para higiene das mãos foram:

- Sabonete líquido Doctornatu® - com óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) à 0,3%, da empresa Higinatu;
- Sabonete líquido Rioderm® com triclosan à 0,5%, da empresa Rioquímica;

Os dois produtos são registrados na Agência de Vigilância Sanitária e estão disponíveis no mercado consumidor e as amostras de cada um deles, sendo todas do mesmo lote para cada produto teste, foram obtidas diretamente com os representantes comerciais.

7.6.7 Cronômetro

Instrumento utilizado para determinar com precisão a duração dos procedimentos.

7.6.8 Neutralizantes

Os neutralizantes foram escolhidos especificamente para cada um dos três princípios ativos dos produtos em teste, controlados e validados. O processo de validação dos neutralizantes encontra-se descrito no item 7.7.2.

7.7 PROCEDIMENTOS PARA A COLETA DE DADOS

7.7.1 Preparo do fluido de contaminação

Foram preparadas duas suspensões com o microrganismo para diferentes finalidades: o fluido para realizar os controles e validação dos neutralizantes denominado “suspensão de validação” e o fluido para contaminar as mãos dos voluntários, a “suspensão do ensaio”.

A cepa de *Escherichia coli* K12 foi inoculada em dois tubos de ensaio contendo o volume de 5 mL de TSB os quais foram incubados à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por um período de 18 a 24 horas (Figura 9). Após esse período, o conteúdo de cada tubo foi vertido em dois frascos contendo 1 L de TSB os quais foram incubados por $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por mais 18 a 24 horas, resultando na suspensão do ensaio com 5.10^8 UFC/mL (de acordo com a indicação da metodologia: 2.10^8 a 2.10^9 UFC/mL) ⁶⁰.

A suspensão de validação foi ajustada para 5.10^4 UFC/mL, conforme determinação da versão *draft* da metodologia, a qual preconiza que tal suspensão deve conter 3.10^4 a $1,6.10^5$ UFC/mL ¹⁰⁵.

Para contagem do número de células e ajuste da suspensão foram preparadas diluições do fluido de contaminação de 10^{-1} a 10^{-9} utilizando TSB. Uma amostra de cada diluição com o volume de 1 mL, em duplicata, foi inoculada em meio TSA em placa utilizando técnica *spread plate* e realizada contagem quantitativa após incubação por 20 a 24 horas à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Figura 9. Preparo do fluido de contaminação. São Paulo, 2012.

7.7.2 Metodologia para validação dos neutralizantes

Os neutralizantes antes de serem utilizados no ensaio foram validados seguindo o procedimento descrito na versão *draft* da metodologia EN 1499¹⁰⁵, visto que a metodologia oficial de 1997⁶⁰ apenas cita a necessidade de validação, mas não descreve o procedimento.

Para que o neutralizante pudesse ser empregado no estudo ele deveria ser validado em dois quesitos: a) Não apresentar efeito tóxico à cepa de *Escherichia coli* K12 em questão; b) Apresentar ação neutralizante sobre a formulação dos produtos em teste.

7.7.2.1 Validação da ausência de toxicidade do neutralizante

O procedimento para validar a ausência de toxicidade do neutralizante, segundo a versão *draft* da metodologia EN 1499¹⁰⁵, encontra-se descrito no parágrafo a seguir.

“Devem ser pipetados 9 mL do neutralizante a ser testado e colocados em um tubo de ensaio. Adiciona-se 1 mL da suspensão de validação contendo de $3,0 \cdot 10^4$ a $1,6 \cdot 10^5$ UFC/mL. Após agitação, transfere-se a mistura para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL do neutralizante para se obter uma diluição de 10^{-1} e repete-se novamente este procedimento em um outro tubo, obtendo-se uma diluição de 10^{-2} . Os tubos devem ser mantidos em banho-maria, à temperatura de 20 ± 1 °C durante $10 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$. Ao término desse período o tubo é agitado e uma amostra de 1 mL dessa diluição é inoculada em placa com TSA, por *pour plate* ou *spread plate*, em duplicata.”

7.7.2.2 Validação do método de neutralização

O procedimento para validar o método de neutralização do neutralizante, segundo a versão *draft* da metodologia EN 1499¹⁰⁵, encontra-se descrito no parágrafo a seguir.

“Dois mL de TSB devem ser pipetados e colocados dentro de um tubo de ensaio. Oito mL do produto teste para higiene das mãos devem ser adicionados ao tubo. O frasco é agitado e colocado em banho-maria à 20 ± 1 °C. Transfere-se 1 mL dessa mistura para outro tubo contendo 8 mL do neutralizante. Agita-se

o frasco que, em seguida, deve ser colocado em banho-maria à $20 \pm 1^\circ \text{C}$ por $10 \pm 1 \text{ s}$ (período de neutralização). Em seguida, adiciona-se 1 mL da suspensão de validação e agita-se. O tubo deve ser levado à banho-maria com uma temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 30 minutos $\pm 1 \text{ min}$, sendo que um pouco antes do término desse período, o frasco deve ser agitado até completar o tempo estipulado. Por fim, retira-se uma amostra de 1 mL da mistura que deve ser inoculada na placa com TSA utilizando-se técnica *pour plate* ou *spread plate*, em duplicata.”

7.7.3 Procedimento para validação dos neutralizantes

Para a formulação dos neutralizantes, foram observadas as sugestões descritas na metodologia europeia. Para o sabonete que continha triclosan, havia exemplos tanto na versão oficial da metodologia⁶⁰ quanto na versão *draft*¹⁰⁵. No caso do propan-2-ol, apenas a versão *draft*¹⁰⁵ apresentava uma composição de neutralizante. Já para o sabonete que continha o OTT optou-se por validar o TSB como neutralizante, visto que a própria metodologia sugere que este meio pode atuar como neutralizante para agentes antimicrobianos, desde que seja realizada a validação para tal finalidade⁶⁰. O Quadro 1 demonstra quais as propostas de neutralizantes segundo a metodologia adotada.

Quadro 1. Propostas de formulações de neutralizantes, segundo metodologia oficial EN 1499⁶⁰ e versão *draft*¹⁰⁵, para agentes antimicrobianos. São Paulo, 2012.

Agente antimicrobiano	Metodologia oficial⁶⁰	Versão <i>draft</i>¹⁰⁵
Álcool	TSB	Polissorbato 80 – 30g/L + Saponina – 30g/L + Lecitina – 3g/L ou TSB
Triclosan	Polissorbato 80 – 30 mL/L + Lecitina de ovo – 3g/L + Histidina – 1g/L + Tiosulfato de sódio – 5g/L ou TSB	Polissorbato 80 – 30g/L + Lecitina – 3g/L ou TSB
OTT	TSB	TSB

Optou-se testar como neutralizantes para os agentes antimicrobianos dos produtos em teste as opções sugeridas pela versão *draft*¹⁰⁵ por três motivos. Primeiro porque os neutralizantes descritos foram propostos pelo mesmo método que recomendava o procedimento de validação. Segundo, porque as formulações apresentadas foram avaliadas recentemente e, por isso,

estão sendo indicadas como substitutas dos exemplos expostos pela versão oficial⁶⁰. Por fim, porque a lecitina de ovo presente nas formulações da metodologia em vigor encontra-se em desuso na indústria cosmética, principalmente como inativante de conservantes (o que se aplica ao caso dos neutralizantes), além de possuir um alto valor de custo. Os resultados obtidos para a validação dos neutralizantes propostos pela versão *draft*¹⁰⁵ encontram-se explicitados no Quadro 2.

Quadro 2. Avaliação da toxicidade e do método de neutralização dos neutralizantes propostos pela versão *draft*¹⁰⁵ segundo a mesma metodologia. São Paulo, 2012.

Agente antimicrobiano	Neutralizante proposto pela versão <i>draft</i>¹⁰⁵	Avaliação da toxicidade*	Avaliação do método de neutralização**
Propan-2-ol	Polissorbato 80 (30g/L) + Saponina (30g/L) + Lecitina (3g/L)	Ausente	Positivo
	TSB	Ausente	Positivo
Triclosan	Polissorbato 80 (30g/L) + Lecitina (3g/L)	Ausente	Negativo
	TSB	Ausente	Negativo
OTT	TSB	Ausente	Positivo

* Para a avaliação de toxicidade, conforme procedimento descrito no item 7.7.2.1, considerou-se como ausência de citotoxicidade do agente neutralizante sobre a cepa de *E.coli* K12 ("ausente") a recuperação de pelo menos 60% do inóculo, segundo a recomendação. Obteve-

se como resultado a recuperação de 72% dos microrganismos para o neutralizante contendo saponina, 82% para o neutralizante com polissorbato e lecitina e 100% para o TSB.

** Para a avaliação do método de neutralização, conforme procedimento descrito no item 7.7.2.2, considerou-se como “positivo” os resultados em que houve neutralização do agente antimicrobiano, observando-se, portanto, o crescimento incontável de colônias da cepa de *E.coli* K12 nas placas com TSA. Como “negativo” considerou-se o resultado em que não houve crescimento do microrganismo teste no meio de cultura.

Como não se obteve um resultado “positivo” para a validação do método de neutralização dos neutralizantes para o triclosan, foi realizado um novo teste utilizando uma formulação inativante disponível no mercado, o Difco® D/E Neutralizing Broth (D/E).

A composição do D/E, segundo o fabricante¹⁰⁶, é:

- Digerido pancreático de caseína – 5,00 g/L
- Extrato de levedura – 2,50 g/L
- Dextrose – 10,00 g/L
- Tioglicolato de sódio – 1,00 g/L
- Tiosulfato de sódio – 6,00 g/L
- Bissulfito de sódio – 2,50 g /L
- Polissorbato 80 – 5,00 g/L
- Lecitina – 7,00 g/L
- Púrpura de bromocresol – 0,02 g/L

Tal meio foi preparado de duas formas: a) conforme instrução do fabricante; b) conforme instrução do fabricante e adicionando-se 1 g/L de histidina com a finalidade de deixar a formulação próxima do neutralizante para

o triclosan sugerido pela metodologia oficial⁶⁰. Para as duas preparações foram feitos os testes de toxicidade e de validação de método de neutralização cujos resultados estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3. Avaliação da toxicidade e do método de neutralização do D/E associado ou não à histidina, segundo metodologia da versão *draft*¹⁰⁵. São Paulo, 2012.

Agente antimicrobiano	Neutralizante	Avaliação da toxicidade*	Avaliação do método de neutralização**
Triclosan	D/E	Presente	Negativo
	D/E + histidina (1 g/L)	Ausente	Negativo

* Para a avaliação de toxicidade, conforme procedimento descrito no item 7.7.2.1, considerou-se como ausência de citotoxicidade do agente neutralizante sobre a cepa de *E.coli* K12 (“ausente”) a recuperação de pelo menos 60% do inóculo, segundo a recomendação. Para o D/E houve recuperação de aproximadamente 95% dos microrganismos.

** Para a avaliação do método de neutralização, conforme procedimento descrito no item 7.7.2.2, considerou-se como “positivo” os resultados em que houve neutralização do agente antimicrobiano, observando-se, portanto, o crescimento incontável de colônias da cepa de *E.coli* K12 nas placas com TSA. Como “negativo” considerou-se o resultado em que não houve crescimento do microrganismo teste no meio de cultura.

Como demonstra o Quadro 3, o D/E associado à histidina produziu um efeito tóxico sobre a cepa de *E. coli* K12, fato que desencorajou uma tentativa de validação da formulação proposta na metodologia oficial⁶⁰ como neutralizante para triclosan.

Já o D/E não teve efeito tóxico sobre a célula bacteriana, porém não apresentou neutralização do agente antimicrobiano.

Diante desses resultados optou-se por associar a diluição, procedimento reconhecido como um dos métodos possíveis para neutralização das propriedades antimicrobianas¹⁰⁷, ao método proposto pela versão *draft*¹⁰⁵.

Assim, acrescentou-se uma etapa intermediária de diluição no procedimento descrito no item 7.7.2.2. Após a transferência de 1 mL da mistura para o tubo contendo 8 mL de neutralizante, no caso o D/E, o frasco foi agitado e retirada uma nova alíquota de 1 mL dessa mistura, que foi transferida para um outro tubo contendo 8 mL de neutralizante. Somente então, foi concluída a seqüência descrita no procedimento de validação do método de neutralização. Ao final do teste, o D/E neutralizou a ação antimicrobiana do triclosan, sendo validado como neutralizante.

O Quadro 4 demonstra quais foram os neutralizantes utilizados nesse ensaio para cada um dos agentes antimicrobianos presentes nos produtos em teste. A opção pelo TSB como neutralizante para o propan-2-ol deve-se ao fato de que tal meio demonstrou melhor recuperação do microrganismo no teste de avaliação da toxicidade em comparação à formulação que contém saponina.

Quadro 4. Neutralizantes utilizados no ensaio para cada um dos agentes antimicrobianos presentes nos produtos em teste. São Paulo, 2012.

Agente antimicrobiano	Neutralizante utilizado no ensaio	Avaliação da toxicidade	Avaliação do método de neutralização
Propan-2-ol	TSB	Ausente	Positivo
Triclosan	D/E	Ausente	Positivo
OTT	TSB	Ausente	Positivo

Embora não estivesse descrito na metodologia oficial ou versão *draft*¹⁰⁵ a necessidade de validar um neutralizante para o *soft soap*, foi realizado o teste de toxicidade para o *soft soap*, que foi “ausente”, e a validação de neutralização com TSB, que foi “positiva”.

7.7.4 Desenho do estudo

O estudo somente foi iniciado após a aprovação da pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo sob o Processo nº 1069/2011CEP-EEUSP - SISNEP CAAE - 0082.0.196.000-11 (Anexo 2). Depois de conhecerem o objetivo e método, os participantes assinaram o TCLE em duas vias, sendo que uma delas permaneceu com o sujeito e a outra com o pesquisador.

Os 15 participantes foram randomizados em 4 grupos, sendo cada um denominado pelos algarismos romanos I, II, III e IV que tiveram a seqüência de uso dos produtos designadas por quadrado latino (vide o Fluxograma do Estudo - Figura 10).

É importante ressaltar que, por se tratar de um quadrado latino conforme determinação da metodologia⁶⁰, todos os voluntários realizaram a higiene das mãos com os quatro produtos em avaliação, variando apenas a sequência de uso dos mesmos, o que determina ser um estudo do tipo cruzado (*cross-over*).

Produtos:

SS: Soft soap

SS+p: Soft soap seguido de propan-2-ol 60%

TT: Sabonete com óleo essencia de Tea Tree à 0,3%

Tri: Sabonete com triclosan à 0,5%

Mãos D/E: mãos direita e esquerda

= 240

Figura 10. Fluxograma do estudo. São Paulo, 2012

7.7.5 Controle microbiológico dos produtos utilizados no estudo

Para cada um dos produtos utilizados na higienização das mãos foi realizado o controle microbiológico de acordo com a Resolução 481/99 da ANVISA¹⁰⁸. Os métodos para análise estavam em conformidade com as normas ABNT NBR ISO 21149 (Cosméticos - Microbiologia - Contagem e detecção de bactérias mesófilas aeróbicas), ABNT NBR ISO 21150 (Cosméticos - Microbiologia - Detecção de *Escherichia coli*), ABNT NBR ISO 22717 (Cosméticos - Microbiologia - Detecção de *Pseudomonas aeruginosa*) e a Norma ABNT NBR 22718 (Cosméticos - Microbiologia - Detecção de *Staphylococcus aureus*) e estão descritos na Farmacopéia Brasileira¹⁰⁹.

Os resultados obtidos evidenciaram que todos os produtos em teste estavam dentro dos padrões exigidos pela normatização e, portanto, nenhum dos produtos apresentava contaminação prévia ao início da coleta de dados.

7.7.6 Procedimento para a coleta dos valores microbianos e contaminação das mãos com a suspensão do ensaio

Todos os participantes foram treinados para executar a técnica da higienização das mãos simples imediatamente antes de iniciar a seqüência do procedimento e executaram todas os procedimentos sob supervisão de um monitor. Para facilitar o processo e o cegamento dos sujeitos, os produtos referência e os produtos em teste foram disponibilizados em seringas com o

volume específico para cada um deles já aspirado e identificados por etiquetas coloridas (Figuras 11 e 12).

Por determinação da metodologia⁶⁰ sempre antes da aplicação da suspensão do ensaio, independente do grupo que o sujeito estivesse inserido ou do produto que seria utilizado, as mãos foram preparadas por uma higienização simples (Figura 13) com duração de 60 segundos, utilizando 5 mL do *soft soap*.

Depois de enxaguadas com a água mineral por 15 segundos (Figura 14) e secadas com papel toalha, as duas mãos de cada voluntário foram imersas durante 5 segundos até a altura dos metacarpos, com os dedos separados, em bacia de aço-inox esterilizada contendo a suspensão do ensaio (Figura 15). Escoado o excesso da suspensão do ensaio para dentro da bacia, aguardou-se a secagem ao ar ambiente durante 3 minutos, em posição horizontal, fazendo movimentos de rotação com os punhos para evitar a formação de gotículas (Figura 16). É imprescindível que a mesma suspensão do ensaio seja utilizada por todos os sujeitos e que isso ocorra num período máximo de 3 horas após a exposição das mãos do primeiro voluntário⁶⁰.

Nesse momento obteve-se o valor inicial de contagem bacteriana (pré-valores) de cada um dos sujeitos a partir do esfregaço das pontas dos dedos de cada mão no fundo de uma placa de Petri contendo 10 mL de TSB como fluido de amostragem, durante 1 minuto (Figura 17).

Em seguida, foi realizado o procedimento de higienização das mãos por meio de lavagem de referência ou com o procedimento com produto em teste (Figura 18), de acordo com o grupo no qual o sujeito estava inserido conforme randomização, e coletados os pós-valores (Figura 19).

Figura 11. Dispensação de 5 mL de *soft soap* em seringas identificadas por etiquetas amarelas. São Paulo, 2012.

Figura 12. Dispensação de 3 mL de propan-2-ol em seringas identificadas por etiquetas prateadas e dispensação de 1,5 mL de sabonete contendo triclosan (etiqueta preta) e 1,5 mL de sabonete contendo Tea Tree (etiqueta verde). São Paulo, 2012.

Figura 13. Sujeito realizando a técnica de higienização simples das mãos com *soft soap* sob supervisão do monitor e com o auxílio de figura contendo orientações sobre procedimento. São Paulo, 2012.

Figura 14. Sujeito enxaguando as mãos em água mineral do sentido distal para proximal, durante o período de 15 segundos. São Paulo, 2012.

Figura 15. Sujeito contaminando as mãos com a suspensão do ensaio. São Paulo, 2012.

Figura 16. Sujeitos aguardando a secagem das mãos na posição horizontal após a contaminação, com movimentos de rotação dos punhos. São Paulo, 2012.

Figura 17. Sujeito esfregando as pontas dos dedos em fundo de placa de Petri contendo TSB, durante 60 segundos, para coleta dos pré-valores. São Paulo, 2012.

Figura 18. Sujeito realizando a técnica de higienização simples das mãos com produto teste sob supervisão do monitor e com o auxílio de figura contendo orientações sobre procedimento, São Paulo, 2012.

Figura 19. Sujeito esfregando as pontas dos dedos em fundo de placa de Petri contendo D/E (neutralizante para o sabonete contendo triclosan), durante 60 segundos, para coleta dos pós-
valores. São Paulo, 2012.

7.7.7 Procedimento referência de higienização das mãos

Adotaram-se dois procedimentos como sendo de referência: o uso 5 mL do *soft soap*, conforme a versão oficial, e a aplicação de 5 mL do *soft soap* seguido pela fricção com 3 mL, por duas vezes, de propan-2-ol, conforme descrito na versão *draft* da metodologia¹⁰⁵. A avaliação dos dois procedimentos de referência será realizada com a finalidade de comparar os resultados.

As mãos previamente umedecidas receberam 5 mL do *soft soap* e foram lavadas durante 60 segundos, seguindo os passos do procedimento indicado pela metodologia EN 1499⁶⁰ (Anexo 4), para assegurar a total cobertura das mãos.

Após enxágüe e secagem, foram distribuídos e friccionados 3 mL do propan-2-ol durante 30 segundos por toda a superfície das mãos e punhos, seguindo os passos do procedimento padrão indicado pela metodologia EN 1499⁶⁰ (Anexo 4). Esse procedimento foi repetido com mais 3 mL do propan-2-ol, totalizando 60 segundos. Após 60 segundos as mãos foram enxaguadas com água mineral corrente, por meio de uma torneira plástica, durante 15 segundos, com os dedos na posição vertical e de distal para proximal. Punhos e antebraços foram secados com papel toalha com auxílio de um ajudante e, em seguida, coletados os pós-valores.

7.7.8 Procedimento de higienização com produto em teste

O procedimento realizado com os produtos em teste seguiu a mesma sequência e passos do procedimento de higienização das mãos descritos na higienização de referência, porém diferiu na quantidade dos produtos ofertados.

No caso do teste realizado, não houve variação do volume ou tempo de contato para cada tipo do produto, sendo sempre 5 mL para o *soft soap* por 60 segundos e 1,5 mL para os sabonetes contendo triclosan ou Tea Tree, por 60 segundos cada. O tempo de aplicação do *soft soap* e dos sabonetes contendo Tea Tree e triclosan, bem como o período de enxágüe do sentido distal para o proximal, seguiram a indicação da metodologia, sendo 60 e 15 segundos respectivamente, resultando em procedimento com duração de 75 segundos.

Contudo, o volume dos sabonetes contendo óleo essencial de Tea Tree e triclosan a ser utilizado durante o procedimento não pôde ser seguido conforme indicação do fabricante, como sugere a metodologia. Nenhum dos dois sabonetes explicitava na embalagem qual quantidade que deveria ser

utilizada para higienizar as mãos. Optou-se pelo volume de 1,5 mL visto que é a quantidade aproximada liberada pelos dispensadores de sabão em uso nos hospitais. Além disso, volumes de 1 a 5 mL desses dois sabonetes foram testados previamente por 2 voluntários, independentemente, em um momento anterior a coleta e ambos perceberam que esta quantidade apresentava boa cobertura das mãos durante a fricção do produto por 60 segundos, além de ser eliminada com mais facilidade durante o enxágue de 15 segundos determinado pela metodologia.

Imediatamente após a técnica foram obtidos os pós-valores (vide item 7.7.10).

7.7.9 Obtenção dos pré-valores

Os pré-valores são os valores obtidos a partir dos microrganismos-teste presentes nas pontas dos dedos dos sujeitos imediatamente após a secagem da suspensão do ensaio.

Foram esfregadas, simultaneamente, as pontas dos dedos, incluindo o polegar, no fundo de uma placa de Petri contendo 10 mL de TSB como fluido de amostragem durante 60 segundos, sendo utilizada uma placa para cada uma das mãos. Diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram obtidas de cada fluido de amostragem. De cada uma das diluições, o inóculo de 0,1 mL foi espalhado com o auxílio de uma alça de drigalski estéril na superfícies de placas secas contendo TSSA para se obter os pré-valores. Conforme recomendação da metodologia, o inóculo não deve exceder 30 minutos entre a coleta e a semeadura⁶⁰.

As placas foram incubadas por 18 a 24 h à 37°C e, em seguida, realizada a leitura para se determinar o número de UFC e reincubadas por mais 24 horas para detecção do crescimento de novas colônias.

7.7.10 Obtenção dos pós-valores

Os pós-valores são aqueles obtidos logo após ter sido feito o uso do produto de referência ou teste seguido pelo enxágüe.

Cada sujeito esfregou a ponta dos dedos simultaneamente, incluindo o polegar, por 60 segundos, no fundo da placa de Petri contendo 10 mL do neutralizante para o respectivo produto (vide Quadro 4), sendo uma para cada mão.

Diluições de 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} foram obtidas de cada fluido de amostragem a partir dos volumes de 1 mL e 0,1 mL do fluido de amostragem. O inóculo de cada uma das diluições foi espalhado com o auxílio de uma alça de drigalski na superfícies de placas secas contendo TSSA para se obter os pós-valores. Conforme recomendação da metodologia, o inóculo não deve exceder 30 minutos entre a coleta e a semeadura⁶⁰.

As placas foram incubadas por 18 a 24 h à 37°C e, em seguida, realizada a leitura para se determinar o número de UFC e reincubadas por mais 24 horas para detecção do crescimento de novas colônias.

7.7.11 Procedimento para obtenção dos dados e cálculos

Conforme indicação da metodologia, para cada uma das etapas de diluição dos fluidos de amostragem foi calculada a redução logarítmica utilizando a média ponderada das UFC/mL do pré-valor ou pós-valor, onde:

$$Z = \frac{\sum C}{v_1 d_1 + v_2 d_2}$$

Z = é a média ponderada das UFC/mL do fluido de amostragem do pré-valor ou pós-valor;

$\sum C$ = é a somatória das UFCs contadas nas placas utilizadas para o cálculo;

v_1 = é o volume do inóculo em mL, retirado do fluido de amostragem na menor diluição, que foi aplicado na placa de TSSA com a técnica *spread plate*;

v_2 = é o volume do inóculo em mL, retirado do fluido de amostragem na maior diluição, que foi aplicado na placa de TSSA com a técnica *spread plate*;

d_1 = é o fator de diluição correspondente à menor diluição do fluido de amostragem;

d_2 = é o fator de diluição correspondente à maior diluição do fluido de amostragem;

Para obtenção dos dados foi realizada a contagem média entre as colônias das mãos direita e esquerda, sendo que o fator de redução logarítmica é determinado pelo cálculo da diferença entre os valores iniciais e finais.

Após a obtenção dos dados, os mesmos foram utilizados para a avaliação da eficácia antimicrobiana dos produtos em teste, aplicando-se os critérios propostos pela metodologia EN 1499⁶⁰ descritos a seguir:

- Para qualquer produto, o fator de redução da média do $\log_{10}$ obtido para os produtos em teste deve ser estatisticamente significativamente maior do que o encontrado para o sabão de referência;
- Se o fator de redução da média do $\log_{10}$ de um produto em teste é maior do que o obtido com o sabão de referência, a diferença deve ser testada para significância estatística, utilizando o teste não-paramétrico pareado de posicionamento de sinais de Wilcoxon (*Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test*);
- Se o fator de redução da média do log não é significativamente maior do que a obtida com o sabão referência, o teste não está em conformidade com a norma EN 1499⁶⁰.

7.7.12 Validade do teste

De acordo com a metodologia EN 1499⁶⁰, os resultados obtidos somente são válidos se atenderem aos seguintes critérios:

- Um conjunto completo de resultados de no mínimo 12 sujeitos devem estar disponíveis;
- A média logarítmica total dos “pré-valores” para os procedimentos com o produto referência e procedimentos com produtos em teste deverá ser no mínimo $5\log_{10}$;

Caso não sejam preenchidos os requisitos citados, o teste deverá ser repetido.

7.7.13 Tratamento dos dados

Os dados foram digitados em uma planilha do *Microsoft Excel*[®] e processados pelo *R 2.14.1* para a análise estatística. Foram realizadas estatísticas descritivas (média e desvio padrão) de cada experimento e feita a comparação dos grupos de forma pareada pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon (teste recomendado pela metodologia EN 1499⁶⁰).

Devido à natureza confirmatória do ensaio, o nível de significância foi estabelecido em $p = 0,01$ unicaudal, conforme indicado pela metodologia EN 1499⁶⁰. O ajuste do teste é capaz de detectar uma diferença de 0,5 log com um poder de 80 a 90%.

Para verificar se houve diferença entre os pré-valores e avaliação do *design* quadrado latino foi aplicado ANOVA (nível de significância de 5%) e para verificar a correlação da contaminação das mãos antes e após os procedimentos de higienização das mãos, foi utilizada a Correlação de Pearson.

8 RESULTADOS

8.1 SUJEITOS DO ESTUDO

Dos 15 voluntários que participaram do ensaio, 11 eram do sexo feminino (73,4%) e 4 do sexo masculino (26,6%). A idade mínima foi de 23 anos e máxima de 50 anos (média = 31 anos; mediana = 30 anos; desvio-padrão = 7,67). Doze sujeitos eram Enfermeiros, dois eram estudantes de graduação do 4º ano de Enfermagem e um exercia atividade administrativa.

8.2 VALORES INICIAIS DE *Escherichia coli* K12 PRESENTE NAS MÃOS DIREITA E ESQUERDA DOS SUJEITOS (PRÉ-VALORES)

A Figura 20, a seguir, demonstra as médias e os IC 95% estimados valores logaritmos iniciais de contaminação das mãos direita e esquerda dos sujeitos para cada um dos procedimentos de higienização das mãos (*soft soap*, sabonete com Tea Tree à 0,3%, sabonete com triclosan à 0,5% e *soft soap* seguido pelo uso de propan-2-ol).

Figura 20. Média e IC 95% para logaritmo dos pré-valores obtidos das mãos dos sujeitos para cada um dos produtos em teste. São Paulo, 2012.

O procedimento de contaminação das mãos com a suspensão do ensaio foi bem sucedido. Pela ANOVA não houve diferença estatística entre os pré-valores para cada um dos quatro produtos utilizados como tratamento (p-valor = 0,2804; nível de significância estabelecido p-valor = 0,05).

8.3 VALORES PRÉ E PÓS DE *Escherichia coli* K12 PRESENTE NAS MÃOS DIREITA E ESQUERDA DOS SUJEITOS

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 demonstram os resultados experimentais de cada um dos procedimentos de higienização das mãos e representam a quantidade de UFC por placa de Petri, das mãos direita e esquerda, para cada um dos sujeitos de acordo com a utilização do produto em teste.

Pode-se observar que para a higienização das mãos com 5 mL de *soft soap* por 60 segundos (Tabela 2), os sujeitos 12 e 15 apresentaram menor contaminação inicial na diluição de 10^{-3} depois da secagem da suspensão teste com contagem de 5.10^8 UFC/mL (crescimento de 3 e 1 colônia por placa, para cada uma das mãos). Os sujeitos 6, 8 e 10 tiveram as placas do pré-valor com o maior número de colônias de *E. coli* K12 (>330 mantendo até a diluição de 10^{-5}). O menor pós-valor obtido foi dos sujeitos 11 e 15, pois não houve crescimento de colônias nas placas. O maior pós-valor encontrado foi do sujeito 6 (crescimento 328 UFC/mL na segunda diluição).

Para o procedimento de higienização das mãos com 5 mL de *soft soap* por 60 segundos, seguido pelo uso de 3 mL de propan-2-ol por 30 segundos por duas vezes (Tabela 3), o sujeito 11 apresentou menor contaminação das mãos para a terceira diluição (crescimento de 21 e 18 colônias nas placas das mãos direita e esquerda, respectivamente). Os sujeitos 6, 8 e 14 apresentaram contagens >330 para as três diluições do pré-valor. Nos pós-valores, as placas dos sujeitos 3, 4, 7, 10 e 11 evidenciaram ausência de crescimento de UFC de *E. coli* K12 enquanto que o sujeito 6 apresentou 10 e 1 colônia nas placas da diluição de 10^{-3} do pós-valor.

Para o procedimento de higienização das mãos com 1,5 mL do sabonete contendo Tea Tree à 0,3% durante 60 segundos (Tabela 4), apenas o sujeito 6 teve a contaminação inicial >330 UFC em todas as placas do pré e do pós-

valor. A menor contaminação inicial ocorreu nas mãos do sujeito 11, sendo que houve o crescimento de quatro colônias nas placas da quinta diluição do pré-valor. As placas dos sujeitos 2, 3 e 13 não apresentaram crescimento de colônias nas diluições de 10^0 à 10^{-3} do pós-valor.

Os sujeitos 6, 9, 10 e 15 que realizaram a higienização das mãos por 60 segundos, com 1,5 mL de sabonete contendo 0,5% de triclosan, tiveram as diluições dos pré-valores resultando em placas com >330 UFC. O menor pós-valor obtido foi do sujeito 11, com 25 colônias para a diluição 10^0 ausência de crescimento na terceira diluição. O maior pós-valor encontrado foi do sujeito 6, em que houve crescimento >330 UFC nas placas de Petri, mantendo-se até a quinta diluição.

Tabela 2. UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o procedimento de higienização das mãos com *soft soap*. São Paulo, 2012.

Grupo	Sujeito	Mão	Pré-valor (UFC)			Pós-valor (UFC)		
			10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^0	10^{-1}	10^{-2}
I	1	D	>330	141	26	110	11	2
	1	E	>330	169	25	98	8	3
	2	D	27	2	0	15	3	0
	2	E	46	2	0	12	3	0
	3	D	96	14	4	0	0	0
	3	E	71	11	0	10	2	1
	4	D	>330	205	20	12	4	0
	4	E	>330	153	16	11	1	0
II	5	D	54	8	1	13	2	0
	5	E	54	4	0	0	0	0
	6	D	>330	>330	>330	> 330	>330	328
	6	E	>330	>330	>330	> 330	>330	>330
	7	D	>330	>330	262	> 330	>330	84
	7	E	>330	>330	283	> 330	>330	62
	8	D	>330	>330	>330	> 330	189	32
	8	E	>330	>330	>330	> 330	145	31
III	9	D	174	20	5	15	4	0
	9	E	283	27	2	12	1	3
	10	D	>330	>330	>330	12	1	0
	10	E	>330	>330	>330	11	1	0
	11	D	>330	313	20	0	0	0
	11	E	>330	232	9	0	0	0
	12	D	1	0	0	10	2	0
	12	E	3	0	0	0	0	0
IV	13	D	11	1	1	20	2	1
	13	E	24	2	0	17	9	0
	14	D	29	3	0	12	1	0
	14	E	51	2	0	0	0	0
	15	D	3	1	1	0	0	0
	15	E	1	0	0	0	0	0

Tabela 3. UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-
valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o
procedimento de higienização das mãos com *soft soap* seguido pelo propan-2-
ol. São Paulo, 2012.

Grupo	Sujeito	Mão	Pré-valor (UFC)			Pós-valor (UFC)		
			10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^0	10^{-1}	10^{-2}
I	1	D	279	26	8	12	1	0
	1	E	179	20	1	15	1	0
	2	D	>330	>330	151	15	3	0
	2	E	>330	>330	155	0	0	0
	3	D	327	63	5	0	0	0
	3	E	38	11	1	0	0	0
	4	D	>330	>330	202	0	0	0
	4	E	>330	>330	329	0	0	0
II	5	D	>330	76	11	13	2	0
	5	E	>330	71	12	0	0	0
	6	D	>330	>330	>330	> 330	50	1
	6	E	>330	>330	>330	> 330	123	10
	7	D	>330	47	11	0	0	0
	7	E	>330	113	15	0	0	0
	8	D	>330	>330	>330	67	5	0
	8	E	>330	>330	>330	124	8	2
III	9	D	37	6	0	0	0	0
	9	E	63	7	0	13	1	0
	10	D	>330	295	43	0	0	0
	10	E	>330	253	44	0	0	0
	11	D	21	7	1	0	0	0
	11	E	18	3	0	0	0	0
	12	D	>330	115	22	120	8	2
	12	E	>330	>330	176	0	0	0
IV	13	D	27	4	3	0	0	0
	13	E	13	3	1	11	1	0
	14	D	>330	>330	>330	269	10	1
	14	E	>330	>330	>330	> 330	40	2
	15	D	>330	>330	200	0	0	0
	15	E	>330	>330	111	13	1	0

Tabela 4. UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-
valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o
procedimento de higienização das mãos com sabonete contendo óleo
essencial de Tea Tree à 0,3%. São Paulo, 2012.

Grupo	Sujeito	Mão	Pré-valor (UFC)			Pós-valor (UFC)		
			10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^0	10^{-1}	10^{-2}
I	1	D	>330	62	6	> 330	314	55
	1	E	>330	72	11	> 330	34	3
	2	D	168	21	1	0	0	0
	2	E	249	29	1	0	0	0
	3	D	96	12	2	0	0	0
	3	E	211	29	4	0	0	0
	4	D	219	37	6	11	1	0
	4	E	>330	55	9	12	2	0
II	5	D	172	32	7	98	10	3
	5	E	108	9	1	78	4	0
	6	D	>330	>330	>330	>330	>330	>330
	6	E	>330	>330	>330	> 330	>330	165
	7	D	>330	63	10	35	3	0
	7	E	>330	59	6	27	1	1
	8	D	180	29	5	102	9	1
	8	E	>330	105	31	97	6	1
III	9	D	196	28	5	270	21	2
	9	E	>330	>330	57	230	21	3
	10	D	>330	>330	146	> 330	36	5
	10	E	>330	>330	145	> 330	83	7
	11	D	4	0	0	0	0	0
	11	E	4	0	0	12	1	0
	12	D	>330	166	28	157	15	4
	12	E	>330	>330	62	154	14	8
IV	13	D	232	39	3	0	0	0
	13	E	164	27	3	0	0	0
	14	D	>330	>330	69	> 330	232	46
	14	E	>330	>330	154	> 330	96	30
	15	D	>330	>330	>330	> 330	42	4
	15	E	>330	>330	166	> 330	37	7

Tabela 5. UFC por placa de Petri para cada uma das diluições dos pré e pós-
valores, das mãos direita e esquerda de cada sujeito de pesquisa, durante o
procedimento de higienização das mãos com sabonete contendo triclosan à
0,5%. São Paulo, 2012.

Grupo	Sujeito	Mão	Pré-valor (UFC/mL)			Pós-valor (UFC/mL)		
			10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^0	10^{-1}	10^{-2}
I	1	D	>330	191	28	20	1	0
	1	E	>330	112	14	10	0	0
	2	D	>330	>330	193	> 330	239	49
	2	E	>330	>330	>330	> 330	232	84
	3	D	>330	67	7	89	8	0
	3	E	>330	89	17	56	2	0
	4	D	>330	111	9	120	40	2
	4	E	>330	135	18	111	8	1
II	5	D	>330	38	2	> 330	55	4
	5	E	180	20	4	250	12	2
	6	D	>330	>330	>330	> 330	>330	260
	6	E	>330	>330	>330	>330	>330	>330
	7	D	>330	87	17	145	13	0
	7	E	>330	83	24	25	2	0
	8	D	137	15	1	98	10	1
	8	E	91	11	0	18	1	0
III	9	D	>330	>330	>330	> 330	>330	257
	9	E	>330	>330	>330	> 330	>330	289
	10	D	>330	>330	>330	> 330	>330	132
	10	E	>330	>330	>330	> 330	>330	209
	11	D	87	6	5	25	2	0
	11	E	140	16	0	0	0	0
	12	D	>330	>330	58	> 330	194	40
	12	E	>330	>330	236	> 330	285	58
IV	13	D	236	34	2	50	5	0
	13	E	129	17	1	72	13	0
	14	D	>330	44	7	> 330	265	45
	14	E	176	23	3	> 330	179	23
	15	D	>330	>330	>330	> 330	299	56
	15	E	>330	>330	>330	> 330	273	58

8.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAMINAÇÃO DAS MÃOS DOS SUJEITOS NOS PRÉ E PÓS-VALORES

Na Tabela 6 estão explicitadas as correlações entre a contaminação das mãos direita e esquerda dos sujeitos antes (pré-valores) e após (pós-valores) o procedimento de higienização das mãos, por meio da Correlação de Pearson.

Tabela 6. Correlação entre a contaminação das mãos direita e esquerda dos sujeitos, antes (pré-valores) e após (pós-valores) o procedimento de higienização das mãos. São Paulo, 2012.

Momento	Tratamento	Diluição		
		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Pré-valor	<i>Soft Soap</i>	0,981	0,986	0,999
	Sabonete com Tea Tree 0,3%	0,774	0,817	0,892
	Sabonete com triclosan 0,5%	0,763	0,986	0,934
	<i>Soft soap</i> + propan-2-ol	0,830	0,917	0,916
Pós-valor		10^0	10^{-1}	10^{-2}
	<i>Soft Soap</i>	0,535	0,697	0,598
	Sabonete com Tea Tree 0,3%	0,565	0,356	0,792
	Sabonete com triclosan 0,5%	0,343	0,805	0,750
	<i>Soft soap</i> + propan-2-ol	0,359	0,386	0,445

Observa-se que os valores estão mais correlacionados entre si nos pré-valores (mais próximos à +1) do que nos pós-valores, indicando que o fluido contaminou de maneira bastante semelhante as duas mãos. Além disso, a Tabela 6 demonstra que, após o procedimento de higienização das mãos, houve uma tendência para uma mão estar um pouco mais ou menos contaminada do que a outra.

8.5 LOGARITMOS DOS PRÉ E PÓS-VALORES E FATOR DE REDUÇÃO LOGARITIMICA

A Tabela 7 representa os pré-valores, pós-valores e fator de redução logaritimica ($FR = \text{pré-valor} - \text{pós-valor}$) por sujeito de pesquisa, após o cálculo indicado pela metodologia EN 1499⁶⁰ descrito no item 7.7.11, conforme o procedimento de higienização das mãos. Observa-se que todas as médias logaritimicas dos pré-valoreres para quatro procedimentos de higienização das mãos foram maiores do que 5, contemplando os requisitos necessários para que o ensaio fosse válido (média = 5,63 para *soft soap*; 5,98 para o sabonete contendo Tea Tree; 6,38 para o sabonete contendo triclosan; 6,29 para o *soft soap* + propan-2-ol).

Para o procedimento de referência utilizando apenas *soft soap*, o menor FR foi obtido pelo sujeito 12 (2,16 $\log_{10}$) e o maior, pelo sujeito 10 (6,46 $\log_{10}$). O uso do sabonete contendo OTT resultou em um FR menor no sujeito 1 (2,52 $\log_{10}$) e maior FR no sujeito 4 (4,56 $\log_{10}$). O menor FR para o sabonete contendo triclosan foi do sujeito 14 (2,08 $\log_{10}$) e o menor para o sujeito 1 (5,16 $\log_{10}$). Para a higienização de referência utilizando *soft soap* + propan-2-ol o

menor FR foi obtido pelo sujeito 13 ($3,42 \log_{10}$) e o maior, pelo sujeito 4 ($6,42 \log_{10}$).

Na Tabela 7, é possível verificar que a lavagem de referência com *soft soap* seguido pelo uso de propan-2-ol apresentou uma redução microbiana maior (redução média de $4,89 \log_{10}$) do que os dois produtos em teste e do que o procedimento referência com apenas *soft soap*. O *soft soap* proporcionou uma redução de $3,87 \log_{10}$, resultado muito semelhante ao obtido pelo sabonete com OTT ($3,89 \log_{10}$), o qual foi ligeiramente superior ao produto referência oficial. O sabonete contendo triclosan à 0,5% apresentou a pior redução logarítmica dentre os quatro procedimentos de higienização das mãos, de $3,59 \log_{10}$.

Tabela 7. Logaritmos referentes aos pré e pós-valores e fator de redução logaritmica (FR) para cada um dos procedimentos de higienização das mãos de cada sujeito, de acordo com o grupo. São Paulo, 2012.

Grupo	Sujeito	Soft Soap			Tea Tree			Triclosan			Soft Soap + propan-2-ol		
		Pré	Pós	FR	Pré	Pós	FR	Pré	Pós	FR	Pré	Pós	FR
I	1	6,31	2,02	4,29	5,88	3,37	2,52	6,26	1,10	5,16	5,48	1,07	4,41
	2	4,56	1,13	3,43	5,36	1,00	4,36	7,29	3,65	3,63	7,18	1,35	5,83
	3	5,02	1,18	3,84	5,25	1,02	4,23	6,00	1,79	4,21	5,44	1,00	4,44
	4	6,25	1,06	5,19	5,68	1,12	4,56	6,11	2,23	3,88	7,42	1,00	6,42
II	5	4,76	1,22	3,54	5,24	1,90	3,34	5,41	2,47	2,94	5,97	1,22	4,76
	6	7,52	4,52	3,00	7,52	4,22	3,30	7,52	4,41	3,10	7,52	2,85	4,67
	7	7,44	3,86	3,57	5,85	1,41	4,44	6,16	1,90	4,26	6,02	1,00	5,02
	8	7,52	3,38	4,14	5,95	1,94	4,01	5,06	1,75	3,31	7,52	1,90	5,61
III	9	5,37	1,13	4,23	6,08	2,36	3,71	7,52	4,44	3,08	4,76	1,06	3,70
	10	7,52	1,06	6,46	7,16	2,78	4,39	7,52	4,23	3,29	6,55	1,00	5,55
	11	6,32	1,00	5,32	3,60	1,04	2,56	5,38	1,35	4,03	4,54	1,00	3,54
	12	3,30	1,18	2,12	6,49	2,18	4,31	7,17	3,56	3,61	6,74	2,00	4,74
IV	13	4,21	1,57	2,65	5,42	1,00	4,42	5,29	1,88	3,41	4,44	1,02	3,42
	14	4,51	1,04	3,47	7,05	3,43	3,61	5,53	3,45	2,08	7,52	2,41	5,10
	15	3,78	1,00	2,78	7,22	2,67	4,55	7,52	3,63	3,89	7,19	1,06	6,13
Média		5,63	1,76	3,87	5,98	2,10	3,89	6,38	2,79	3,59	6,29	1,40	4,89

8.6 ANÁLISE DO MODELO QUADRADO LATINO

O *design* quadrado latino, para o qual todos os sujeitos são randomizados em uma determinada quantidade de grupos que varia de acordo com a quantidade de produtos em teste, no caso quatro, tem a finalidade de avaliar três questões: a) se há efeito de grupo, ou seja, se existe variação nos resultados dos indivíduos que cumpriram a seqüência dos procedimentos; b) se há efeito de coluna, ou seja, se a posição que o indivíduo ocupa no grupo no qual está inserido interfere nos resultados obtidos; c) se existe diferença nos resultados obtidos por cada tratamento.

Para avaliar o efeito do modelo, conforme recomendado pela metodologia⁶⁰, foi utilizado ANOVA, para qual os resultados estão descritos na Tabela 8, a seguir.

Tabela 8. ANOVA para avaliação do modelo quadrado latino para efeitos de grupo, coluna e tratamento. São Paulo, 2012.

Fator	graus de liberdade	p-valor
Tratamento	3	<0,001
Grupo	3	0,31
Coluna	3	0,81

É possível observar que não houve diferença significativa para a posição que o indivíduo ocupava no grupo ($p = 0,81$) ou para a seqüência de

procedimentos executada ($p = 0,31$), ou seja, não houve efeito de coluna ou grupo. Contudo, nota-se que houve diferença no tratamento ($p < 0,001$) que, no caso, foi ocasionada exclusivamente pelos diferentes procedimentos.

8.7 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS PRODUTOS EM TESTE

Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa na redução microbiana proporcionada pelos produtos em teste, foi utilizado o teste de Wilcoxon, conforme recomendado pela metodologia⁶⁰ (Tabelas 9 e 10).

Foram realizados dois testes de Wilcoxon, um tendo como produto-referência o *soft soap* + álcool (procedimento referência da versão *draft*¹⁰⁵ – Tabela 9) e, o outro, comparando os produtos em teste ao *soft soap* (procedimento referência da versão oficial⁶⁰ – Tabela 10).

Tabela 9. Aplicação do teste de Wilcoxon nos FR para cada um dos produtos em teste em relação ao procedimento de referência com *soft soap* + propan-2-ol. São Paulo, 2012.

Produto	Média log pré-valor (DP)	Média log pós-valor (DP)	FR (DP)	Wilcoxon p-valor
<i>Soft soap</i>	5,63 (1,46)	1,76 (1,17)	3,87 (1,13)	0,0065
Tea Tree 0,3%	5,98 (1,01)	2,10 (1,03)	3,89 (0,69)	0,0010
Triclosan 0,5%	6,38 (0,95)	2,79 (1,16)	3,59 (0,71)	0,0001
<i>Soft soap</i> + propan-2-ol	6,29 (1,14)	1,40 (0,60)	4,89 (0,91)	-

Observa-se na Tabela 9 que o desempenho do procedimento realizado com *soft soap* + propan-2-ol foi superior aos demais produtos em teste, pois o p-valor para todos os produtos foi menor do que 0,01.

Tabela 10. Aplicação do teste de Wilcoxon nos FR para cada um dos produtos em teste em relação ao procedimento de referência com *soft soap*. São Paulo, 2012.

Produto	Média log pré-valor (DP)	Média log pós-valor (DP)	FR (DP)	Wilcoxon p-valor
<i>Soft soap</i> + propan-2-ol	6,29 (1,14)	1,40 (0,60)	4,89 (0,91)	0,0065
Tea Tree 0,3%	5,98 (1,01)	2,10 (1,03)	3,89 (0,69)	0,2470
Triclosan 0,5%	6,38 (0,95)	2,79 (1,16)	3,59 (0,71)	0,2975
<i>Soft soap</i>	5,63 (1,46)	1,76 (1,17)	3,87 (1,13)	-

Verifica-se na Tabela 10 que quando o *soft soap* é adotado como o produto referência, não há diferença estatisticamente significativa entre o mesmo e o desempenho do sabonete com Tea Tree à 0,3% ($p = 0,2470$) ou sabonete com triclosan à 0,5% ($p = 0,2975$). Houve diferença significativa em relação ao *soft soap* + propan-2-ol, o qual apresentou uma eficácia antimicrobiana superior.

Conforme determinado pelo método⁶⁰, para que um produto em teste seja considerado conforme segundo a padronização, a média do FR logaritmica do produto em teste deve ser significativamente maior do que a obtida pelo procedimento referência. Como em nenhum dos testes de Wilcoxon realizados houve diferença estatisticamente significativa (Tabelas 9 e 10), os sabonetes com Tea Tree à 0,3% e triclosan à 0,5% foram considerados **não conformes** para redução antimicrobiana na higienização das mãos, de acordo com esta padronização.

9 DISCUSSÃO

Para realizar o presente estudo de avaliação da eficácia antimicrobiana de sabonetes para higienização das mãos foi adotada a metodologia EN 1499⁶⁰, com algumas modificações sugeridas pela versão *draft* proposta para o mesmo método, no ano de 2011¹⁰⁵. Tais alterações foram referentes à utilização do meio de TSSA para recuperação da cepa teste, uma vez que o teste realizado comprovou a inibição de *S. aureus* ATCC 6538 nesse meio em comparação ao TSA; adoção do método de validação dos neutralizantes proposto na versão *draft*¹⁰⁵, visto que a versão oficial não descreve o procedimento; inclusão dos dois procedimentos de higienização de referência descritos tanto na metodologia oficial⁶⁰ quanto na versão *draft*¹⁰⁵, com a finalidade de compará-los.

A opção por tal metodologia deveu-se ao fato de que se trata de um método validado e reconhecido internacionalmente, além de apresentar um padrão rigoroso de exigência para aprovação dos produtos em teste.

Uma outra adaptação feita na metodologia foi em relação à contagem da quantidade de colônias presentes no pré e pós-valores. Foram assumidos valores até 330 colônias, valor indicado pela versão *draft*¹⁰⁵, sendo que a metodologia oficial⁶⁰ considera os resultados até 300 colônias. Em relação à transformação desses valores para $\log_{10}$, no caso de placas com valores >330, foi considerado o log de 330 por três motivos. Primeiro porque a metodologia não informa como proceder quando esses valores são encontrados, apenas menciona o que deve ser feito ao serem encontrados valores iguais a zero que, no caso, deve ser considerado logaritmo de 1 na base 10. Segundo, porque as placas que apresentaram valores >330 continham valores contáveis, muito próximos de 330. Terceiro porque ao se considerar o $\log_{10}$ de 330 haverá apenas uma subestimação da redução, ou seja, o resultado assume um valor

mais conservador em relação à eficácia da redução microbiana que foi obtida pelo produto.

A escolha das concentrações dos agentes antimicrobianos presentes nos sabonetes justifica-se porque são produtos que já circulam no mercado consumidor, além de serem registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Isso assegura que haveria um baixo risco para a saúde dos voluntários que se dispusessem a participar do ensaio, bem como permitiria verificar quais são os resultados obtidos por formulações que já são utilizadas no meio hospitalar, como é o caso do triclosan, e estão à disposição para uso, no caso do sabonete com OTT. Outro fator que contribuiu para a escolha do sabonete contendo o Tea Tree foi o fato de a formulação em teste apresentar uma concentração bem abaixo da considerada segura para ser empregada em humanos sem ocasionar efeitos alérgicos⁷¹.

Ressalte-se que havia também o objetivo inicial de verificar redução microbiana após a higienização das mãos com sabonete contendo clorexidina à 2,0% e compará-la aos sabonetes com triclosan e OTT. Contudo, não houve a realização desse teste porque não foi possível validar um neutralizante para os produtos que continham clorexidina como agente antimicrobiano. Tanto o teste de toxicidade quanto o teste de validação fracassaram quando avaliados os neutralizantes propostos pela metodologia, mesmo utilizando o D/E, que é um neutralizante amplamente utilizado na indústria cosmética e que possui alto potencial de neutralização. Esse fato demonstra porque a clorexidina, apesar de ser muito efetiva em termos de redução microbiana²⁴, ocasiona alergias, dermatites, ressecamentos²³ e agressões à integridade da pele²² quando em contato com a epiderme de diversos PS. Esses resultados, embora obtidos apenas na tentativa de um processo de validação, retomam a necessidade de se buscar alternativas menos agressivas à saúde dos profissionais, seguras, com boa aceitabilidade e efetivos em termos de atuação de redução microbiana, conforme recomendado pelo CDC²⁴.

Os resultados obtidos pelos procedimentos de higienização das mãos de referência demonstraram que o uso do *soft soap* associado ao propan-2-ol ocasiona uma maior redução logaritmica ($4,89 \log_{10}$) do que apenas o uso do *soft soap* ($3,87 \log_{10}$). Sugere-se, portanto, que incorporação do álcool ao procedimento de referência do método, conforme propõe a versão *draft*¹⁰⁵, é pertinente para assegurar um extremo rigor metodológico, pois vale ressaltar que um estudo que avaliou formulações alcoólicas para higiene das mãos contaminadas e com presença de matéria orgânica⁹² obteve reduções logaritmicas de 3,56 e $3,36 \log_{10}$ para os produtos com resultados inferiores ao álcool de referência (propan-2-ol à 60% – redução de $3,66 \log_{10}$).

A redução logaritmica proporcionada pelo sabonete contendo triclosan à 0,5% ($3,59 \log_{10}$) nesse estudo foi superior à encontrada em uma pesquisa que avaliou a higiene das mãos com esse mesmo agente antimicrobiano, porém na concentração de 0,1% ($2,8 \log_{10}$)⁹⁴. Além disso, esse ensaio corrobora resultados obtidos em outros estudos, os quais verificaram que as reduções logaritmicas com triclosan foram menores quando comparadas a outros produtos antimicrobianos^{24,86}.

Os resultados encontrados para o sabonete contendo OTT à 0,3% demonstram que não houve diferença significativa na eficácia da higiene das mãos realizada com sabonete contendo OTT, triclosan ou *soft soap* e, portanto, tais produtos em teste não foram aprovados pela metodologia. Contudo, é importante ressaltar que, pautando-se na literatura científica, ainda não existe uma padronização determinando qual a concentração, tempo de aplicação e melhor forma de utilização do OTT. Existem evidências de que possivelmente uma concentração de 5% em uma formulação para higienização, utilizando a mesma metodologia aplicada no presente ensaio (EN 1499), seja eficaz⁶¹. Assim, a elaboração de novos estudos que apliquem o OTT em produtos para higiene das mãos deve ser desenvolvida e representa um vasto campo a ser explorado, desde que utilizem dosagens seguras deste OE, respeitando um limite de até 10%⁷¹.

É importante ressaltar que todos os resultados obtidos nas reduções logaritmicas foram fruto de procedimentos de higienização das mãos com duração de 60 segundos, fato que não é corriqueiro na prática assistencial. Um estudo verificou que na assistência os PS despendem um tempo de 6 a 24 segundos para lavagem das mãos e que uma expectativa realista seria um episódio de 15 segundos⁹¹. Nesse caso, talvez um produto que proporcione uma sensação prazerosa durante o procedimento possa contribuir para aumentar a adesão à técnica.

Assim, uma outra questão que está inclusa na aceitabilidade é o aroma. Será que o uso de um produto que já é menos agressivo à pele e que tem um *plus* de ser agradável olfativamente não contribuiria para o aumento da adesão à higienização das mãos? Diversos voluntários, durante a coleta, apesar de ser um estudo cegado, fizeram referência à questão olfativa do produto, dizendo ser muito agradável. Tal fato foi apenas observado pelos monitores, sem que houvesse interferência dos mesmos durante a exposição de idéias dos sujeitos.

O CDC²⁴ e Larson *et al*²³ afirmam que a seleção de um produto para higiene das mãos deve ser feita baseando-se na boa aceitabilidade e eficácia, pois ambas são fatores que contribuem para a promoção e aumento da adesão à prática. Conforme citado anteriormente, o uso do sabonete com OTT provocaria também um efeito aromaterapêutico, apesar de não ser objeto de estudo dessa pesquisa. Entretanto, a coleta de dados evidenciou que está claro que quando se fala na utilização de OE, eles produzem um efeito aromaterapêutico no indivíduo, além de ter efeito puramente físico, seja no microrganismo (como foi demonstrado pelo presente estudo), seja no indivíduo que o utiliza. O estímulo ao sistema olfativo quando se usa um OE é inevitável, portanto não é possível dissociar o efeito aromaterapêutico do efeito físico ocasionado por um óleo, o que pode ser explorado em estudos futuros.

Nesse sentido, o presente estudo tem como resposta à questão de pesquisa que o sabonete contendo Tea Tree à 0,3% pode ser uma alternativa ao sabonete contendo triclosan à 0,5%, pois os resultados refutaram a hipótese

nula proposta. Contudo, não foi possível considerá-lo um produto de atividade antimicrobiana superior à dos procedimentos de referência, tanto da metodologia oficial⁶⁰ quanto da versão *draft*¹⁰⁵. Além disso, a avaliação da eficácia antimicrobiana da clorexidina à 2,0% na higienização das mãos não pôde ser realizada e nem comparados os efeitos do sabonete que contém OTT a tal produto.

10 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados com a realização do ensaio proposto pelo presente estudo permitem afirmar que:

- Em termos de eficácia antimicrobiana não houve diferença entre a higiene das mãos realizada com sabonete contendo óleo essencial de Tea Tree à 0,3% e a higiene das mãos com o sabonete contendo triclosan à 0,5%.
- Em relação à eficácia antimicrobiana, nenhum dos dois sabonetes apresentou desempenho superior a nenhum dos dois procedimentos referência (*soft soap* ou *soft soap* + propan-2-ol).
- O procedimento de higienização das mãos de referência utilizando *soft soap* + propan-2-ol, proposto pela versão *draft*¹⁰⁵, demonstrou-se mais eficaz do que o uso do *soft soap* apenas, descrito na metodologia oficial.

Estudos para avaliar a eficácia antimicrobiana de novas formulações de sabonetes com maiores concentrações do OTT, dentro de dosagens consideradas seguras pela literatura científica (entre 5 a 10%), devem ser desenvolvidos. Posteriormente, devem ser realizadas pesquisas que verifiquem a aceitabilidade do produto e a comparem a adesão à higiene das mãos realizada com formulações contendo OE à realizada com produtos tradicionalmente utilizadas em estabelecimentos de assistência à saúde.

REFERÊNCIAS

1. São Paulo (Cidade). Lei no. 13.717, de 08 de Janeiro de 2004. Dispõe sobre a implantação das terapias naturais na Secretaria Municipal de Saúde [cited 2011 mar 28]. São Paulo, SP; 2004. Disponível em: http://www3.prefeitura.sp.gov.br/cadlem/secretarias/negocios_juridicos/cadlem/integra.asp?alt=09012004L 137170000
2. Akiyama K. Práticas não convencionais em medicina no Município de São Paulo [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
3. National Center for Complementary and Alternative Medicine: 2007 statistics on CAM use in the United States. [cited 2011 Aug 03] Available from: <http://nccam.nih.gov/news/camstats/2007>
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. [cited 2012 Apr 7]. Brasília, DF; 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>
5. World Health Organization. Traditional Medicine Strategy. Genebra; 2004. [cited 2011 Mar 17]. Available from: <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>
6. Rose J. O livro da Aromaterapia: aplicações e inalações. Rio de Janeiro: Campus; 1995.
7. Tisserand R. A arte da Aromaterapia. São Paulo: Roca; 1993.
8. Harkenthal M, Reichling J, Geiss HK, Saller R. Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie*. 1999; 54(6):460-3.
9. Kunicka-Styczynska A, Sikora M, Kalembe D. Lavender, tea tree and lemon oils as antimicrobials in washing liquids and soft body balms. *Int J Cosmetic Sci*. 2011; 33(1):53–61.
10. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(4):853-900.
11. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1):50-62.

12. Garozzo A, Timpanaro, Bisignano B, PM Furneri, G Bisignano, Castro A. In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 49(6):806-8.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n° 2616 de 12 de maio de 1998. Dispõe sobre a obrigatoriedade de Programas de Controle de Infecção Hospitalar e sua Estrutura e Atividades. *Diário Oficial da União*, Brasília, 13 de maio de 1998.
14. Yalcin AN. Socioeconomic burden of nosocomial infections. *Indian J Med Sci* [serial online] 2003 [cited 2011 Mar 30];57:450. Available from: <http://www.indianjmedsci.org/text.asp?2003/57/10/450/11861>
15. Scott RD. The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [cited 2012 Apr 7]. Atlanta, GA; 2009. Disponível em: http://www.cdc.gov/HAI/pdfs/hai/Scott_CostPaper.pdf
16. Yalcin AN, Turgut H, Cetin CB, Tefci F. Cost of antibiotics in nosocomial infections. *Turk J Hosp Infect* 2002;6:41-5.
17. Plowman R, Graves N, Griffin MAS, Roberts JA, Swan AV, Cookson B, et al. The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialities of a district general hospital in England and the national burden imposed. *J Hosp Infect* 2001; 47(3):198-209.
18. Fernandes AT, Ribeiro Filho N. Infecção hospitalar: desequilíbrio ecológico na interação do homem com a sua microbiota. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 163-213.
19. Noakes TD, Borresen J, Hew-Butler T, Lambert MI, Jordaan E. Semmelweis and the aetiology of puerperal sepsis 160 years on: an historical review. *Epidemiol Infect*. 2008; 136(1):1-9.
20. Pittet D. Compliance with hand disinfection and its impact on hospital-acquired infections. *J Hosp Infect*. 2001; 48:S40-S46.
21. Boyce JM. Antiseptic technology: access, affordability and acceptance. *Emerg Infect Dis*. 2001; 7(2):231-3.
22. Seitz JC, Newman JL. Factors affecting skin condition in two nursing populations: implications for current handwashing protocols. *Am J Infect Control*. 1988; 16(2):46-53.

23. Larson E, Girard R, Silva CLP, Boyce J, Donaldson L, Pittet D. Skin reactions related to hand hygiene and selection of hand hygiene products. *Am J Infect Control*. 2006; 34(10):627-35.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Health Care Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. 2002.[cited Feb 27 2011] Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5116a1.htm>
25. Walters C. Illustrated elements of aromatherapy. New York: Metro Books; 1998.
26. Corazza S. Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros. São Paulo: Senac; 2002.
27. Lavabre M. Aromaterapia a cura pelos óleos essenciais. 5ed. Rio de Janeiro: Nova Era; 2001.
28. McDowell B. Nontraditional therapies for PICU. *J Pediatr Nurs*. 2005; 10(1): 29-32.
29. Andrei P, Del Comune AP. Aromaterapia e suas aplicações. Centro Universitário São Camilo. 2005; 11(4):57-68.
30. Santos SD, Silva MJP, Catão JC. A Produção de Conhecimento em Aromaterapia na área de Saúde e Enfermagem: Revisão Sistemática. *Rev Paul Enferm*. 2008; 27(3):142-150.
31. Gnatta JR, Zotelli MFM, Carmo DRB, Lopes CLBC, Rogenski NM, Silva MJP. O uso da aromaterapia na melhora da auto-estima. *Rev Esc Enferm USP*. 2011; 45(5):1113-20.
32. McEwen M, Wills E M. Bases Teóricas para Enfermagem. Porto Alegre: Artmed; 2009.
33. Conselho Federal de Enfermagem (BR). Resolução COFEN 197. Estabelece e reconhece as Terapias Alternativas como especialidade e/ou qualificação do profissional de Enfermagem. In: Conselho Regional de Enfermagem. Documentos básicos de Enfermagem. São Paulo (SP); 1997.
34. Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu; 1998.

35. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. [cited 2011 Jul 8]. Brasília, DF. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/2_rdc.pdf
36. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. [cited 2011 Jul 8]. Brasília, DF. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf
37. Perry N, Perry E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders: clinical and neuropharmacological perspectives. *CNS Drugs*. 2006; 20(4):257-80.
38. Nogueira MA, Diaz G, Sakumo L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. . *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2007; 28(3):273-278.
39. Gonçalves LA, Barbosa LCA, Azevedo AA, Casali VWD, Nascimento EA. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2003; 6(3):8-14.
40. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4.ed. Florianópolis: Editora da UFSC; 2002. 821p.
41. Kamel CA. A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix – Int J Feed Nutrit Technology*. 2000; 18(6):19-24.
42. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000; 88(2):308-16.
43. Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmaisons D, Vincent JD, Gheusi G. Making scents of olfactory neurogenesis. *J Physiol Paris*. 2002; 96(1-2):115-122.
44. Potts J. Aromatherapy in nursing practice. *Aust Nurs J*. 2009; 16(11):55.
45. Altman PM. Australian tea tree oil: a natural antiseptic. *Aust J Biotechnol* 1989; 3:247-8.

46. Lemos DRH. Influência da temperatura do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel [tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2008.
47. Brophy JJ, Davies, NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca* Terpinen-4-ol Type (Australian Tea Tree). *J Agr Food Chem.* 1989; 37(5):1330-5.
48. Knight TE, Hausen BM. *Melaleuca* oil (tea tree oil) dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 30(3):423-7.
49. Australian Standard AS 2782–2009 a. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree oil). Sydney; 2009.
50. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree oil). *Am J Infect Control.* 1996; 24(3):186-9.
51. Simões RP, Groppo FC, Sartorato A, Del Fiol FdeSá, Mattos Filho TR, Ramacciato JC *et al.* Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. *Revista Lecta Bragança Paulista.* 2002; 20(2):143-152.
52. Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini M. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37(2):185-7.
53. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisia*. *J Antimicrob Chemoth.* 2004; 53(6):1081–5.
54. Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Trabelsi N, Ksouri R, Valentin E *et al.* Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species. *J Med Plant Res.* 2011; 5(17):4147-56.
55. Carson CF, Ashton L, Dry L, Smith DW, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil gel (6%) for the treatment of recurrent herpes labialis. *J Antimicrob Chemoth.* 2001; 48(3):450-1.
56. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother Res.* 2010; 24(5):673-9.

57. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res*. 2000; 49(11):619–26.
58. Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ et al. The water soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm Res*. 2001; 50(4):213-9.
59. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(2):909-15.
60. European Committee for Standardization. Chemical disinfectants and antiseptics – hygienic handwash – test method and requirements (phase2/step2) [European standard EN 1499]. Brussels, Belgium; Central Secretariat: 1997.
61. Messenger A, Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effectiveness of hand-cleansing formulations containing Tea Tree oil assessed ex vivo on human skin and in vivo with volunteers using European standard EN 1499. *J Hosp Infect*. 2005; 59(3):220-228.
62. Padoveze MC. Estudo das infecções hospitalares em pacientes com HIV/Aids hospitalizados e da colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em pacientes com HIV/Aids não hospitalizados [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
63. Caelli M, J Porteous, Carson CF, Heller R, Riley TV. Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 2000; 46(3):236-7.
64. Dryden MS, Dailly S, Crouch M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *J Hosp Infect*. 2004; 56(4):283-6.
65. Satchell AC, Saurajen A, Bell C, Barnetson RS. Treatment of dandruff with 5% tea tree oil shampoo. *J Am Acad Dermatol*. 2002; 47(6):852-5.
66. Garcia CC, Germano C, Osti NM, Chorilli M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de melaleuca. *Rev Bras Farm*. 2009; 90(3):236-40.

67. Pearce AL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Reduction of nickel-induced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. *Inflamm Res*. 2005; 54(1):22-30.
68. Wallengren J. Tea tree oil attenuates experimental contact dermatitis. *Arch Dermatol Res*. [serial on the internet]. 2010 Sep [cited 2011 Apr 4]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-010-1083-y>
69. Apted JH. Contact dermatitis associated with the use of tea-tree oil [letter]. *Australas J Dermatol*. 1991; 32 (3):177.
70. DeGroot AC, Weyland JW. Systemic contact dermatitis from tea tree oil. *Contact Dermatitis*. 1992; 27(4):279-80.
71. Rutherford T, Nixon R, Tam M, Tate B. Allergy to tea tree oil: retrospective review of 41 cases with positive patch tests over 4.5 years. *Australas J Dermatol*. 2007; 48(2):83-7.
72. Reichling J, Landvatter U, Wagner H, Kostka K, Schaefer UF. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006; 64(2):222-8.
73. Edmondson M, Newall N, Carville K, Smith J, Riley TV, Carson CF. Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive wounds and its influence on wound healing. *Int Wound J*. 2011; 8(4):375-84.
74. Cullinton P, Halcón LL. Chronic wound treatment with topical tea tree oil. *Altern Ther Health Med*. 2011; 17(2):46-7.
75. Hughes JM. Nosocomial Infection Surveillance in the United States: Historical Perspective. *Infec Control*. 1987; 8(11):450-3.
76. Emori TG, Culver RDH, Horan TC, Jarus WR, White JW, Olson DR et al. National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS). Description of surveillance methods. *Am J Infect control*. 1991; 19(1):19-35.
77. Mayon-Whiter RT, Duce G, Kereseslidze T, Tikomirov E. An international survey of the prevalence of hospital acquired infection. *J Hosp Infect*. 1998; 11 Suppl A: 43-8.
78. Organización Panamericana de la Salud; Sociedad de Epidemiología Hospitalaria de los Estados Unidos. Conferencia Regional sobre Prevención y control de Infecciones Nosocomiales / Regional Conference on Cross Infection

prevention and control. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP); 1990 Julio; 109(1):87-9.

79. Lacerda RA. Infecções hospitalares no Brasil: as ações governamentais para seu controle enquanto expressão de políticas sociais na área da saúde [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1995.

80. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n° 196 de 24 de junho de 1983. Diário Oficial da União. Brasília (DF); 1983.

81. Prade SS, Oliveira STO, Rodriguez R, Nunes FA, Martins Netto E, Felix JQ *et al.* Estudo brasileiro sobre a magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. Revista do Controle de Infecção Hospitalar. 1995; 11-24.

82. Brasil. Presidência da República. Lei n° 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade de manutenção de Programas de Controle de Infecção Hospitalar pelos hospitais do país. Diário Oficial da União. Brasília (DF); 1997.

83. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 48 de 2 de junho de 2000. Diário Oficial da União. Brasília (DF); 2000.

84. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile* and *Acinetobacter* species. Am J Infect Control. 2010; 38(5 Suppl 1):S25-33.

85. Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI, Farrington M, Fry C, Humphreys H, Mallaghan C, Tucker DR, *et al.* For the joint working party of the British Society of Antimicrobial chemotherapy, the Hospital Infection Society, and the Infection Control Nurses Association Guidelines for the control and prevention of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. J Hosp Infect. 2006; 63:S1-44.

86. World Health Organization. World Alliance for Patient Safety. Forward Programme 2006-2007. Geneva [cited 2011 Jul 18]. Available from: http://www.who.int/patientsafety/information_centre/WHO_EIP_HDS_PSP_2006.1.pdf

87. Brasil. Ministério da Saúde. Lavar as mãos: informações para profissionais de saúde. Brasília; 1989.

88. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente – Higienização das mãos. Brasília, [cited 2011 17 Jul]. Brasília, DF; 2008.

Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/paciente_hig_maos.pdf

89. Price PB. New studies in surgical bacteriology and surgical technique. J Am Med Assoc. 1938; 111:1993-6.

90. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Higienização das mãos em serviços de saúde. [cited 2011 Feb 24]. 2007. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/higienizacao_maos.pdf

91. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. MMWR Recomm Rep. 2002; 51 (RR-16):1-45 [quiz: CE1-4].

92. Kawagoe JY, Graziano KU, Martino MDV, Siqueira I, Correa L. Bacterial reduction of alcohol-based liquid and gel products on hands soiled with blood. Am J Infect Control. 2011; 39(9):785-7.

93. Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

94. Rotter ML. Hand washing and hand disinfection. In: Mayhall CG, ed. Hospital Epidemiology and Infection Control. Baltimore: Williams & Wilkins, 2004. p.1727-46.

95. Karpanem TJ, Hendry ER, Worthington T, Lambert PA, Conway BR. Chlorhexidine: skin permeation and antisepsis. Ind Pharmacy. 2010; 26:11-14.

96. Newsom SW. Pioneers in infection control-Joseph Lister. J Hosp Infect. 2003; 55(4):246-53.

97. Cunha ER, Matos FGOA, Silva AM, Araújo EAC, Ferreira KASL, Graziano KU. Eficácia de três métodos de degermação das mãos utilizando gluconato de clorexidina degermante (GCH 2%). Rev Esc Enferm USP. 2011; 45(6): 1440-5.

98. Sax H, Allegranzi B, Uckay I, Larson E, Boyce J, Pittet D. "My five moments for hand hygiene": a usercentred design approach to understand, train, monitor and report hand hygiene. J Hosp Infect. 2007; 67(1):9-21.

99. Larson E, Kretzer EK. Compliance with handwashing and barrier precautions. J Hosp Infect 1995; 30 Suppl 1:88-106.

100. Kretzer EK, Larson EL. Behavioral interventions to improve infection control practices. Am J Infect Control. 1998; 26(3):245-53.

101. Pittet D, Mourouga P, Pernerger TV. Compliance with handwashing in a teaching hospital. Members of the Infection Control Program. *Ann Intern Med*. 1999; 130(2):126-30.
102. Allegranzi B, Pittet B. Role of hand hygiene in healthcare-associated infection prevention. *J Hosp Infect*. 2009; 73(4):305-15.
103. Bischoff WE, Reynolds TM, Sessler CN, Edmond MB, Wenzel RP. Handwashing compliance by health care workers: the impact of introducing an accessible, alcohol-based hand antiseptic. *Arch Intern Med* 2000; 160(7):1017-21.
104. Carson CF, Riley TV. Toxicity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* or Tea Tree oil. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1995; 33(2):193-4.
105. European Committee for Standardization. Chemical disinfectants and antiseptics – hygienic handwash – test method and requirements (phase2/step2) [European standard EN 1499]. Brussels, Belgium [cited 2012 18 Apr]. Available from:
<https://www.astandis.at/shopV5/Preview.action;jsessionid=9678A87F9CB216A588CBFF40AFBD5E8A?preview=&dokkey=393356&selectedLocale=en>
106. BD Diagnostics. Difco™ & BBL Manual™. Manual of Microbiological Culture Media. Maryland: BD; 2009.
107. Mattos AF, Aguirra D, Sunagawa D, Borges L, Consoni R. Validação de métodos microbiológicos. *Revista Fármacos & Medicamentos*. [serial on the Internet]. 2009 Jul [cited 2012 Apr 8]; 59. Disponível em:
<http://www.racine.com.br/setor-industrial/portal-racine/setor-industrial/validacao-de-metodos-microbiologicos>
108. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. *Diário Oficial da União*. 1999 Set 27.
109. Farmacopéia brasileira. 5 ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I. Dados sobre a pesquisa

Estudo: Comparação da eficácia antimicrobiana de sabonetes contendo óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*), triclosan e clorexidina na higienização de mãos artificialmente contaminadas.

Pesquisadora: Juliana Rizzo Gnatta

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Júlia Paes da Silva

II. Informações ao participante sobre a pesquisa

Você está sendo convidado a participar de um estudo que pretende avaliar a eficácia da lavagem de mãos realizada com três produtos diferentes, com a finalidade de verificar a redução da carga bacteriana inoculada na pele das mãos. O microrganismo utilizado será a *Escherichia coli* K12 que é uma bactéria presente na microbiota normal das mãos e reconhecida internacionalmente como não patogênica.

Os produtos utilizados são: um sabonete que contém como princípio ativo triclosan à 0,6%; sabonete líquido com clorexidina à 2,0% e sabonete líquido com óleo essencial de Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) à 0,3%. Os três produtos são registrados na Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e estão disponíveis para mercado consumidor.

A pesquisa será realizada no Laboratório de Ensaio Microbiológicos da Escola de Enfermagem da USP (LEM) e seguirá um procedimento padronizado aprovado na Europa (EN 1499) já embasado cientificamente.

Existe um risco mínimo imediato em participar do estudo para aquelas pessoas que são alérgicas ao triclosan, clorexidina ou ao óleo essencial de Tea Tree, pois podem responder com reações de hipersensibilidade.

Os dados da pesquisa serão analisados posteriormente e utilizados para publicações em revistas da área da saúde e de Enfermagem. Os resultados poderão contribuir para melhorar o conhecimento científico sobre o uso de sabonetes antissépticos no controle do crescimento bacteriano.

Não serão fornecidos auxílios financeiros para gastos com transportes ou alimentação. O estudo não acarretará em nenhum custo para o participante.

III. Esclarecimento sobre as garantias do sujeito da pesquisa

Você participará de uma aula expositiva e prática, com duração de aproximadamente 15 minutos, sobre os procedimentos de lavagem das mãos e sobre como serão feitos todos os procedimentos, a fim de garantir a sua proteção e segurança e de manter um padrão de qualidade na pesquisa. Em seguida, você vai realizar a lavagem das mãos com os três produtos em teste, conforme a orientação da pesquisadora. Todo o processo dura cerca de três horas. Caso posteriormente sejam verificadas falhas nos resultados para contagem laboratorial dos microrganismos e a coleta de dados precise ser refeita, você será convidado a participar novamente, ficando ao seu critério se dispor a participar ou não.

Todos os materiais utilizados durante a pesquisa serão supervisionados pela pesquisadora visando minimizar algum tipo de risco ao participante.

A qualquer momento você terá direito de acessar às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer dúvidas. Todos os dados obtidos serão mantidos em segurança e sua identidade será mantida em sigilo, não só durante a pesquisa, mas também em sua publicação.

A sua participação não é obrigatória e se aceitar, é possível abandonar o estudo quando quiser, sem ter que dizer o motivo de sua desistência. Sua recusa ou abandono não refletirá em nenhum dano físico ou moral e nem trará nenhum prejuízo em seu relacionamento com a instituição ou com os responsáveis pela pesquisa.

Devido à comprovação científica de que a lavagem das mãos é uma das mais importantes medidas para se remover a carga de microrganismos da pele, não há riscos para sua saúde e, portanto, não haverá nenhum tipo de ressarcimento ou indenização.

Caso aceite participar, por favor, assine as duas vias deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo que uma delas ficará com você e a outra com a pesquisadora.

IV. Informações de nomes, endereços e telefones dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa, para contato em caso de intercorrências clínicas e reações adversas

Juliana Rizzo Gnatta
(Pesquisadora responsável)
Al. dos Bambus, 639
CEP: 07600-000 Mariporã-SP
Telefone: 11-44853576/ 98301758

V. Identificação da Comissão de Pesquisa da EEUSP

Endereço: Av. Prof. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 419 CEP: 05403-000
São Paulo – SP e-mail: edipesq@usp.br

VI. Dados de identificação do sujeito da pesquisa

Nome: _____
RG: _____ Sexo: _____ Data de Nascimento: _____
Endereço: _____ Bairro: _____
CEP: _____ Telefones: _____

VII. Consentimento Pós-informado

“Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.”

São Paulo, de de 201__.

Assinatura do Participante

Pesquisador Responsável
Juliana Rizzo Gnatta
Mestranda pela EEUSP

ANEXO 2

Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

CERTIFICADO

A Coleção de Culturas Tropical – CCT certifica, para os devidos fins, que o microrganismo abaixo é uma linhagem referência ATCC (American Type Culture Collection, USA), conforme consta nos dados referentes ao seu histórico registrados no Catálogo de Linhagens da CCT, 1996 (<http://fat.org.br/servlet/pesquisa.htm>).

CCT	Microrganismo	Referência	Lote
1372	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 14948	03.12

Ref. Catálogo de Linhagens, Coleção de Culturas Tropical – CCT, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1ª. Ed., 1996.

Microrganismo de 1ª passagem

Referência CCT: OS 110561

Todas as linhagens do acervo passam por rotina de controle de qualidade. Caso haja ocorrência de problemas com a cultura reativada, o solicitante deverá contactar a CCT no prazo de até 15 dias a partir da data de entrega da cultura, para que seja feita a reposição da mesma. O prazo de validade das linhagens em seu *slant* original é de um mês, a partir da data de incubação, desde que estocado sob temperatura controlada de 2 a 8°C e utilizados os métodos técnicos específicos para sua manipulação. A CCT se comprometerá a substituir culturas liofilizadas no período de até 3 meses após seu envio.

Mª Josiane Conti
Coleção de Culturas CCT/FAT
E-mail: josi@fat.org.br

Campinas, 30 Janeiro de 2012.

ANEXO 3

Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

CERTIFICADO

A Coleção de Culturas Tropical – CCT certifica, para os devidos fins, que o microrganismo abaixo é uma linhagem referência ATCC (American Type Culture Collection, USA), conforme consta nos dados referentes ao seu histórico registrados no Catálogo de Linhagens da CCT, 1996 (<http://fat.org.br/servlet/pesquisa.htm>).

CCT	Microrganismo	Referência	Lote
1372	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 14948	03.12

Ref. Catálogo de Linhagens, Coleção de Culturas Tropical – CCT, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1ª. Ed., 1996.

Microrganismo de 1ª passagem

Referência CCT: OS 110561

Todas as linhagens do acervo passam por rotina de controle de qualidade. Caso haja ocorrência de problemas com a cultura reativada, o solicitante deverá contactar a CCT no prazo de até 15 dias a partir da data de entrega da cultura, para que seja feita a reposição da mesma. O prazo de validade das linhagens em seu *slant* original é de um mês, a partir da data de incubação, desde que estocado sob temperatura controlada de 2 a 8°C e utilizados os métodos técnicos específicos para sua manipulação. A CCT se comprometerá a substituir culturas liofilizadas no período de até 3 meses após seu envio.

Mª Josiane Conti
Coleção de Culturas CCT/FAT
E-mail: josi@fat.org.br

Campinas, 30 Janeiro de 2012.

Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

ABERTURA DA AMPOLA E REATIVAÇÃO DAS CÉLULAS LIOFILIZADAS

- Todo o material empregado deverá ser estéril ou flambado.
- Limpar e desinfetar a ampola com uma gaze embebida em álcool 70%.
- Riscar a ampola na altura do ponto médio do tampão de algodão utilizando a lima ou a caneta com ponta de diamante.
- Envolver a ampola em um chumaço de algodão ou gaze. Segurando firmemente com ambas as mãos, quebrar a ampola na altura do risco pressionando com os dedos polegares.
- Retirar a porção superior da ampola próximo ao bico de Bunsen e remover o tampão de algodão com uma pinça.
- Adicionar cerca de 0,2 ml de água destilada com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Procedimento para bactérias e leveduras:

1. Fazer uma suspensão das células, deixando rehidratar por aproximadamente, 10 – 15 minutos.
2. Transferir todo o conteúdo da ampola para um tubo de ensaio contendo 5,0 ml de meio de cultura líquido indicado para a espécie e incubar conforme orientação para cada linhagem.
3. A partir da cultura crescida no caldo, fazer uma estria de esgotamento em placa contendo meio sólido recomendado.

Nota: A reativação pode ser feita diretamente em meio sólido, mas pode não propiciar uma recuperação de células adequada.

Procedimento para fungos filamentosos:

1. Utilizar uma placa contendo meio sólido recomendado, com a superfície seca.
 2. Rehidratar o liofilizado por 30 minutos e verter todo o conteúdo sobre a superfície de um meio sólido.
- Incubar os microrganismos nas condições de aeração, luz, temperatura e tempo de crescimento recomendadas. Alguns microrganismos podem necessitar de repiques regulares para sua manutenção.

Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

MEIOS DE CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO

NA

Nome: Ágar Nutriente

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Pesar os ingredientes em balança semi-analítica

Dissolver os ingredientes em água destilada, não filtrar e dispensar como requerido. Autoclavar 15 minutos/121°C.

(meio formulado a partir do Nutrient - broth , DIFCO 0001- 17-8)

ANEXO 4

Procedimento padrão para higienização das mãos

Para higienização correta das mãos siga os passos de 1 a 6. Aguarde as instruções sobre qual quantidade de produto você receberá. Repita cada movimento por 5 vezes e continue a lavagem das mãos até alcançar o tempo de contato indicado.

1. Palma contra palma.
(5 vezes)

2. Esfregue as pontas dos dedos
contra a palma da mão oposta e
vice-versa. (5 vezes cada)

3. Palma da mão direita
sobre dorso da mão
esquerda e palma da
mão esquerda sobre
dorso da mão direita.
(5 vezes cada)

4. Palma contra palma
com os dedos entrela-
çados (5 vezes)

5. Parte posterior dos dedos,
em oposição à palma, com
os dedos fechados em concha.
Fazer movimentos de vai-e-vém
(5 vezes).

6. Rotação dos polegares
na palma da mão oposta.
(5 vezes cada)

Enxágüe sempre deixando a água cair nas mãos em posição vertical, das pontas dos dedos em direção às palmas. O tempo de enxágüe será indicado.