

MONICA PORTO MAIA SOARES

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SABONETES COM TRICLOSAN
SOBRE SUSPENSÕES BACTERIANAS DE *Escherichia coli* e
Staphylococcus aureus APLICADAS SOBRE A SUPERFÍCIE DAS
MÃOS DE VOLUNTÁRIOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S676a
2013

Soares, Monica Porto Maia, 1984-

Avaliação da eficiência de sabonetes com triclosan sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* aplicadas sobre a superfície das mãos de voluntários / Monica Porto Maia Soares. – Viçosa, MG, 2013.

xii, 69f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Nélio José de Andrade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 49-62

1. Assepsia e antissepsia. 2. Agentes antibacterianos.
3. Antissépticos. 4. Triclosan. 5. Sabonete. 6. Mãos - Cuidado e higiene. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 614.48

MONICA PORTO MAIA SOARES

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SABONETES COM TRICLOSAN
SOBRE SUSPENSÕES BACTERIANAS DE *Escherichia coli* e
Staphylococcus aureus APLICADAS SOBRE A SUPERFÍCIE DAS
MÃOS DE VOLUNTÁRIOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2013.

José Benício Paes Chaves
(Coorientador)

Ana Clarissa dos Santos Pires
(Coorientadora)

Wilmer Edgard Luera Peña

Nélio José de Andrade
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pelas muitas oportunidades concedidas.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Nélio, pela oportunidade, orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, amizade e força nos momentos difíceis.

Aos professores José Benício Paes Chaves, Ana Clarissa dos Santos Pires, Wilmer Edgard Luera Pena e Hélio Garcia Leite pela colaboração, pelas sugestões, pela atenção e disposição em ajudar.

A toda minha família, pelo apoio, pela ajuda e incentivo em todos os momentos.

A toda equipe do Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos, pela amizade, ajuda e momentos de alegria.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos, amizade, ajuda e convivência durante todos esses anos.

Aos meus amigos, pelos momentos de alegria, pelo apoio e incentivo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MONICA PORTO MAIA SOARES, filha de Vicente Paulo Soares e Letícia Teixeira Porto Maia Soares, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 07 de janeiro de 1984.

Em julho de 2009, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2010, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2013.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo	3
1.1.1. Objetivos específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos sanitizantes	5
2.2. Sabonetes bactericidas	7
2.3. Produtos antissépticos	8
2.4. Triclosan	8
2.5. Micro-organismos: <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Produtos testados	14
3.2. Análises físico-químicas dos sabonetes	16
3.2.1. Viscosidade dos sabonetes.....	16
3.2.2. pH dos sabonetes	17
3.2.3. Densidade dos sabonetes.....	17
3.2.4. Tensão interfacial dos sabonetes.....	18
3.3. Teor de triclosan nos sabonetes antissépticos	20
3.4. Determinação da atividade bacteriostática/bactericida do triclosan a 0,5 % (m/v) sobre suspensões bacterianas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.5. Avaliação da eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	22

3.5.1. Teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar	22
3.5.2. Avaliação da eficiência dos sabonetes líquidos sobre suspensões bacterianas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , aplicadas na superfície das mãos de voluntários	23
3.6. Adesão de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> nas mãos de voluntários	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1. Análises físico-químicas dos sabonetes	28
4.1.1. Viscosidade dos sabonetes	28
4.1.2. pH dos sabonetes	30
4.1.3. Densidade dos sabonetes	30
4.1.4. Tensão interfacial dos sabonetes	31
4.2. Teor de triclosan dos sabonetes	33
4.3. Determinação da atividade bacteriostática/bactericida do triclosan a 0,5 % (m/v) sobre suspensões bacterianas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.4. Avaliação da eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.4.1. Teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar	37
4.4.2. Avaliação da eficiência dos sabonetes líquidos sobre suspensões bacterianas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , aplicadas na superfície das mãos de voluntários	40
4.5. Adesão de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> nas mãos de voluntários	44
5. CONCLUSÕES	47
6. BIBLIOGRAFIA	49
ANEXOS	63

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Composição dos sabonetes líquidos e suas respectivas funções ..	15
Tabela 2 – Equações para o cálculo da viscosidade cinemática (V) em centistokes	17
Tabela 3 – Viscosidade a 25 °C (centistokes), pH a 20 °C, densidade a 20 °C (g/mL) e tensão interfacial a 20 °C (mN/m) dos sabonetes líquidos	28
Tabela 4 – Teor de triclosan (% m/m) e sua variação (Δ) em relação à concentração indicada nos rótulos dos sabonetes líquidos (0,5 % (m/m))	34
Tabela 5 – Valores dos halos de inibição (cm) dos micro-organismos <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> devido à ação dos sabonetes líquidos	38
Tabela 6 – Análise de variância do logaritmo neperiano do número de UFC/mão de células de <i>Escherichia coli</i> nas mãos dos voluntários após o uso dos sabonetes.....	41
Tabela 7 – Análise de variância do logaritmo neperiano do número de UFC/mão de células de <i>Staphylococcus aureus</i> nas mãos dos voluntários após o uso dos sabonetes	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura molecular do triclosan (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil-éter)	9
Figura 2 - Superfície curva de uma gota com os raios principais que a definem	19
Figura 3 - Metodologia do swab para coleta em superfícies de mãos	25
Figura 4 - Interação água e tensoativos	31
Figura 5 - Micelas formadas por tensoativos no interior de uma solução aquosa	32
Figura 6 - Tensão superficial em função da concentração de tensoativo	33
Figura 7 - Imagem do halo de inibição contra <i>Escherichia coli</i> utilizando-se o sabonete 2 (a) e o 6 (b) e contra <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando-se o sabonete 2 (c) e o 6 (d).....	40
Figura 8 - Médias dos logaritmos decimais de UFC/mão para <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> recuperados após o uso dos sabonetes	42
Figura 9 - Médias dos logaritmos decimais de UFC/mão para <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> recuperados das mãos dos voluntários.....	45

RESUMO

SOARES, Monica Porto Maia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Avaliação da eficiência de sabonetes com triclosan sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* aplicadas sobre a superfície das mãos de voluntários.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: José Benício Paes Chaves e Ana Clarissa dos Santos Pires.

Testes para avaliação de sabonetes antissépticos são fundamentais para comprovação de eficiência dos diferentes sabonetes disponíveis no mercado, além de constituírem uma orientação segura na escolha daqueles destinados aos procedimentos de higienização nas mais diversas áreas. Neste estudo foram analisadas cinco marcas de sabonetes líquidos antissépticos contendo triclosan na concentração de 0,5 % (m/m) e um sabonete líquido neutro para avaliar a real necessidade de se utilizar produtos com ação antimicrobiana em indústrias, hospitais e residências. Foram realizadas as seguintes etapas: I) avaliação das características físico-químicas dos sabonetes; II) avaliação do teor de triclosan nos sabonetes antissépticos; III) avaliação da atividade bacteriostática/bactericida do triclosan a 0,5 % (m/v) sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*; IV) avaliação da eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* por meio do teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar; e V) avaliação da eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* em condições reais, usando voluntários, em condições padronizadas. Os valores encontrados tanto para viscosidade quanto para tensão interfacial dos sabonetes diferiram muito, variando de 268 a 793 centistokes e de 14,42 a 26,89 mN/m, respectivamente, o que provavelmente ocorreu devido às suas diferentes formulações. O pH variou de 5,95 a 7,07, tendo apenas o sabonete neutro se aproximado do pH fisiológico da pele (4,2 a 5,9). A densidade entre os sabonetes variou pouco, de 1,0131 a 1,0233 g/mL, apesar de as formulações serem diferentes. Apenas um dos sabonetes antissépticos apresentou teor de triclosan abaixo do especificado no rótulo da embalagem. Nas condições deste experimento, o triclosan a 0,5 % (m/v) apresentou efeito bactericida e não bacteriostático sobre os microorganismos *E. coli* e *S. aureus*. A bactéria gram-negativa *E. coli* foi menos

sensível à ação dos sabonetes do que a bactéria gram-positiva *S. aureus* no teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar, o que provavelmente ocorreu devido à diferença entre a parede celular de ambas as bactérias. No teste utilizando voluntários não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os efeitos dos seis sabonetes (1 a 6) para as duas bactérias em estudo, o que indica que o uso de sabonetes líquidos contendo triclosan não é necessário no processo de lavagem das mãos. A capacidade de recuperação das bactérias *E. coli* e *S. aureus* das mãos dos voluntários foi diferente no teste de adesão. A recuperação de *E. coli* atingiu média de 4,36 log UFC/mão, enquanto para *S. aureus* esse valor foi de 5,66 log UFC/mão. Considerando que foram adicionados entre 8-9 log de UFC/mL às mãos dos voluntários e que o procedimento de remoção desses micro-organismos estava muito bem padronizado, pode-se afirmar que *E. coli* foi a espécie mais difícil de ser removida, ou seja, a que aderiu mais fortemente às mãos.

ABSTRACT

SOARES, Monica Porto Maia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Evaluation of the efficiency of soaps containing triclosan on bacterial suspensions of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* applied on the surface of the hands of volunteers.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: José Benício Paes Chaves and Ana Clarissa dos Santos Pires.

Tests for evaluating antiseptic products are essential for proving efficiency of different products on the market as well as being a safe choice in the products used for hygiene procedures in several areas. For this study, we analyzed five brands of antiseptic liquid soaps containing triclosan at a concentration of 0,5 % (m/m) and a neutral liquid soap to assess the real need to use products with antimicrobial activity in industries, hospitals and homes. The following steps were performed: I) evaluation of physico-chemical characteristics of soaps; ii) evaluation of the level of triclosan in the antiseptic soaps; III) evaluation of the bacteriostatic/bactericidal activity of triclosan 0,5 % (m/v) on bacterial suspensions of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*; IV) evaluation of the efficiency of the soaps on bacterial suspensions of *E. coli* and *S. aureus* by testing inhibition of microbial growth by agar diffusion; v) evaluation of the efficiency of the soaps on bacterial suspensions of *E. coli* and *S. aureus* in real conditions, using volunteers, under standard conditions. The values found for both viscosity and for the interfacial tension of the soap differed greatly, ranging from 268 to 793 centistokes and 14,42 to 26,89 mN/m, respectively. This is probably due to their different formulations. The pH varied from 5,95 to 7,07, were only the neutral soap approached the physiological pH of the skin (4,2 to 5,9). The density varied little among soaps, from 1,0131 to 1,0233, despite being different formulations. Only one of the antiseptic soaps presented triclosan content below specified on the label. In this experiment conditions, triclosan 0,5 % (m/v) possessed no bacteriostatic effect, only bactericidal effect on micro-organisms *E. coli* and *S. aureus*. The gram-negative bacterium *E. coli* was less sensitive to the action of soaps than the gram-positive *S. aureus* on the microbial inhibition multiplication test by agar diffusion. This is probably due to the differences in cell wall of both bacteria. In the test using volunteers there was no significant difference ($p > 0,05$) among soaps (1 to 6) for both bacteria under study, indicating that the use of liquid soaps

containing triclosan is not necessary in the process of washing hands. The recoverability of pathogenic micro-organisms from hands of volunteers was different in the adhesion test. The number of *E. coli* reached average 4,36 log CFU/hand while for *S. aureus* that value was 5,66 log CFU/hand. Whereas were added between 8-9 log CFU/mL to the hands of volunteers and that the procedure for removal of these micro-organisms was very well standardized, it can be stated that the *E. coli* was the most difficult to be removed, ie the more strongly adhered to hands.

1. INTRODUÇÃO

Práticas higiênicas eficientes são necessárias em todas as etapas da cadeia produtiva dos alimentos. Nas indústrias, a higienização inclui as etapas de limpeza e sanitização das superfícies de alimentos, dos ambientes de processamento, dos equipamentos, dos utensílios, dos manipuladores e do ar das áreas de processamento (ANDRADE, 2008).

A higienização é dividida em duas etapas: limpeza e sanitização. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e minerais, enquanto a sanitização tem como objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir micro-organismos deterioradores para níveis seguros. Na primeira etapa utilizam-se agentes detergentes e na segunda, agentes sanitizantes.

Durante sua elaboração os alimentos são expostos a uma série de perigos, que podem estar relacionados a práticas inadequadas de processamento e/ou manipulação. A assepsia das mãos de manipuladores é uma das mais importantes etapas que influencia a qualidade microbiológica dos alimentos produzidos, uma vez que as mãos podem apresentar micro-organismos deteriorantes e patogênicos, que precisam ser removidos a fim de evitar sua veiculação aos alimentos, o que prejudica sua vida de prateleira ou oferece riscos potenciais aos consumidores (LITZ, 2007).

A importância da transmissão de micro-organismos que provocam doenças infecciosas pelas mãos de manipuladores foi demonstrada há 120 anos por Semmelweis, mas foi Price, em 1938, quem realmente estudou os tipos de bactérias na pele, classificando-as em "residentes e transientes". Os micro-organismos transientes são representados principalmente pelas

bactérias gram-negativas. Essa microbiota pode conter diferentes micro-organismos patogênicos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*. Essas bactérias são adquiridas por contato com outras pessoas, com objetos do ambiente e de outras áreas, como mucosa nasal e trato gastrointestinal. Geralmente não estão firmemente fixadas na pele, permanecendo nela por curto tempo, sendo facilmente removidas pela lavagem correta das mãos com bons detergentes. Espera-se de um bom detergente que ele apresente características como saponificação, emulsificação, molhagem, penetração, capacidade de diminuir a tensão superficial e capacidade de controlar depósitos minerais, que possua pH próximo ao fisiológico da pele, que tenha baixo custo, que seja seguro para os manipuladores, dentre outras (ANDRADE, 2008). Os micro-organismos residentes, a maioria gram-positiva, encontram-se em equilíbrio dinâmico como parasitas ou saprófitas na pele, embora 10 a 20 % da microbiota esteja concentrada nas reentrâncias, onde os lipídios e o epitélio dificultam a sua remoção. Em muitas pessoas, *Staphylococcus sp.* torna-se parte importante da microbiota residente, e devido à patogenicidade de algumas estirpes e à capacidade de produzir enterotoxinas sua eliminação é de grande interesse nos procedimentos de lavagem das mãos (HARRY'S, 1982; JAWETZ, 2000).

Em serviços de alimentação é importante verificar se a manipulação dos alimentos é realizada com as mãos nuas ou se são utilizados utensílios, papel encerado ou luvas plásticas descartáveis. Também devem ser examinados os funcionários que têm feridas ou outras lesões infectadas, não permitindo que manipulem alimentos. É importante que os funcionários sejam instruídos a lavar suas mãos antes de iniciar o trabalho ou após usar o banheiro, tossir, espirrar, assoar o nariz ou tocar em ferimentos e curativos e, finalmente, deve-se exigir que o estabelecimento seja provido de pias, sabonetes, toalhas e água quente para facilitar a higiene pessoal (BRYAN, 1981).

Tradicionalmente, as medidas de controle incluem implementação de técnicas de lavagem das mãos, detergentes adequados e treinamento e conscientização dos profissionais envolvidos no preparo, no armazenamento e na distribuição de alimentos.

A higienização deve ser avaliada periodicamente, para garantir a produção de alimentos seguros, devendo-se adotar medidas corretivas em casos de desvios desses procedimentos. Atualmente não existe legislação específica

referente às condições higiênicas satisfatórias de manipuladores de alimentos. Os resultados dos testes podem ser comparados com as especificações ou as recomendações de órgãos oficiais ou de entidades científicas conceituadas, como a Associação Americana de Saúde Pública (AASP), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Dependendo dos resultados, mantêm-se as técnicas de higienização adotadas ou são tomadas medidas corretivas (ANDRADE, 2008).

Algumas indústrias podem optar pelo uso de sabonetes antimicrobianos, visando reduzir ainda mais a microbiota nas mãos dos manipuladores. Esses tipos de produtos devem seguir as normas da Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988 (ANVISA/MS), e outras que a complementam, que têm como objetivo definir, classificar, regulamentar os parâmetros para registro e os requisitos para a rotulagem, bem como estabelecer o âmbito de emprego dos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana. Um dos itens dessa norma se refere à comprovação da eficácia dos produtos, ou seja, verificar sua atividade antimicrobiana, teste que é de extrema importância.

1.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a eficiência de sabonetes antissépticos contendo como princípio ativo triclosan, na concentração de 0,5 % (m/m), sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* aplicadas na superfície das mãos de voluntários em laboratório.

1.1.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Avaliar as características físico-químicas dos sabonetes.
- Avaliar o teor de triclosan nos sabonetes antissépticos.
- Avaliar a atividade bacteriostática/bactericida do triclosan a 0,5 % (m/v) sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

- Avaliar a capacidade de adesão dos micro-organismos nas mãos dos voluntários.
- Avaliar a eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* por meio do teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar.
- Avaliar a eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em condições reais, usando voluntários, em condições padronizadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos sanitizantes

Existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de produtos sanitizantes, os quais podem ser classificados em dois grupos: os testes preliminares ou *in vitro* e os testes práticos ou em condições de uso simulado.

A técnica de difusão em ágar é um método *in vitro* que avalia a capacidade de um dado micro-organismo multiplicar-se na presença de um antimicrobiano, aplicado no interior de um cilindro ou disco sobre uma camada de ágar, ou de um orifício padronizado no ágar em uma placa de Petri. O antimicrobiano se difunde no ágar e o micro-organismo cresce a partir do ponto de aplicação, formando um halo de inibição ao seu redor. Esse halo é determinado em milímetros, com o auxílio de um paquímetro (ESMERINO *et al.*, 2005). A aplicação do método de difusão se limita a micro-organismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos (OSTROSKY *et al.*, 2008).

O método é amplamente utilizado para avaliar o efeito antimicrobiano de várias substâncias. Entretanto, ao utilizar esse método vários fatores podem se tornar fontes de erro, como composição, preparação incorreta e espessura do meio de cultura; densidade do inóculo incorreta; uso de *swab* com excesso de caldo para inoculação das placas; temperatura e tempo de incubação inadequados; interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura; leitura

prematura; erro na medida das zonas de inibição; ou o uso de culturas mistas ou contaminadas (ANDRADE, 2008; FERNANDES, 2010).

Nos testes em uso simulado, as condições de processamento na indústria de alimentos são transferidas para o laboratório. Para isso, muitas vezes é necessário desenvolver metodologias e equipamentos para simular as diversas condições dos procedimentos de higienização e dos usos dos sanitizantes. Esses testes são mais trabalhosos e exigem criatividade, e todas as condições devem ser muito bem definidas. Em 1982, Scheusner inoculou *Staphylococcus aureus* e esporos de *Bacillus subtilis* em bandejas de fibra de vidro contendo resíduos de carne, leite e cereais. Após a adesão, as bandejas foram submetidas à sanitização pelos métodos *spray*, de imersão e de enxágue. Em seguida, foram imersas em solução neutralizante, sendo os micro-organismos recuperados com o uso de *swab* e enumerados em meios de cultura apropriados. Segundo o autor, o teste reproduziu as condições reais de higienização e avaliou a resistência do micro-organismo à ação do sanitizante e a eficiência do processo de higienização (ANDRADE, 2008).

Existem vários métodos para testar o efeito de produtos sanitizantes utilizados na higienização das mãos. Um deles envolve a aplicação de culturas puras de micro-organismos em estudo nas mãos de voluntários, com posterior exposição aos produtos sanitizantes. Esse método é útil para testar o desempenho de produtos utilizados rotineiramente na higiene das mãos (ROTTER *et al.*, 2009).

O processo de sanitização das mãos visa prevenir a veiculação de possíveis micro-organismos alteradores ou patogênicos do alimento não processado ou de um ambiente sanitariamente desfavorável, para alimentos em processamento.

Os métodos para avaliação da eficiência de produtos antissépticos utilizados nas mãos devem ser adaptados à realidade da análise, de modo a reproduzir prontamente as condições verdadeiras de uso do produto (CARDOSO, 1993).

2.2. Sabonetes bactericidas

De acordo com a legislação vigente, cosméticos, produtos de higiene e perfumes “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e, ou corrigir odores corporais, e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (BRASIL, 2004).

Existem vários tipos e formas de sabão: em barra, em pó, líquido e em escamas. O sabonete é um tipo de sabão em barra destinado à limpeza corporal, fornecendo ação detergente à água na qual se dissolve durante o uso. É conhecido há mais de 4.000 anos, sendo o produto de higiene mais antigo utilizado pelo homem (BONADEO, 1963; DRAELOS, 1999).

Quimicamente, os sabonetes são constituídos por sais alcalinos de ácidos graxos com propriedades detergentes, sendo resultantes da saponificação entre um produto alcalino com ácidos graxos superiores e seus glicerídeos. De acordo com o produto alcalino empregado, podem-se obter sabonetes sólidos ou líquidos (PEYREFITTE *et al.*, 1998; DRAELOS, 1999; HERNANDEZ *et al.*, 1999).

Os triglicerídeos podem ser de origem animal ou vegetal. Além dos triglicerídeos a serem saponificados, os sabonetes podem conter umectantes, opacificantes, corantes, perfumes, antioxidantes e antissépticos (FONSECA, 1993; PEYREFITTE *et al.*, 1998; HERNANDEZ *et al.*, 1999).

O primeiro sabão líquido antibacteriano foi lançado em 1987 e continha triclosan como agente ativo (LUNDMARK, 1992).

Haas *et al.* (2005) afirmaram que produtos tópicos para as mãos contendo antimicrobianos têm sido cada vez mais utilizados pelo público em geral e que sabões com agentes antimicrobianos são mais eficazes que sabonetes neutros.

2.3. Produtos antissépticos

A palavra *sepsis* vem do grego *seps* e significa pútrido. Refere-se à contaminação por micro-organismos e é o passo inicial para septicemia. Desta forma, antisséptico significa contra infecção (ALCAMO, 2001).

A antissepsia é um processo de desinfecção em que geralmente são empregadas substâncias químicas. Estas substâncias devem destruir ou inibir os micro-organismos nocivos na forma vegetativa, não formadores de esporos em tecidos vivos, pele e mucosas (TORTORA *et al.*, 2005; TRABULSI, 2005).

Em geral os antissépticos são substâncias bactericidas, mas ocasionalmente podem ser bacteriostáticos, com baixa causticidade e hipoalergenicidade, destinados a aplicações em pele e mucosa, podendo estar incorporados em sabões e impregnados em cateteres (BRASIL, 2000; ALCAMO, 2001; IMBERT *et al.*, 2003).

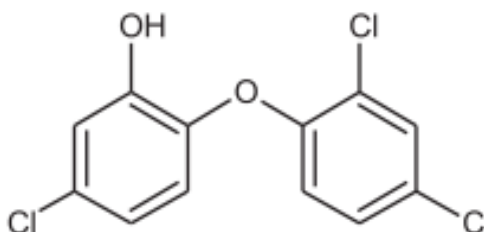
Os antissépticos devem atender aos seguintes requisitos: ter amplo espectro de ação antimicrobiana; ter ação rápida; ter efeito residual cumulativo; ter baixa ou nenhuma toxicidade; não possuir absorção sistêmica; não causar hipersensibilidade, ressecamento, manchas, irritação, corrosão ou fissuras; possuir odor agradável ou ausente; ter boa solubilidade; ter adequada estabilidade química, para impedir sua decomposição por efeito da luz e calor; e ser de baixo custo e de veiculação funcional em dispensadores ou embalagens de pronto uso (BRASIL, 2008).

O uso de sabonetes antissépticos na higienização das mãos de manipuladores de alimentos tem gerado grande interesse, devido à sua capacidade de reduzir a população microbiana nas mãos.

2.4. Triclosan

Triclosan (Figura 1) é um antimicrobiano adicionado a muitos produtos de consumo para reduzir ou evitar a multiplicação bacteriana. Pode ser usado em produtos como roupas, utensílios de cozinha, móveis e brinquedos. Também pode ser adicionado a sabões antibacterianos, a cremes dentais e a alguns cosméticos - produtos regulados pela *Food and Drug Administration* (FDA) EUA (FDA, 2010). O triclosan tem sido utilizado para controlar a propagação de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente à metilina em

ambientes clínicos (BRADY *et al.*, 1990; ZAFAR *et al.*, 1995; JONES *et al.*, 2000; COIA *et al.*, 2006); em procedimentos pré-operatórios, para limpeza da pele (BRADY *et al.*, 1990; COIA *et al.*, 2006); e em suturas cirúrgicas, para prevenir a contaminação do ferimento (MING *et al.*, 2007).



Fonte: BESTER (2005); LINDSTRÖM *et al.* (2002)

Figura 1 - Estrutura molecular do triclosan (2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenil-éter).

Sua ação antimicrobiana está relacionada à sua capacidade de bloquear a síntese de ácidos graxos por meio de inibição enzimática, impedindo a multiplicação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras. Estudos têm indicado que o mecanismo de ação do triclosan sobre os micro-organismos é baseado na inibição competitiva do enoil-acil transportador da proteína redutase, um componente na via de biossíntese de lipídeos (VERMEIREN *et al.*, 2002).

Garcia-Godoy *et al.* (1990) realizaram um estudo com 108 adultos do sexo masculino e feminino, durante sete meses, para testar o efeito de um creme dental contendo 0,3 % de triclosan e 2 % de um copolímero de ácido maleico e metoxietileno na formação da placa e da gengivite, comparando-o com um dentífrico placebo. Os autores concluíram que o uso do dentífrico contendo triclosan e copolímero reduziu a formação de depósitos de placa e gengivite supragengival a um grau muito significativo, sem quaisquer manchas extrínsecas observadas, em comparação com o dentífrico placebo.

Zafar *et al.* (1995) estudaram o uso de 0,3 % de triclosan (Bacti-Stat) para erradicar uma epidemia de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em um berçário neonatal. Uma vez estabelecido, esse micro-organismo tem se revelado difícil de erradicar, apesar das medidas intensivas de controle de infecção. O estudo descreve a infecção nosocomial por MRSA de 22 crianças do sexo masculino em um berçário neonatal durante um período

de sete meses e os procedimentos de controle da infecção utilizando 0,3 % de triclosan, que efetivamente controlou o surto.

Um estudo recente realizado por pesquisadores americanos mostrou que o triclosan pode ser mais nocivo do que benéfico. Constatou-se que ele afetou a função cardíaca dos ratos pesquisados, enquanto os pequenos peixes mostraram redução na capacidade de nadar depois de sete dias de exposição aos agentes bactericidas. Os animais foram submetidos a doses de triclosan similares às que são expostos seres humanos no cotidiano (CHEREDNICHENKO *et al.*, 2012).

Em relação à toxicidade, Paul *et al.* (2012) estudaram o mecanismo de ação pelo qual o triclosan diminui a concentração do hormônio T4 (tiroxina) circulante. Fêmeas de ratos Long-Evans prenhas foram tratadas com triclosan, e após análises os autores observaram diminuição de 30 % no hormônio T4, enquanto houve aumento na atividade hepática. Esses resultados apoiam a hipótese de que o triclosan é responsável pelo desenvolvimento de hipotiroxinemia, resultante do aumento do catabolismo hepático.

Bedoux *et al.* (2012) estudaram a ocorrência, toxicidade e degradação do triclosan no meio ambiente. Por estar presente em diversos produtos, como sabonetes, cremes dentais, desodorantes, entre outros, o triclosan chega às estações de tratamento de esgoto, onde pode ser transformado em compostos potencialmente mais tóxicos após a cloração, metilação ou foto-oxidação. Os autores acreditam que o uso excessivo do triclosan pode aumentar o risco de aparecerem bactérias resistentes a ele, além da seleção de estirpes resistentes.

A exposição de seres humanos ao triclosan pode ocorrer pela ingestão de pasta de dente, antissépticos bucais e outros dentifrícios, mediante o contato da pele com produtos de consumo contendo a substância ou por meio da ingestão de alimentos e água potável contaminados. Outra forma de exposição é por meio da inalação e do contato com a pele em locais onde o produto é produzido ou usado (HSDB, 2004).

De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA), o triclosan não é conhecido por ser perigoso para seres humanos. Apesar de alguns estudos demonstrarem o efeito toxicológico do triclosan em animais, esses resultados nem sempre podem prever seus efeitos em seres humanos. No momento, o

FDA afirma não ter provas suficientes de segurança para recomendar ao consumidor não utilizar produtos contendo triclosan (FDA, 2010).

Em 1998, na União Europeia, a empresa Ciba Inc. entrou com um pedido para utilização do triclosan como aditivo na produção de materiais e objetos de plástico destinados a entrar em contato com alimentos. Ela conseguiu que ele fosse incluído na lista provisória de aditivos. Em 2004, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos concluiu que a utilização solicitada do triclosan poderia ser aceita desde que a substância não migrasse para os alimentos em nível superior a 5 mg/kg de alimento. Em 2009, a empresa Ciba Inc. informou à Comissão sua decisão de retirar o pedido; a empresa deixou de considerar adequada a utilização da substância em materiais plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Assim, em 2010 o triclosan foi removido da lista provisória de aditivos. Foi introduzido um período de transição para a comercialização de materiais e objetos de plástico que continham essa substância. Os materiais e objetos de plástico fabricados com triclosan e colocados no mercado antes de 1 de novembro de 2010 poderiam continuar a ser comercializados até 1 de novembro de 2011, nas condições previstas na legislação nacional (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

2.5. Micro-organismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Entre os micro-organismos comumente encontrados nas mãos de manipuladores destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

E. coli está incluída no grupo dos coliformes totais e no grupo dos coliformes termotolerantes. Seu habitat é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora possa ser introduzido nos alimentos por fontes não fecais. São bastonetes gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose dentro de 48 h (JAY, 2005).

Com base nas características das doenças, no efeito em certas culturas de células e nos grupos sorológicos, são reconhecidos cinco grupos sorológicos de *E. coli* virulentos: *E. coli* enteroagregativas (EaggEC); *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), também conhecida como O157:H7; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* enteropatogênica (EPEC); e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (JAY, 2005).

Em 2006 ocorreu um surto causado por *E. coli* O157:H7 em espinafre

nos Estados Unidos, afetando vários estados. No total, 205 pessoas foram infectadas e três morreram (FDA, 2007).

Em 22 de maio de 2011, a Alemanha notificou o Sistema de Alerta Antecipado e Resposta da Comunidade Europeia (EWRS), relatando um aumento significativo no número de pacientes com diarreia sanguinolenta causada por uma cepa rara de *E. coli*. Após investigações epidemiológicas e da cadeia produtiva, concluiu-se que a origem dos surtos estava em brotos, incluindo feno-grego, feijão, lentilhas e alfafa, produzidos em uma fazenda na Baixa Saxônia, ao sul de Hamburgo (BRASIL, 2011a, 2011b).

S. aureus geralmente habita a mucosa nasal, a partir da qual pode contaminar as mãos, portanto qualquer alimento manipulado pode ser contaminado (TORTORA, 2005). Esse micro-organismo é um dos mais frequentes patógenos de origem alimentar encontrado em plantas de processamento de alimentos, podendo aderir-se na superfície de equipamentos e formar biofilme (PASTORIZA *et al.*, 2002).

Essa bactéria se apresenta como cocos gram-positivos, imóveis, medindo de 0,5 a 1,0 μm , agrupando-se em massas irregulares que lembram cachos de uvas. São anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de multiplicação em torno de 30 a 37 °C (WILLIAMS & WILKINS, 1994). Pode multiplicar-se em concentrações de 7 a 10 % de NaCl, e algumas linhagens podem crescer em até 20 %. A concentração máxima que permite multiplicação depende de outros parâmetros, como temperatura, pH, atividade de água (a_w) e potencial de oxirredução (Eh). Considerando o pH, pode multiplicar-se entre 4,0 e 9,8, mas sua faixa ótima está entre 6,0 e 7,0. Em relação a a_w , os estafilococos são os únicos organismos capazes de crescer em valores menores que outras bactérias não halofílicas. O crescimento foi demonstrado com valores abaixo de 0,83 sob condições ideais, embora 0,86 seja normalmente reconhecido como valor mínimo de a_w para multiplicação (JAY, 2005).

S. aureus produz várias toxinas que contribuem para a patogenicidade da bactéria, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos. Ele produz a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico, uma doença grave caracterizada por febre alta e vômitos, algumas vezes ocasionando a morte. Produz também uma enterotoxina que causa vômitos e náusea quando

ingerida; esta é uma das causas mais comuns da intoxicação alimentar (TORTORA, 2005).

Em março de 1994 ocorreu um surto envolvendo *S. aureus* na cidade de Santa Bárbara D'Oeste - SP (Brasil). O alimento envolvido foi um bolo recheado e confeitado (PASSOS & KUAYE, 1996).

Entre dezembro de 2001 e abril de 2003 foram relatados oito surtos envolvendo *S. aureus* na região de São José do Rio Preto – SP. Produtos de confeitaria, como doces e salgados, foram os alimentos implicados. Segundo os inquéritos epidemiológicos, o número total de indivíduos afetados foi 52 e de hospitalizados, sete (PERESI *et al.*, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica da Faminas - Faculdade de Minas, Muriaé – Minas Gerias e no Laboratório Ecolyzer, São Paulo – São Paulo.

3.1. Produtos testados

Duas amostras (A e B) do mesmo lote de cada uma das seis marcas de sabonetes líquidos foram testadas. As amostras foram coletadas imediatamente antes da realização de cada análise, exceto para as análises de viscosidade e avaliação do teor de triclosan nos sabonetes antissépticos, em que as amostras foram coletadas e enviadas para laboratórios localizados nas cidades de Muriaé e São Paulo, respectivamente, para posterior análise.

Os sabonetes antissépticos de todas as cinco marcas (1 a 5) possuem como princípio ativo o triclosan na concentração de 0,5 % (m/m), conforme declaração de rótulo, enquanto o neutro (6) é ausente do princípio ativo.

As formulações de todos os sabonetes líquidos estudados são diferentes. Na Tabela 1, é apresentada a composição dos sabonetes conforme informações dos fabricantes. A concentração das matérias-primas utilizadas não foi informada.

Tabela 1 – Composição dos sabonetes líquidos e suas respectivas funções.

1	2	3	4	5	6	Função
Água	Água	Água	Água	Água	Água	Veículo
Corante	Corante	-	Corante	-	-	Cor
Cocoamido Propil Betaína	-	-	-	-	-	Tensoativo Anfótero
-	Cocoamido DEA	Cocoamido DEA	Cocoamido DEA	Cocoamido DEA e MEA	Cocoamido DEA	Tensoativo Nao-ionico
Triclosan	Triclosan	Triclosan	Triclosan	Triclosan	-	Antimicrobiano
Glicerina	-	-	-	-	Glicerina	Umectante/Solvente
Lauril Sulfato de Sódio	Lauril Sulfato de Sódio	Lauril Sulfato de Sódio	Lauril Sulfato de Sódio	Lauril Sulfato de Sódio	Lauril Sulfato de Sódio	Tensoativo Anionico
Tetrasódio EDTA	Tetrasódio EDTA	Disódio EDTA	Disódio EDTA	Disódio EDTA	Disódio EDTA	Quelante
Ácido Cítrico	Ácido Cítrico	-	Ácido Cítrico	Ácido Cítrico	Ácido Cítrico	Corretor de pH
Cloreto de Sódio	Cloreto de Sódio	Cloreto de Sódio	Cloreto de Sódio	Cloreto de Sódio	Cloreto de Sódio	Ajustador de Viscosidade
-	Álcool	-	-	-	-	Solvente/Conservante
-	-	Propileno Glicol	Propileno Glicol	Propileno Glicol	-	Umectante
-	-	-	Hidróxido de Sódio	-	-	Corretor de pH
-	-	-	<i>Foeniculum Vulgare Parfum</i>	-	-	Fragrância
-	-	Glicol Estearato	-	-	-	Estabilizante/Opacificante
-	-	-	-	Glicol Distearato	-	Espessante/Doador de Viscosidade
-	-	Conservantes	-	-	Conservantes	Antimicrobiano
-	-	-	-	-	Citrato de Sódio	Corretor de pH
-	-	Fosfato de Sódio	-	-	-	Estabilizante
-	-	Ácido Fosfórico	-	-	-	Corretor de pH

- não contém

3.2. Análises físico-químicas dos sabonetes

3.2.1. Viscosidade dos sabonetes

A análise de viscosidade foi feita no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica da Faminas - Faculdade de Minas, Muriaé – Minas Gérias. Duas amostras de 200 mL cada de cada sabonete foi enviada ao laboratório.

A viscosidade foi medida em um viscosímetro de efluxo, modelo tipo Ford de aço inoxidável com bicos número 4 e 5 da marca Spencer®, comercializado pela Hipperquímica, no qual a viscosidade está relacionada com o tempo de esvaziamento de um copo de volume conhecido que tem um orifício calibrado na sua base.

Primeiramente selecionou-se o orifício adequado. A diretriz para seleção do orifício foi a obtenção de um tempo de escoamento da amostra próximo a 60 s. Deve-se ter um tempo de escoamento entre 20 e 100 s para a amostra a 25 °C, e a amostra deve ser perfeitamente homogeneizada. No momento do ensaio o viscosímetro e o material a ser ensaiado devem estar a $25 \pm 0,1$ °C. O orifício foi fechado com lâmina de vidro plana e o copo preenchido lentamente até o nível mais elevado, evitando a formação de bolhas. A amostra foi nivelada no copo, utilizando placa de vidro plana. Retirou-se a lâmina do orifício e a amostra ficou retida dentro do copo. Ao remover a placa de vidro plana, a amostra começou a escoar pelo orifício e o cronômetro foi acionado. Quando ocorreu a primeira interrupção do fluxo de escoamento parou-se o cronômetro, anotando o tempo transcorrido em segundos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Os orifícios de número 2, 3 e 4 são utilizados para medir líquidos de baixa viscosidade e os de número 5, 6, 7 e 8 para líquidos de viscosidade mais elevada. A escolha do orifício é de acordo com o tempo de escoamento da amostra, que deve ser entre 20 e 100 s. Com o tempo de escoamento é possível obter a viscosidade cinemática, em centistokes, utilizando a equação correspondente ao número do orifício (Tabela 2). Os cálculos da viscosidade cinemática em centistokes foram obtidos a partir das equações correspondentes aos orifícios 4 e 5 (ORTOFARMA, 2013).

Tabela 2 – Equações para o cálculo da viscosidade cinemática (V) em centistokes.

Orifício	Equação
1	$V = 0,49 (t - 35)$
2	$V = 1,44 (t - 18)$
3	$V = 2,31 (t - 6,58)$
4	$V = 3,85 (t - 4,49)$
5	$V = 12,1 (t - 2)$

t = tempo de escoamento em segundos

Fonte: ORTOFARMA (2013)

Os valores da viscosidade de cada amostra foram determinados pela média dos valores obtidos, expressa em centistokes, unidade que caracteriza a maioria dos líquidos usuais em Farmácia e Química (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Os resultados foram analisados de forma descritiva.

3.2.2. pH dos sabonetes

A determinação do pH foi realizada a 20 °C, em uma dispersão aquosa a 10 % (m/v). Foram pesados 3 g de amostra de cada sabonete, que foi diluída em 30 mL de água recém-destilada. Utilizou-se o medidor de pH da marca Digimed, modelo DMPH-2, e a diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo foi avaliada (BRASIL, 2004). O eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa. A primeira determinação forneceu valores variáveis, havendo necessidade de realizar novas leituras. Os valores encontrados posteriormente não variaram mais do que 0,05 de unidade em três leituras sucessivas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Os valores de pH foram determinados pela média dos valores obtidos e os resultados foram analisados de forma descritiva.

3.2.3. Densidade dos sabonetes

A densidade relativa é a relação entre a densidade absoluta da amostra e a densidade absoluta de uma substância usada como padrão. Quando a água é utilizada como substância-padrão, a densidade determinada é a densidade específica (BRASIL, 2008).

A densidade dos sabonetes foi determinada pelo método do picnômetro de vidro, à temperatura de 20 °C.

A determinação da densidade específica foi realizada em picnômetro de vidro de 25 mL, acoplado com termômetro. Pesou-se o picnômetro vazio (M_0), com água purificada (M_1) e com a amostra (M_2), evitando a introdução de bolhas. Foram utilizados 25 mL de amostra de cada sabonete, quantidade suficiente para preencher o picnômetro de vidro. Entre cada pesagem é importante que o picnômetro seja limpo e seco (BRASIL, 2008). A densidade foi obtida a partir da Equação 1:

$$d = (M_2 - M_0) / (M_1 - M_0) \quad (\text{Equação 1})$$

em que

d = densidade;

M_0 = massa do picnômetro vazio, em gramas;

M_1 = massa do picnômetro com água purificada, em gramas; e

M_2 = massa do picnômetro com a amostra, em gramas.

Os resultados foram expressos em g/mL. Os valores da densidade foram determinados pela média dos valores obtidos e os resultados foram analisados de forma descritiva.

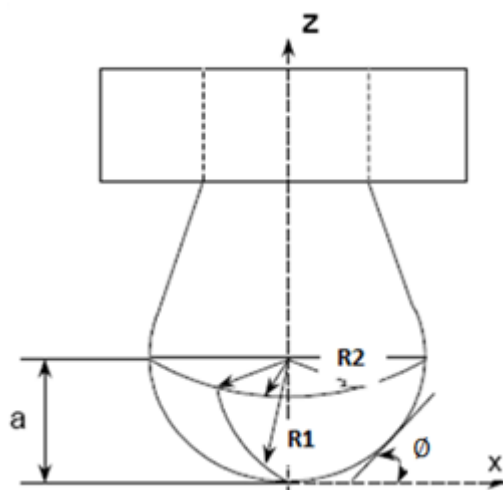
3.2.4. Tensão interfacial dos sabonetes

A tensão interfacial das amostras foi medida com o uso de um goniômetro (*Easy Drop, Krüss®*). Foi efetuada uma medida a cada segundo, durante 10 s, da tensão interfacial pela técnica da gota pendente a 20°C (ARASHIRO & DEMARQUETTE, 1999). Para a análise foi utilizado 1 mL de amostra de cada sabonete.

Primeiro a agulha selecionada foi lavada com água destilada. Após a lavagem, o sabonete foi sugado pela agulha e depois descartado. Repetiu-se o procedimento e, com o auxílio de um *software*, uma gota do sabonete saiu da agulha até atingir seu tamanho máximo, sem se soltar. Nesse ponto o aparelho mediu a tensão interfacial. Após medir a tensão o sabonete foi descartado, foi

feita outra lavagem da agulha e o procedimento foi repetido para as outras amostras.

O método da gota pendente (*pendat drop*) consiste na determinação do perfil de uma gota pendente de um líquido suspenso em outro líquido mais denso, ou de um líquido em ar. Quando em equilíbrio mecânico a gota exibe um perfil resultante do balanço entre a força da gravidade e as forças de superfície, como pode ser visualizado na Figura 2.



Fonte: MORITA (2000)

Figura 2 - Figura esquemática de uma gota pendente.

em que a é o raio de curvatura da gota no ápice, $R1$ é o raio de curvatura no plano da figura, $R2$ é o raio de curvatura no plano perpendicular à Figura 2 e Φ é o ângulo entre o raio de curvatura $R1$ e o eixo z (MORITA, 2000).

Esse equilíbrio pode ser descrito por meio das Equações 2 a 4 (equações de Bashforth e Addams):

$$\frac{d\phi}{dS} = \frac{2}{B} - Z - \frac{\text{sen } \phi}{X} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\frac{dX}{dS} = \cos \phi \quad (\text{Equação 3})$$

$$\frac{dZ}{dS} = \text{sen } \phi \quad (\text{Equação 4})$$

em que X e Z correspondem às variáveis x e z , reduzidas à forma adimensional, dividindo-se as variáveis pelo raio de curvatura no ápice da gota (Figura 2); S corresponde ao comprimento do arco no ponto (x,y) , também na forma adimensional; e B é definido pela Equação 5:

$$B = \frac{\Delta\rho \cdot g \cdot a^2}{\gamma} \quad (\text{Equação 5})$$

em que $\Delta\rho$ é a diferença de densidade entre os meios 1 e 2; g é a aceleração da gravidade; e a é o raio de curvatura no ápice da gota (MORITA, 2000).

A fim de calcular a tensão superficial ou interfacial, o primeiro valor de B é fornecido pelo usuário. Esse valor pode ser alternativamente fornecido pela equação de Huh e Reed. A partir desse momento o valor de B é iterado. As equações diferenciais de Bashforth e Addams (Equações 2 a 4) são resolvidas para esse valor de B , gerando assim o perfil teórico. Em seguida, é feita a comparação entre o perfil da gota teórica e o perfil da gota experimental. O valor de B é incrementado e são feitas novamente a geração e comparação da gota teórica. Deste modo, o valor de B , que conduz ao melhor ajuste da gota experimental com a gota teórica, é determinado, sendo então utilizado para calcular o valor da tensão superficial ou interfacial por meio da Equação 5. O parâmetro B também pode ser determinado, baseando-se na equação empírica de Huh e Reed (Equação 6) (MORITA, 2000):

$$B = \sqrt{\exp(-6,70905 + 15,30025 \times S - 16,44709 \times S^2 + 9,92425 \times S^3 - 2,585035 \times S^4)} \quad (\text{Equação 6})$$

Os valores da tensão interfacial foram determinados pela média dos valores obtidos e os resultados foram expressos em mN/m. Os resultados foram analisados de forma descritiva.

3.3. Teor de triclosan nos sabonetes antissépticos

As análises para verificar se o teor de triclosan nos sabonetes está de acordo com os rótulos das embalagens foram feitas no Laboratório Ecolyzer

Ltda., na cidade de São Paulo – São Paulo. Foram enviados ao laboratório 100 g de amostra de cada sabonete.

A metodologia utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com o relatório de Validação nº 13 – Determinação do Teor de Triclosan, “Laboratórios Ecolyzer Ltda.”.

3.4. Determinação da atividade bacteriostática/bactericida do triclosan a 0,5 % (m/v) sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Para determinar se o triclosan a 0,5 % (m/v) possui efeito bacteriostático ou bactericida sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foi utilizada uma solução com triclosan a 1 % (m/v), tendo como solvente o propilenoglicol, com o uso da técnica de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)*, que é o órgão responsável pela padronização de técnicas laboratoriais nos Estados Unidos (NCCLS, 2003), com modificações.

O teste foi realizado separadamente para os dois micro-organismos estudados. Ambas as bactérias foram ativadas por duas vezes consecutivas em caldo BHI, incubando a 35 ± 2 °C por 24 h. Para obter colônias isoladas, foram feitas estrias em placas de Petri contendo *Plate Count Agar* (PCA), que foram então incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O inóculo foi preparado em solução salina 0,85 % (m/v), fazendo-se uma suspensão direta das colônias selecionadas da placa de PCA. A suspensão foi ajustada para que sua turbidez coincidissem com a da solução-padrão de McFarland 0,5, o que resultou em uma suspensão contendo, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Em tubos de ensaio com 5 mL de caldo Muller-Hinton cada, foram adicionados 5 mL de uma solução contendo triclosan a 1 % (m/v) e 50 µL da suspensão contendo os micro-organismos, obtendo-se uma concentração microbiana final de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. Ao mesmo tempo foi preparado um controle negativo. Após transferir a solução contendo triclosan a 1 % (m/v) para o tubo, sua concentração foi diluída para 0,5 % (m/v), mesma concentração encontrada nos sabonetes antissépticos. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e posteriormente incubados a 35 ± 2 °C por 20 h. Após o período de incubação, se os tubos ficam turvos significa que, nas

condições do experimento, o triclosan a 0,5 % (m/v) não apresenta efeito bacteriostático nem bactericida. Quando não turvou, a solução contida nos tubos foi transferida para tubos de centrífuga Eppendorf AG, Modelo 5804R, e centrifugados a 4.300 g durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado três vezes com 1 mL de solução salina a 0,85 % (m/v). A cada lavagem os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados novamente. Após a última lavagem a solução foi plaqueada em meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA) e incubada a 35 ± 2 °C por 24 h. Se houver multiplicação significa que o triclosan a 0,5 % (m/v) foi bacteriostático, caso contrário pode-se inferir que este antimicrobiano possui efeito bactericida, nas condições do experimento.

O teste foi realizado em três repetições. A cada repetição a solução com triclosan a 1 % (m/v) foi preparada, os micro-organismos foram ativados e foram feitas estrias em placas de Petri. O resultado, analisado de forma descritiva, foi expresso em ausência ou presença de colônias nas placas.

3.5. Avaliação da eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

3.5.1. Teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em Agar

Os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram ativados por duas vezes consecutivas em caldo BHI, separadamente, e incubados a 35 ± 2 °C por 24 h. Para obter colônias isoladas, foram feitas estrias em placas de Petri contendo o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), as quais foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O inóculo foi preparado fazendo-se uma suspensão direta das colônias selecionadas da placa de PCA em solução salina 0,85 % (m/v). A suspensão foi ajustada para que sua turbidez coincidissem com a da solução-padrão de McFarland 0,5, o que resultou em uma suspensão contendo, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Para inoculação das placas, um *swab* de algodão foi saturado com a suspensão bacteriana, o excesso foi removido e a suspensão foi inoculada sobre a superfície esterilizada de uma placa contendo ágar Muller-Hinton, de forma a obter um inóculo uniformemente espalhado sobre toda a superfície do ágar. Com o auxílio de moldes plásticos previamente esterilizados, o ágar foi

perfurado para obter poços de tamanhos padronizados. Em seguida, 30 µL de amostra de cada sabonete foram adicionados aos poços. As placas ficaram incubadas durante 12 h a uma temperatura mais baixa (10 °C), antes de serem incubadas na temperatura ótima dos micro-organismos, para permitir a difusão do antimicrobiano. Em seguida, elas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C.

A leitura foi feita com o auxílio de um paquímetro, medindo o diâmetro dos halos de inibição, incluindo o diâmetro do disco. O teste foi realizado três vezes. A cada dia de teste os micro-organismos foram ativados e foram feitas estrias em placas contendo o meio de cultura PCA. O resultado do teste foi analisado de forma descritiva.

3.5.2. Avaliação da eficiência dos sabonetes líquidos sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, aplicadas na superfície das mãos de voluntários

Para avaliar a eficiência dos sabonetes antissépticos sobre suspensões bacterianas aplicadas na superfície das mãos de voluntários, foram utilizadas culturas puras de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 11229.

A partir de colônias mantidas à temperatura de -80 °C em tubo Eppendorf contendo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol (80:20), foram preparadas suspensões para o uso no experimento. As suspensões de células vegetativas foram produzidas em duas repicagens consecutivas em caldo BHI, por incubação a 35 ± 2 °C por 24 h.

As suspensões foram aplicadas na superfície das mãos de voluntários, para obtenção do número final de micro-organismos sobreviventes após adoção dos procedimentos de limpeza com os sabonetes testados.

Para a análise, as mãos dos voluntários foram previamente lavadas, seguindo-se os critérios padronizados descritos a seguir. Uma alíquota de 0,25 mL de caldo BHI contendo os micro-organismos foi aplicada na superfície de ambas as mãos dos voluntários que, friccionando-as durante 10 s, espalharam a suspensão de micro-organismos por toda a superfície das mãos, deixando secar por 20 s. O contato micro-organismo/voluntário e sabonete/voluntário foi apenas epidérmico.

Padronização da limpeza das mãos:

- pré-lavagem em água corrente;
- lavagem das mãos por 30 s com sabonete neutro;
- enxágue em água corrente (três vezes);
- enxágue final com água destilada esterilizada; e
- secagem natural das mãos com agitação.

Uma mão higienizada geralmente possui contagens inferiores a 10^4 UFC/mão para mesófilos aeróbios, 10^2 UFC/mão para *Staphylococcus aureus* e 10^2 UFC/mão para *Escherichia coli* (ANDRADE, 2005), valores próximos àqueles encontrados nas mãos dos voluntários após o procedimento de lavagem das mãos.

Os sabonetes foram testados após a aplicação da suspensão de micro-organismos na superfície das mãos dos voluntários. O volume do sabonete a ser depositado na superfície das mãos foi de 2,0 mL. O contato dos sabonetes com os micro-organismos ocorreu por meio da fricção de uma mão na outra, e na região dos dedos, contendo o sabonete, por 2 min, seguida de enxágue em água corrente.

Para a coleta das amostras, utilizou-se um *swab* esterilizado com haste de 12 cm de comprimento e algodão hidrófilo de 2,5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro. O *swab* foi umedecido em solução-tampão fosfato e o excesso removido, friccionando o algodão na lateral do tubo de ensaio. Para a coleta da amostra partiu-se do punho até a extremidade de cada um dos dedos, num total de três vezes (ida e volta). Partindo-se do mesmo ponto do punho, o *swab* foi passado por entre os dedos e retornado à posição de partida do punho (Figura 3). Os micro-organismos coletados foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de tampão fosfato, contendo 0,02 % (m/v) de carbonato de cálcio mais 2 % (m/v) de Tween 80 mais 0,05 % (m/v) de bissulfito de sódio, para inativar possíveis resíduos de antimicrobianos presentes nos sabonetes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Em seguida, diluições adequadas foram plaqueadas para meios de cultura, com posterior incubação a 35 ± 2 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mão (UFC/mão) (ANDRADE, 2008).

Foram utilizados 24 voluntários, sendo 12 para o estudo dos sabonetes sobre o micro-organismo *E. coli* e 12 para o estudo dos sabonetes sobre o micro-organismo *S. aureus*. A distribuição das amostras por voluntário foi

aleatória. A cada coleta, cada amostra do experimento foi testada por dois voluntários.

A eficiência foi avaliada ao comparar a contagem microbiana após o uso dos sabonetes, ou seja, medindo-se a capacidade de cada um dos produtos testados reduzir a suspensão de micro-organismos aplicada na superfície das mãos dos voluntários.



Fonte: Andrade (2008)

Figura 3 - Metodologia do swab para coleta em superfícies de mãos.

O experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado desbalanceado, com dez repetições (5 coletas x 2 pessoas/coleta).

3.6. Adesão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* nas mãos de voluntários

Para avaliar a adesão de suspensões bacterianas nas mãos de manipuladores foram utilizadas culturas puras de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 11229.

A partir de colônias mantidas à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubo Eppendorf contendo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol (80:20), foram preparadas suspensões para o uso no experimento. As suspensões de células vegetativas foram produzidas em duas repicagens consecutivas em caldo BHI, por incubação a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 h.

As suspensões foram aplicadas na superfície das mãos de voluntários, para obtenção do número de micro-organismos.

Para a análise, as mãos dos voluntários foram previamente lavadas, seguindo-se os critérios padronizados descritos a seguir. Uma alíquota de 0,25 mL de caldo BHI contendo os micro-organismos foi aplicada na superfície de ambas as mãos dos voluntários, que, por meio de fricção durante 10 s, espalharam a suspensão de micro-organismos por toda a superfície das mãos, deixando secar por 20 s. O contato micro-organismo/voluntário foi apenas epidérmico.

Padronização da limpeza das mãos:

- pré-lavagem em água corrente;
- lavagem das mãos por 30 s com sabonete neutro;
- enxágue em água corrente (três vezes);
- enxágue final com água destilada esterilizada; e
- secagem natural das mãos com agitação.

Uma mão higienizada geralmente possui contagens inferiores a 10^4 UFC/mão para mesófilos aeróbios, 10^2 UFC/mão para *Staphylococcus aureus* e 10^2 UFC/mão para *Escherichia coli* (ANDRADE, 2005), valores próximos àqueles encontrados nas mãos dos voluntários após o procedimento de lavagem das mãos.

Para a coleta das amostras, utilizou-se um *swab* esterilizado com haste de 12 cm de comprimento e algodão hidrófilo de 2,5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro. O *swab* foi umedecido em solução-tampão fosfato e o excesso foi removido, friccionando o algodão na lateral do tubo de ensaio. Para a coleta

da amostra partiu-se do punho até a extremidade de cada um dos dedos, num total de três vezes (ida e volta). Partindo-se do mesmo ponto do punho, o *swab* foi passado por entre os dedos e retornado à posição de partida do punho (Figura 2). Os micro-organismos coletados foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de tampão-fosfato. Em seguida, diluições adequadas foram plaqueadas para meios de cultura, com posterior incubação a 35 ± 2 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mão (UFC/mão) (ANDRADE, 2008).

A adesão foi avaliada mediante a comparação da contagem microbiana entre as duas bactérias, ou seja, medindo-se a capacidade de cada um dos micro-organismos testados aderir na superfície das mãos dos voluntários. O resultado do teste foi analisado de forma descritiva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análises físico-químicas dos sabonetes

Na Tabela 3 estão os resultados para os testes de viscosidade, pH, densidade e tensão interfacial dos sabonetes líquidos utilizados na discussão dos resultados dos experimentos.

Tabela 3 - Viscosidade a 25 °C (centistokes), pH a 20 °C, densidade a 20 °C (g/mL) e tensão interfacial a 20 °C (mN/m) dos sabonetes líquidos.

Produtos	Viscosidade	pH	Densidade	Tensão Interfacial
1	775,96	6,20	1,0148	14,42
2	611,87	6,78	1,0223	23,94
3	728,44	6,55	1,0212	26,7
4	793,44	7,07	1,0131	26,89
5	268,06	6,43	1,0233	26,59
6	355,46	5,95	1,0175	20,47

4.1.1. Viscosidade dos sabonetes

A viscosidade dos sabonetes variou de 268,06 a 793,44 centistokes (Tabela 3). A diferença entre esses valores pode ser devido à composição dos sabonetes testados, pois suas formulações são diferentes. A viscosidade de todos os sabonetes foi determinada na mesma temperatura. Entre os componentes das formulações dos sabonetes testados que aumentam a viscosidade está o cloreto de sódio, assim como os agentes espessantes

dietanolamida de ácido graxo de coco, monoetanolamida de ácido graxo de coco, cocoamido propil betaína e glicol distearato (Tabela 1).

Os agentes espessantes são substâncias que aumentam a espessura da porção aquosa ou oleosa de produtos cosméticos, aumentando a viscosidade do produto. Os principais são as amidas, as betaínas, o oleato de decila, o álcool laurílico etoxilado e os sais orgânicos (cloreto de sódio ou amônio), derivados da celulose, as gomas e os polímeros carboxivinílicos (KEDE; SABATOVICH, 2004).

O cloreto de sódio, principal constituinte do sal de cozinha, é um sólido iônico constituído por íons positivos e negativos. Quando diluído em água, os íons separam-se na solução, onde se encontram rodeados pelas moléculas do solvente. Ele é capaz de aumentar a viscosidade do produto por meio da interação com agentes tensoativos empregados (COUTO, 2007).

A grande importância da reologia na área farmacêutica deve-se à necessidade de os produtos apresentarem consistência e suavidade aceitáveis pelos consumidores. A reologia está diretamente relacionada com a formulação do produto.

As propriedades reológicas de um produto influenciam a escolha do equipamento a ser usado no seu processamento. O desenvolvimento do equipamento a ser usado sem a correta apreciação das propriedades reológicas do produto resulta em um produto indesejado, pelo menos em termos de suas propriedades de fluxo.

Os estudos reológicos são muito importantes para o controle de qualidade em várias áreas, por exemplo, cosméticos e higiene pessoal: o modo como um creme se espalha, a duração da fixação, a aplicação, distribuição e eficácia do produto, o tempo de escoamento do recipiente onde o produto é armazenado e qual a temperatura de armazenamento, geralmente especificado no rótulo do produto. Como exemplos têm-se creme dental, gel para cabelo, shampoo, cremes hidratantes, sabonetes líquidos e batons (PEREIRA, 2005).

Observou-se que os sabonetes com menor viscosidade eram mais fáceis de espalhar nas mãos e também mais fáceis de serem removidos no momento do enxágue.

4.1.2. pH dos sabonetes

As formulações apresentaram valores de pH entre 5,95 e 7,07 (Tabela 3). Dentre elas, apenas o sabonete neutro se aproximou do pH fisiológico da pele, que varia de 4,2 a 5,9, dependendo da área do corpo aferida (KORTING & BRAUN-FALCO, 1996). Preconiza-se o uso de sabonetes com pH ligeiramente ácido, próximo ao pH fisiológico da pele, uma vez que não interferem na microbiota cutânea e são menos irritantes que os alcalinos (SCHMID & KORTING, 1995; EFFENDY & MAIBACH, 1996; KORTING *et al.*, 1990).

Alguns micro-organismos como o *Staphylococcus aureus* e o *Propionibacterium acnes* desenvolvem-se quando encontram pH 7,5 e pH entre 6,0 e 6,5, respectivamente (SCHMID & KORTING, 1995; KORTING & BRAUN-FALCO, 1996). Há uma teoria de que o emprego repetido de agentes de limpeza pode alterar o pH da superfície cutânea em longo prazo, ou seja, o pH aumenta com o uso regular de um sabão alcalino e diminui com o uso de um produto ácido (KORTING & BRAUN-FALCO, 1996). Logo, observa-se que conhecer o pH do produto é importante para evitar irritações e a exposição da pele a agentes agressores, em especial micro-organismos.

Com isso, os outros produtos cujos valores de pH se apresentaram fora do limite do pH fisiológico da pele não são os mais indicados para o uso em indústrias de alimentos e hospitais, uma vez que podem propiciar um ambiente favorável à contaminação bacteriana da pele e causar irritações. Se isso acontecer, aumentam-se as chances de ocorrer doenças causadas por alimentos contaminados e infecções em pacientes em hospitais. Logo, o sabonete neutro seria o mais indicado para a higienização das mãos.

4.1.3. Densidade dos sabonetes

A densidade entre os sabonetes variou pouco, de 1,0131 a 1,0233 g/mL (Tabela 3), apesar de as formulações serem diferentes.

A análise de densidade em sabonetes líquidos é importante para a garantia da qualidade e manutenção das características do produto durante seu prazo de validade (BRASIL, 2004).

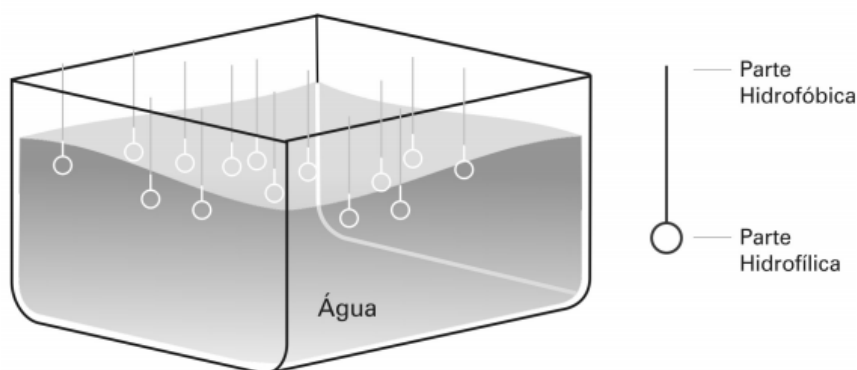
4.1.4. Tensão interfacial dos sabonetes

As formulações dos sabonetes apresentaram valores de tensão interfacial entre 14,42 e 26,89 mN/m (Tabela 3).

A variação dos valores de tensão interfacial nos sabonetes se deve às diferentes formulações. Cada sabonete possui uma formulação diferente (Tabela 1), alguns apresentam mais agentes tensoativos que outros, sendo o motivo da diferença entre os valores encontrados. O sabonete 1 obteve o menor valor de tensão interfacial (Tabela 3), isso pode ser devido a uma quantidade maior de tensoativos presente em sua formulação, quando comparado aos outros sabonetes.

Agentes tensoativos têm como função emulsificar resíduos de gordura e diminuir a tensão interfacial da água, melhorando a ação de molhagem da água. Sua presença nos sabonetes é importante para a eficiência da higienização, pois facilita o contato entre os agentes de limpeza e os resíduos a serem removidos.

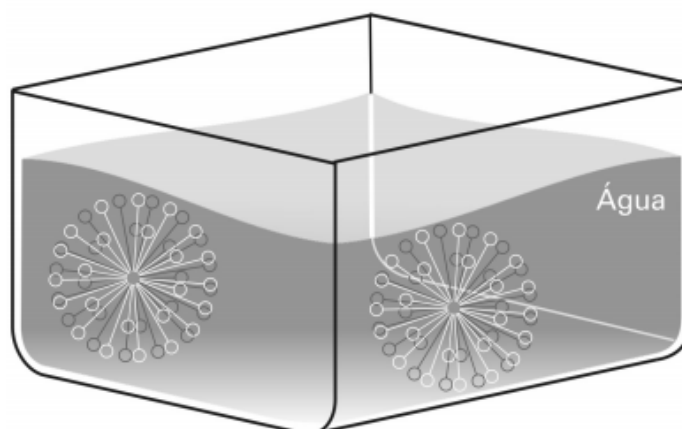
A estrutura química de um tensoativo se caracteriza por apresentar uma parte hidrofílica, ou seja, polar, e outra hidrofóbica, isto é, apolar (Figura 4). Essa característica permite que esses agentes diminuam a tensão interfacial em interfaces líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido. Essa característica é muito importante para o procedimento de higienização, que para ser eficiente exige a ocorrência de contato entre os agentes de limpeza e os resíduos a serem removidos (ANDRADE, 2008).



Fonte: Andrade (2008)

Figura 4 - Interação água e tensoativos.

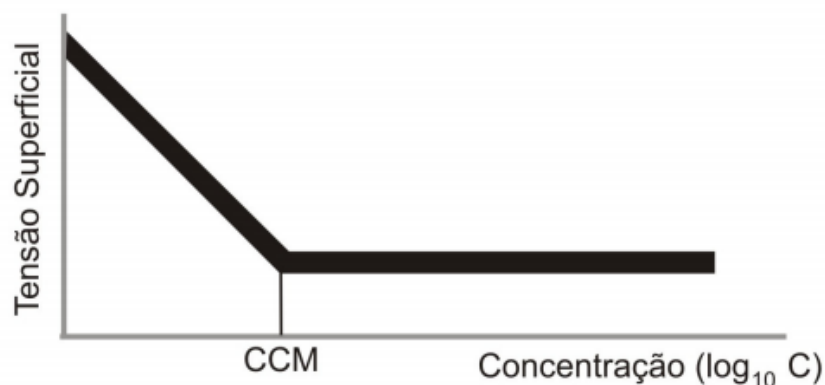
A molécula do tensoativo forma uma micela no interior de uma solução aquosa (Figura 5), onde as partes hidrofóbicas se direcionam para o interior da micela e as polares interagem com a água. A formação dessa micela é responsável pela remoção dos resíduos de gordura pelo processo de emulsificação realizado pelos tensoativos: a parte hidrofóbica dessas substâncias interage com a gordura e os ácidos graxos, insolúveis em água, e a hidrofílica com as moléculas de água, formando as micelas, que são solúveis em água. As micelas envolvem o resíduo e o suspende em solução aquosa.



Fonte: Andrade (2008)

Figura 5 - Micelas formadas por tensoativos no interior de uma solução aquosa.

A concentração de tensoativo em que se inicia a formação de micelas denomina-se “Concentração Crítica de Micela” (CCM). Na CCM, a tensão interfacial está em nível mínimo (Figura 6), e a eficiência de limpeza está otimizada. O aumento na concentração de tensoativo em solução além do CCM não causará diminuição significativa da tensão superficial. No entanto, o excesso de tensoativo é necessário para manter a CCM, desde que ele interaja com o resíduo a ser removido (ANDRADE, 2008).



Fonte: Andrade (2008)

Figura 6 - Tensão superficial em função da concentração de tensoativo.

Sabe-se que a água não é um bom agente de molhagem, apresentado uma tensão interfacial de 72 mN/m. Considera-se um bom tensoativo aquele que em baixas concentrações reduz em 50 % esse valor. Por exemplo, o dodecilbenzeno sulfonato de sódio, amplamente usado na indústria de alimentos, consegue essa redução em concentração de 0,1%.

Todos os sabonetes testados apresentaram quantidades de tensoativos suficientes para atingir valores abaixo de 36 mN/m. Menor tensão interfacial é indicativo de maior capacidade de molhar uma superfície. Logo, o sabonete 1 possui maior capacidade de molhar a superfície da mão que os outros sabonetes estudados (2 a 6).

4.2. Teor de triclosan dos sabonetes antissépticos

A concentração de triclosan nos sabonetes antissépticos variou de 0,451 % a 0,674 % (m/m) (Tabela 4), resultados diferentes daqueles encontrados nos rótulos (0,5 % (m/m)).

Tabela 4 - Teor de triclosan (% m/m) e sua variação (Δ) em relação à concentração indicada nos rótulos dos sabonetes líquidos (0,5 % (m/m)).

Produtos	Teor de Triclosan	Δ
3	0,674	+34,80 %
5	0,658	+31,60 %
4	0,528	+5,60 %
2	0,526	+5,20 %
1	0,451	-9,80 %

+ acima de 0,5 %

- abaixo de 0,5 %

Não existe uma monografia específica para sabonete líquido contendo triclosan na Farmacopeia Brasileira. Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais na quinta edição da Farmacopeia Brasileira, admite-se, para o controle de insumos e produtos farmacêuticos, a adoção de monografia oficial, em sua última edição, de códigos farmacêuticos estrangeiros, na forma disposta em normas específicas (BRASIL, 2010).

A Resolução RDC nº 79, de 11 de abril de 2003, adota a Farmacopeia Americana (USP), e esta apresenta a metodologia de doseamento para a matéria-prima triclosan em sua edição 29 (USP 29). A especificação dessa substância é conter no mínimo 97 % e no máximo 103 % em relação à substância dessecada. Assim, a elaboração de uma metodologia para o doseamento do triclosan em sabonete líquido deve ser fundamentada nessa monografia e posteriormente validada.

A concentração final de triclosan em todos os sabonetes antissépticos ficou fora da faixa estabelecida pela USP 29 (Tabela 4), apresentando valores de 9,80 % abaixo até 34,80 % acima do especificado no rótulo das embalagens (0,5 % (m/m)). O aceitável seriam valores de até 3 % abaixo ou acima de 0,5 %.

No Brasil, a RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, classifica os produtos cosméticos, de higiene e perfumaria quanto ao grau de risco que representam à saúde humana, correlacionando-o com sua segurança de uso, em duas categorias gerais de produtos: grau 1 e grau 2. Os sabonetes antissépticos se enquadram em grau 2. Produtos classificados na categoria 2 devem ser obrigatoriamente registrados na ANVISA. É necessário a inclusão de vários documentos, por exemplo, formulações,

comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso e especificações técnicas organolépticas e físico-químicas do produto acabado. Os documentos com os resultados dessas avaliações são apresentados à ANVISA durante o processo de registro. Os sabonetes estudados passaram pelos testes de comprovação de segurança e eficácia, caso contrário não eles estariam no mercado. Porém, os valores de triclosan verificados apresentaram-se fora da faixa estabelecida, indicando que são produtos com desvio de qualidade, pois durante o processo de fabricação, transporte ou armazenamento se afastaram dos parâmetros de qualidade estabelecidos em seu registro na Anvisa.

A Anvisa exerce a atividade de fiscalização sanitária, cujo objetivo é monitorar o mercado e apurar irregularidades em empresas e produtos sujeitos à vigilância sanitária para evitar ou reduzir riscos à saúde da população. Assim, podem ser adotadas ações como suspensão da fabricação, do comércio e do uso de produtos e a interdição cautelar parcial ou total de um estabelecimento ou de um produto, por exemplo.

4.3. Determinação da atividade bacteriostática/bactericida do triclosan a 0,5 % (m/v) sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Nas condições deste experimento, não houve multiplicação microbiana em nenhuma das placas, o que indica que o triclosan a 0,5 % (m/v) possui efeito bactericida e não bacteriostático sobre os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Deve-se ressaltar, no entanto, que pode ocorrer a presença de bactérias VNC (viáveis não cultiváveis).

Na natureza, geralmente os micro-organismos encontram-se em condições adversas e tem-se observado que várias respostas adaptativas estão envolvidas na sobrevivência dos micro-organismos, quando submetidos a condições de estresse (ABEE & WOUTERS, 1999). Essas respostas incluem alterações tanto na fisiologia quanto na morfologia celular, por exemplo, na esporulação, na aquisição de competência, na produção de antibióticos, dentre outras (DUBNAU & TURGAY, 2000).

Sistemas de efluxo, ou seja, bombear substâncias indesejáveis para fora da célula, constituem um mecanismo eficaz para eliminação de metais pesados

da célula. Em *E. coli*, a sobre-expressão do gene *zntA* que codifica a ATPase tipo P foi encontrada como resposta adaptativa para melhorar a tolerância contra Zn e Cd (RENSING *et al.*, 1997).

Já foi relatado que concentrações subinibitórias de penicilina aumentam significativamente a taxa de mutação em *Streptococcus pneumoniae*, o que indica que a exposição a este antibiótico poderia ajudar o patógeno a induzir adaptações que conferem resistência a outros antibióticos (CORTES *et al.*, 2008).

Em estudos realizados com *S. aureus* de origem humana, a clidamicina, quando utilizada em concentrações subinibitórias, eliminou a produção de praticamente todas as exoproteínas secretadas e aumentou a produção de proteínas de superfície, aumentando a virulência do patógeno (HERBERT *et al.*, 2001).

Dependendo da intensidade e do tipo de estresse sofrido, as bactérias podem entrar no estado viável não cultivável (VNC). Roszak e Colwell (1987) definiram estado viável não cultivável como o estado fisiológico em que os micro-organismos não são capazes de se multiplicar em meios utilizados pelos métodos tradicionais disponíveis, mas que apresentam características de células vivas, como atividade respiratória, manutenção de potencial de membrana, atividade enzimática, entre outras.

Uma substância bacteriostática é aquela que detém a multiplicação bacteriana, mas o micro-organismo consegue se multiplicar quando é retirado do contato com a substância. Já um agente bactericida tem a capacidade de inativar as bactérias, eliminando-as. Portanto o resultado obtido neste estudo foi satisfatório, uma vez que é preferível um produto bactericida a bacteriostático.

Em baixas concentrações, o triclosan atua como bacteriostático, inibindo o crescimento de bactérias, e em elevadas concentrações age como bactericida, inativando as bactérias por meio do rompimento da parede celular (AIELLO *et al.*, 2007). Como conservante a concentração máxima de triclosan permitida pela legislação é de 0,3 % (BRASIL, 2006), logo sua concentração nos sabonetes antissépticos é considerada alta.

Tanomaru *et al.* (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de antissépticos bucais à base de triclosan (0,03 %) contra *S. aureus*, utilizando

várias diluições. Os produtos apresentaram diferentes Diluições Máximas Inibitórias (DMI), com inibições de até 100 % da população microbiana.

Fan *et al.* (2002) demonstraram que elevados valores de Concentração Mínima Inibitória (MIC) para triclosan contra *S. aureus* ocorreram em estirpes que conseguiram superexpressar os genes *FabI*, que codificam a enoil-acil transportador da proteína redutase, alvo do triclosan. Esses autores demonstraram também que os maiores valores de MIC (1 a 2 mg/L) ocorreram em estirpes que apresentaram mutações no gene *FabI*.

Camilloto (2009) avaliou a capacidade dos micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* desenvolverem mecanismos de resistência após sucessivas exposições ao triclosan. A concentração mínima inibitória de triclosan para *E. coli* aumentou de 0,125 para 16 µg/mL após sete exposições, enquanto para *S. aureus* aumentou de 0,25 para 16 µg/mL, após quatro exposições subletais. Segundo a autora, a diferença entre o processo de adaptação de *S. aureus* e o de *E. coli* está na velocidade com que estas bactérias desenvolvem o mecanismo de resistência. A bactéria *S. aureus* tornou-se resistente mais rapidamente do que *E. coli*, pois foi preciso um número menor de exposições.

Estudos têm indicado que o triclosan atua como um inibidor competitivo da enzima enoil-(proteína carreadora de acil) redutase (*FabI*), bloqueando a síntese de ácidos graxos em bactérias (MCMURRY, 1998). Segundo Kaylon e Olgun (2001), se o triclosan é realmente um agente antimicrobiano específico, ele deve ser usado com critério e em concentrações maiores que a mínima concentração inibitória, para evitar o aparecimento de estirpes resistentes.

As bactérias utilizam diversos mecanismos para desenvolver resistência ao triclosan, incluindo mutações no alvo de ação, maior expressão do alvo, sistemas de efluxo, ou seja, bombear substâncias indesejáveis para fora da célula, e enzimas degradativas (SCHWEIZER, 2001).

4.4. Avaliação da eficiência dos sabonetes sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

4.4.1. Teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em Agar

Houve uma diferença visual entre os tamanhos dos halos de inibição para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A bactéria gram-negativa *E. coli*

foi menos sensível à ação dos sabonetes do que a bactéria gram-positiva *S. aureus* (Tabela 5). A parede celular das bactérias gram-positivas possui uma estrutura mais simples quando comparada àquela das bactérias gram-negativas, podendo explicar a maior resistência do micro-organismo *E. coli*.

A principal diferença entre a parede celular de uma bactéria gram-positiva e de uma gram-negativa é que a parede celular da primeira, embora mais espessa, é quimicamente mais simples, ou seja, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula (90 % peptidoglicano). Já a parede celular de uma bactéria gram-negativa é mais complexa. É formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa, separadas entre si por um espaço periplásmico, contendo uma série de enzimas e proteínas. Enquanto nas gram-positivas o peptidoglicano representa de 15 a 50 % da massa seca da célula, nas gram-negativas ele representa no máximo 5 %.

Tabela 5 – Valores dos halos de inibição (cm) dos micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* devido à ação dos sabonetes líquidos.

Produtos	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	8,5	>8,5
2	8,5	>8,5
3	7,42	8,5
4	8,5	>8,5
5	7,6	>8,5
6	0,6	2,42

O sabonete 1 apresentou o menor teor de triclosan (Tabela 4), enquanto o 3 apresentou o maior teor e o 5 o segundo maior, no entanto o resultado do teste do halo para o primeiro foi superior ao dos outros dois (Tabela 5), o que pode ter ocorrido devido às diferenças nas formulações (Tabela 1). Alguns dos produtos presentes nas formulações possuem atividade antimicrobiana, como é o caso do EDTA e do tensoativo lauril sulfato de sódio. Se a concentração dessas substâncias no sabonete 1 for superior aos dos outros, isso pode elevar a ação antimicrobiana do mesmo.

Os resultados obtidos neste experimento evidenciam a maior eficiência do triclosan quando comparado às pesquisas de Camilloto (2009), Moreira e colaboradores (2009), Simões *et al.* (2011), que analisaram produtos contendo triclosan.

Moreira *et al.* (2009) avaliaram um antisséptico bucal contendo triclosan sobre *S. aureus*, utilizando a técnica por difusão em ágar. O produto foi avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana sem diluição, conforme a indicação de uso. Os autores verificaram que o antisséptico bucal contendo o triclosan foi eficaz, tendo apresentado halo de inibição de aproximadamente 6 cm. Não foi informada a concentração do triclosan no antisséptico bucal.

Em outro estudo avaliando antissépticos bucais, Simões *et al.* (2011) também obtiveram resultado positivo do produto contendo triclosan contra micro-organismos *S. aureus* e *E. coli*, apresentando halos de inibição de 4,6 e 2,9 cm, respectivamente. Não foi informada a concentração do triclosan no antisséptico bucal.

Camilloto (2009) estudou a atividade antimicrobiana do triclosan incorporado em filmes produzidos por meio da extrusão de uma mistura de resinas de polietileno de baixa densidade (85 %) com polietileno de alta densidade com alta capacidade de absorção (15 %). Ela também obteve resultados positivos no teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em Agar. Os filmes contendo 0,460, 0,826 e 1,080 % de triclosan apresentaram halos de 2,50, 3,18 e 3,53 cm para *E. coli* e 2,57, 3,00 e 3,25 cm para *S. aureus*, respectivamente. Os filmes contendo triclosan apresentaram eficiência antimicrobiana crescente em relação à concentração do composto antimicrobiano para ambos os micro-organismos. Os filmes contendo 0,826 e 1,080 % de triclosan apresentaram uma concentração do antimicrobiano maior que aquela encontrada nos sabonetes, mesmo assim os resultados obtidos nesse experimento mostraram uma maior eficiência. Este fato pode ter ocorrido devido à menor difusão do triclosan no meio de cultura, resultado da forte interação entre o filme e o triclosan.

Na Figura 7 encontram-se imagens dos halos de inibição contra os micro-organismos estudados. Nas Figuras 7a e 7b estão os halos de inibição contra *E. coli*, utilizando os sabonetes 2 e 6, respectivamente. Na Figura 7a é possível verificar a multiplicação microbiana nas laterais das placas, formando um halo de 8,5 cm. Já na Figura 7b o halo de apenas 0,6 cm mostra a resistência da *E. coli* ao sabonete 6. As Figuras 7c e 7d ilustram os halos de inibição contra *S. aureus*, utilizando os sabonetes 2 e 6, respectivamente. Na Figura 7c constata-se que o halo de inibição ultrapassou o diâmetro da placa (8,5 cm), evidenciando menor resistência do micro-organismo ao sabonete

antisséptico. Já na Figura 7d percebe-se a formação de um halo de 2,42 cm, ou seja, o *S. aureus* apresentou sensibilidade ao sabonete 6. Este fato provavelmente ocorreu devido à presença de EDTA, de lauril sulfato de sódio e do conservante presente no sabonete neutro.

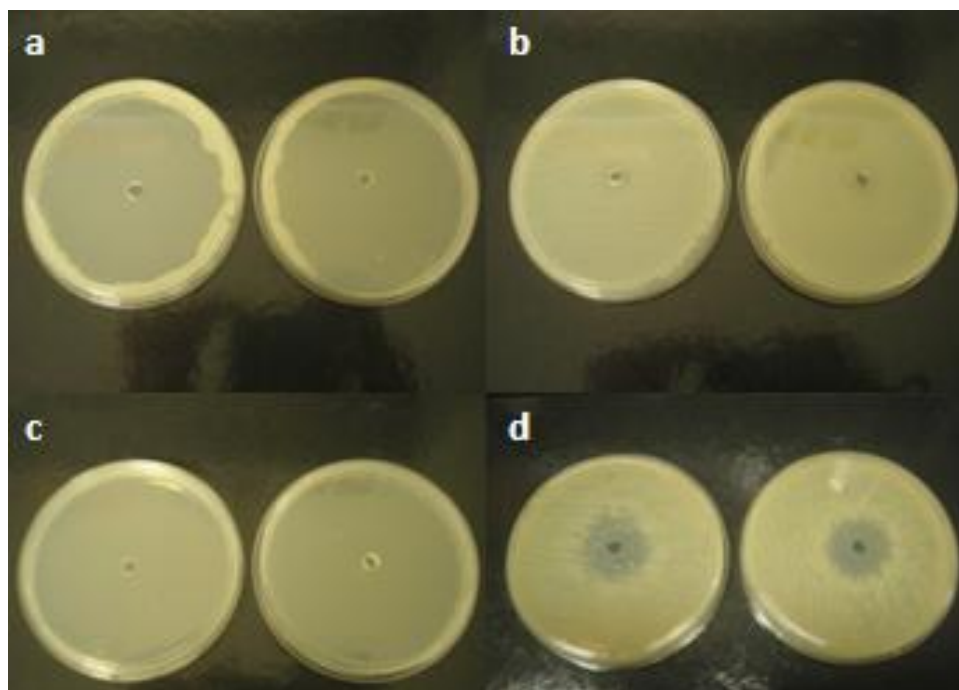


Figura 7 – Imagem do halo de inibição contra *E. coli* utilizando-se o sabonete 2 (a) e o 6 (b) e contra *S. aureus* utilizando-se o sabonete 2 (c) e o 6 (d).

4.4.2. Avaliação da eficiência dos sabonetes líquidos sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, aplicadas na superfície das mãos de voluntários

Uma vez que as pressuposições de homogeneidade de variância e de normalidade da distribuição dos erros do número de Unidades Formadoras de Colônias por mão (UFC/mão) para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* não foram atendidas, os dados foram transformados para $\ln(Y)$. Esta transformação foi empregada devido à proporcionalidade observada entre as médias e variâncias dos tratamentos. Esta transformação resultou no atendimento das pressuposições sendo feita a ANOVA com os dados transformados (Tabelas 6 e 7). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os efeitos dos seis sabonetes (1 a 6) para as duas bactérias em estudo.

Tabela 6 – Análise de variância do logaritmo neperiano do número de UFC/mão de células de *E. coli* nas mãos dos voluntários após o uso dos sabonetes.

FV	GL	QM	p-valor
Tratamento	5	1,8850	0,366687
Resíduo	53	1,70	
Total	58		

Tabela 7 – Análise de variância do logaritmo neperiano do número de UFC/mão de células de *S. aureus* nas mãos dos voluntários após o uso dos sabonetes.

FV	GL	QM	p-valor
Tratamento	5	2,7480	0,261820
Resíduo	52	2,0490	
Total	57		

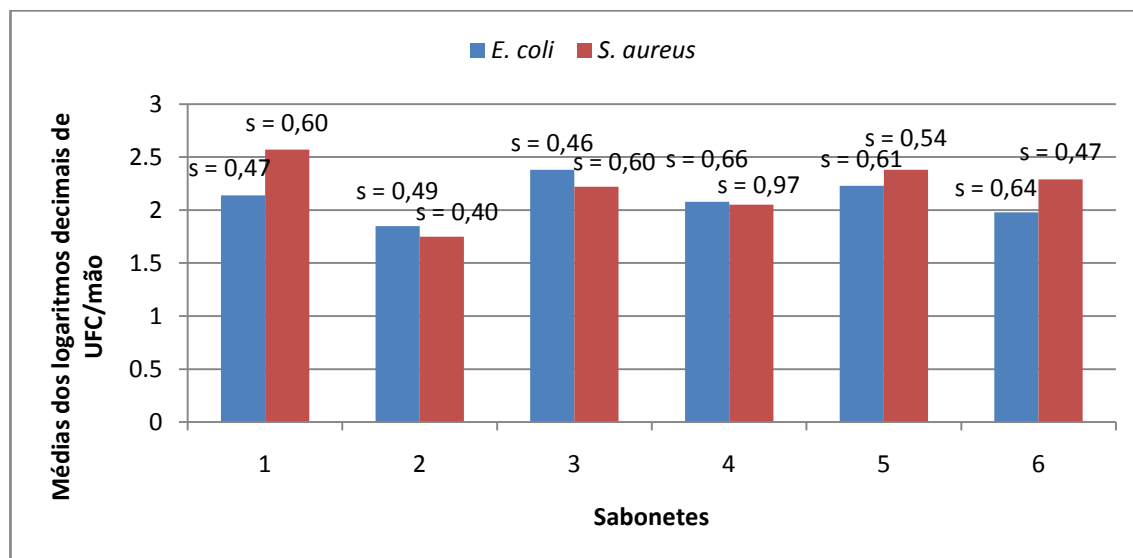
De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que o uso de sabonetes líquidos com atividade antimicrobiana não é necessário no processo de lavagem das mãos, o que evidencia que seguir corretamente as etapas do procedimento operacional padronizado para lavagem das mãos é mais importante que a presença de sanitizantes nas formulações.

Durante a lavagem das mãos há vários fatores que interferem na otimização do processo, como a ação da água e dos componentes dos sabonetes, o tempo de contato do produto com a pele e a ação mecânica que ocorre durante a fricção de uma mão na outra. Todos esses fatores contribuíram para o resultado do experimento, mostrando que ao realizar a lavagem correta das mãos o uso de antimicrobianos em sabonetes pode ser dispensado, reduzindo custos para as empresas.

Considerando que foram adicionados entre 8-9 log de UFC/mL às mãos dos voluntários e que a remoção dos micro-organismos após o uso dos sabonetes (1 a 6) atingiu média de 2 log de UFC/mão (Figura 8) tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*, pode-se afirmar que houve redução de 6-7 log de UFC/mão para ambos os micro-organismos estudados.

Uma vez que não há padrões ou especificações, são sugeridas como níveis aceitáveis de contaminação para as mãos contagens inferiores a 10^4 UFC/mão para mesófilos aeróbios, 10^2 UFC/mão para *Staphylococcus aureus* e 10^2 UFC/mão para *Escherichia coli* (ANDRADE, 2005). Os resultados obtidos após o uso dos sabonetes pelos voluntários (Figura 8) estão bem próximos dos

valores sugeridos por Andrade (2005), para todos os seis produtos testados, ou seja, a lavagem correta das mãos seguindo as instruções do rótulo dos produtos é suficiente para obter níveis abaixo ou próximos aos aceitáveis de contaminação nas mãos.



s = desvio padrão

Figura 8 – Médias dos logaritmos decimais de UFC/mão para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* recuperados após o uso dos sabonetes.

A Associação Médica Americana, o *Food and Drug Administration* (FDA) e vários pesquisadores de 13 universidades e instituições públicas mundiais concluíram que sabonetes antimicrobianos não têm melhor efeito do que sabonetes neutros e água no combate a infecções ou na redução de bactérias na pele (TAN *et al.*, 2002; ALASTAIR, 2005; AIELLO *et al.*, 2007; DRINKELA *et al.*, 2007; LAGES *et al.*, 2008).

De acordo com essa associação, apesar do aumento do uso de antimicrobianos em produtos de consumo, não há estudos suficientes sobre o efeito desses agentes. Estudos demonstraram o aumento da resistência de bactérias a esses produtos, o que pode prejudicar os tratamentos em que são utilizados antibióticos. Considerando a natureza de algumas bactérias de criarem resistência a antibióticos, é interessante evitar o uso de antimicrobianos em produtos de consumo. Porém, mais estudos são necessários (TAN *et al.*, 2002).

Um dos membros do *Nonprescription Drugs Advisory Committee*, do FDA, afirmou, após ter analisado diversos trabalhos, que nenhum dado o convenceu de que o uso de antimicrobianos em sabonetes torna-os mais efetivos que um sabonete neutro (ALASTAIR, 2005).

Aiello *et al.* (2007), Drinkela *et al.* (2007) e Lages *et al.* (2008) demonstraram que sabonetes contendo triclosan não foram mais eficientes do que sabonetes neutros na prevenção de infecções e na redução da carga microbiana em mãos, resultados estes semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Além de a seleção de bactérias resistentes ser preocupante, há também a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da coresistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência em um único hospedeiro, levando à resistência a múltiplos fármacos (LIVERMORE, 2002; MCGOWAN, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Gautério *et al.* (2008) estudaram o perfil de sensibilidade ao triclosan de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à isoniazida, um importante fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose. O alvo de ação de ambos esses antimicrobianos no micro-organismo estudado é uma enoil-redutase. Nesse estudo, os autores determinaram a concentração mínima inibitória (CMI) do triclosan e da isoniazida para 46 isolados clínicos de *M. tuberculosis* previamente identificados como resistentes à isoniazida, e observaram altos níveis de resistência para isoniazida e sensibilidade ao triclosan para todas as cepas. Porém, os resultados do estudo não permitiram estabelecer resistência cruzada entre isoniazida e triclosan.

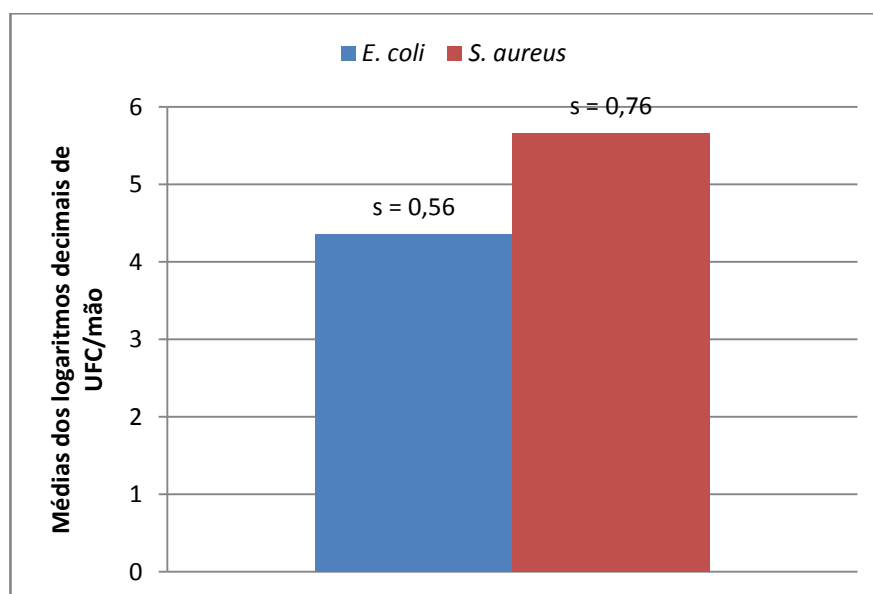
Sader *et al.* (2001) avaliaram a sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas no trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia, internados em hospitais brasileiros. Entre as bactérias encontradas está o *S. aureus*. Cerca de metade das amostras de *S. aureus* foi resistente à oxacilina, tendo a grande maioria apresentado resistência cruzada também a outros antimicrobianos, como clindamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim.

Cardoso *et al.* (2002) estudaram 86 amostras de *E. coli*, isoladas de sacos aéreos de aves com problemas respiratórios, com o objetivo de apresentar diferentes perfis de resistência de *E. coli* aviária às drogas amoxicilina, ácido oxolínico, fosfomicina, norfloxacina e sulfazotrim, utilizadas

no tratamento das aves. O estudo mostrou o alto índice de resistência de *E. coli* de origem aviária para todas as drogas mencionadas, salientando assim a importância de que a recomendação de drogas antimicrobianas deve ser precedida de teste de suscetibilidade, pois o uso inadequado de antimicrobianos em aves causa resistência cruzada no tratamento humano (PIDDOCK *et al.*, 1990; ENDTZ *et al.*, 1991; GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.*, 1995). O teste de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* faz com que se tenha uma escolha precisa do uso de medicamentos apropriados para cada situação na área veterinária (BLANCO *et al.*, 1997).

4.5. Adesão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* nas mãos de voluntários

A capacidade de recuperação dos micro-organismos patogênicos das mãos dos voluntários foi diferente. A recuperação de *E. coli* atingiu média de 4,36 log UFC/mão, enquanto para *S. aureus* esse valor foi de 5,66 log UFC/mão (Figura 9). Considerando que foram adicionados entre 8-9 log de UFC/mL às mãos dos voluntários e que o procedimento de remoção desses micro-organismos estava muito bem padronizado, pode-se afirmar que a *E. coli* foi a espécie mais difícil de ser removida, ou seja, a que aderiu mais fortemente às mãos.



s = desvio padrão

Figura 9 – Médias dos logaritmos decimais de UFC/mão para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* recuperados das mãos dos voluntários.

A adesão microbiana ocorre devido à deposição de micro-organismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento. Sob o aspecto microbiológico, a adesão pode constituir-se de micro-organismos alteradores e/ou, patogênicos, que resultam em sérios problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica.

Vários fatores podem influenciar a adesão de micro-organismos às superfícies, como as características do micro-organismo, da superfície de adesão e do meio que envolve o micro-organismo. A espécie, o meio de cultura, a idade da cultura e a concentração do micro-organismo podem afetar o processo de adesão. Quanto à superfície, sua composição, rugosidade e porosidade são importantes no processo de adesão. Em relação ao meio, fatores como pH, concentração de sais orgânicos, compostos orgânicos, agitação, tempo e temperatura de contato são importantes nesse processo.

No que diz respeito às características dos micro-organismos, a presença de estruturas como pili, fímbria, flagelo e proteínas da parede celular pode influenciar o processo de adesão, servindo de ligação entre a célula e o substrato de adesão (PEREIRA *et al.*, 2000; ANDRADE, 2008).

A presença de flagelo, fímbria e pili na estrutura celular da bactéria *E. coli* pode explicar sua maior adesão nas mãos dos voluntários, nas condições do experimento.

Bactérias flageladas possuem melhores condições para aderir, chegando mais rapidamente ao local, e têm a vantagem sobre competidores não móveis. A presença de fímbria e pili superaria a força de repulsão eletrostática entre célula e substrato, podendo auxiliar tanto na adesão da célula, quanto na busca por regiões de maior estabilidade (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994).

Di Martino *et al.* (2003) demonstraram a relação existente entre a produção de fímbria tipo 3 por *Klebsiella pneumoniae* e sua capacidade de formar biofilmes. Linhagens da mesma bactéria não produtoras de fímbria tipo 1 e 3, por outro lado, não foram capazes de formar biofilmes após 48 h de incubação.

Stone e Zottola (1985) mostraram que na adesão em aço inoxidável, em fluxo contínuo de leite, *Pseudomonas fragi* produz fímbria em 30 min, a 25° C, e em 2 h, a 4° C. Em um estudo conduzido por Herald e Zottola (1988), ficou evidenciado que *P. fragi* apresenta máxima adesão ao aço inoxidável, em pH na faixa de 7 a 8, o que coincide com o pH ótimo para o seu metabolismo.

Segundo Zottola e Sasahara (1994), *Yersinia enterocolitica* adere melhor ao aço inoxidável a 21° C do que a 35 ou 10° C. Observou-se que a 35° C as células não possuíam flagelo, o que evidencia que essa estrutura é necessária para que a adesão ocorra. Os autores concluíram também que *Y. enterocolitica* adere melhor em pH 8 a 9,5 do que em pH 6, nas temperaturas de 10, 21 e 35° C. Em pH 6, poucos flagelos foram observados, o que pode ter tido influência na adesão (HERALD & ZOTTOLA, 1988).

Os mutantes de *E. coli* que não produziam pili do tipo 1 ou eram imóveis ou não formaram biofilme em cloreto de polivinil (PVC) (STICKLER, 1999). Este estudo mostrou, ainda, que os mutantes deficientes em flagelos ou que tinham o flagelo imobilizado foram bastante falhos na capacidade de formar biofilmes. Nos experimentos com PVC foram encontradas poucas células, em pequenos agrupamentos. Deve-se ressaltar que a mobilidade é importante para sobrepor a força de repulsão entre bactéria e substrato e que a pili do tipo 1 é necessária para estabilizar a adesão.

5. CONCLUSÕES

Comparou-se a eficiência de sabonetes antissépticos e um sabonete neutro para mãos contra suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* inoculadas na superfície das mãos de voluntários, em condições padronizadas.

Em relação às características físico-químicas, constatou-se que os sabonetes apresentaram diferentes viscosidades, provavelmente devido às diferentes formulações; a densidade variou muito pouco, apesar das diferenças nas formulações; apenas o pH do sabonete neutro se aproximou do pH fisiológico da pele; a análise da tensão interfacial mostrou valores baixos; e apenas um dos sabonetes antissépticos apresentou teor de triclosan abaixo do especificado no rótulo da embalagem.

Em relação às análises microbiológicas, triclosan a 0,5 % (m/v) mostrou efeito bactericida e não bacteriostático sobre os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus*. A bactéria gram-negativa *E. coli* foi menos sensível à ação dos sabonetes do que a bactéria gram-positiva *S. aureus*, no teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar.

Já no teste utilizando voluntários, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os efeitos dos seis sabonetes (1 a 6) para as duas bactérias em estudo, o que indica que o uso de sabonetes líquidos com adição de triclosan não é necessário no processo de lavagem das mãos e que seguir corretamente as etapas do procedimento operacional padronizado para lavagem das mãos é mais importante que a presença de sanitizantes nas formulações.

A capacidade de recuperação dos micro-organismos patogênicos das mãos dos voluntários foi diferente no teste de adesão. Pode-se afirmar que a *E.*

coli foi a espécie mais difícil de ser removida, ou seja, a que aderiu mais fortemente às mãos.

Apesar do aumento do uso de triclosan em produtos de consumo, não há estudos suficientes sobre a melhoria da ação antimicrobiana dessas formulações. Considerando a natureza de algumas bactérias criarem resistência a antimicrobianos, esses produtos devem ser usados com critério para evitar o aparecimento de estirpes resistentes. Há também preocupação em relação à toxicidade do triclosan em humanos, animais e no meio ambiente. Estudos recentes têm demonstrado que o triclosan pode ser mais nocivo do que benéfico, porém são necessárias mais pesquisas sobre o efeito tóxico do triclosan, principalmente em humanos.

6. BIBLIOGRAFIA

ABBE, T.; WOUTERS, J. A. Microbial stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**. v. 50, p. 65-9, 1999.

AIELLO, A. E.; LARSON, E. L.; LEVY, S. B. Consumer antibacterial soaps: effective or just risky? **Clinical Infectious Diseases**. v. 45 (Supplement 2): S137-S147, 2007.

ALASTAIR WOOD, M. D. (Committee Chair), **FDA Non-Prescription Drugs Advisory Committee**. October 20, 2005 meeting transcript. p. 354-355. Disponível em <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cder05.html#NonprescriptionDrugs>. Acesso em 12 dez. 2012.

ALCAMO, I. E. **Fundamentals of microbiology**. 6th ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 2001. p. 534; 567-571, 698-708, 743-744.

ANDRADE, N. J. **Metodologias para avaliar condições higiênicas de ambientes de processamento de alimentos**. In: XIII Congresso Brasileiro de Microbiologia (Santos, Brasil). 1 CD-ROM, 2005.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Editora Varela, 2008. 400 p.

ARASHIRO, E. Y.; DEMARQUETTE, N. R. Use of a pendant drop apparatus to measure interfacial tension between polymers. **Materials Research**. V. 2, n. 1, p.23, 1999.

BEDOUX, G.; ROIG, B.; THOMAS, O.; DUPONT, V.; LE BOT, B. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**. May; 19(4):1044-65, 2012. Disponível em <<http://sbc-cosmetologia.com.br/toxicologia-triclosan.php>>. Acesso em 21 dez. 2012.

BESTER, K. Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, p. 9–17, 2005.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, p.2184-2185, 1997.

BONADEO, I. **Tratado de cosmética moderna**. Barcelona: Ed. Científico – Medica, 1963. p.1–4, 53, 84-85, 102-106.

BRADY, L. M.; THOMSON, M.; PALMER, M. A.; HARKNESS, J. L. Successful control of endemic MRSA in a cardiothoracic surgical unit. **Medical Journal of Australia**. 152, 240-5, 1990.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 set. 1988. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm>. Acesso em 10 de set. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Caderno básico de controle de infecção hospitalar**. 2000. 84 p. Disponível em <

<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf>>. Acesso em 03 de abr. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 79, de 11 de abril de 2003. Na ausência de monografia oficial de matéria- prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais na quinta edição da Farmacopeia Brasileira, para o controle de insumos e produtos farmacêuticos admitir-se-á a adoção de monografia oficial, em sua última edição, de códigos farmacêuticos estrangeiros, na forma disposta em normas específicas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 set. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004. Série Qualidade em Cosméticos. v.1.
Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos>>. Acesso em 11 jul. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 211, de 14 de julho de 2005. Estabelece a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, conforme Anexo I e II desta resolução e dá outras definições. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 jul. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2ª edição, revista – Brasília: Anvisa, 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf>. Acesso em 06 jun. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 49, de 23 de novembro de 2010. Aprova a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 nov. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Ministério da Saúde e Anvisa divulgam esclarecimentos sobre *E. coli***. 2011a. Disponível em <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 04 de mai. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diretora da Anvisa esclarece dúvidas sobre bactéria *E. coli***. 2011b. Disponível em <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 04 de mai. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 29, de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 ago. 2006.

BRYAN, F. L. Hazard analysis of food service operations. **Food Technology**, v. 32, p. 78-87, 1981.

CAMILLOTO, G. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CARDOSO, R. DE C. V. **Eficiência de agentes sanificantes na redução da microbiota das mãos de manipuladores de alimentos**. 1993. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG),

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.69, n.2, p.1-5, abr./jun., 2002.

CHEREDNICHENKO, G.; ZHANG, R.; BANNISTER, R. A.; TIMOFEYEV, V.; LI, N.; FRITSCH, E .B.; FENG, W.; BARRIENTOS, G. C.; SCHEBB, N. H.; HAMMOCK, B. D.; BEAM, K. G.; CHIAMVIMONVAT, N.; PESSAH, I. N. Triclosan impairs excitation–contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**. 2012.

Disponível em < <http://www.pnas.org/search?fulltext=triclosan&submit=yes>>. Acesso em 20 ago. 2012.

COIA, J. E.; DUCKWORTH, G. J.; EDWARDS, D. I.; FARRINGTON, M.; FRY, C.; HUMPHREYS, H.; MALLAGHAN C.; TUCKER, D. R. Guidelines for the control and prevention of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. **Journal of Hospital Infections**. 63, S1-44, 2006.

CORTES, P. R.; PINAS, G. E., ALBARRACIN ORIO, A. G., ECHENIQUE, J. R. Subinibitory concentrations of penicillin increase the mutation rate to optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 62, 973-977, 2008.

COUTO, W. F.; GRAMIGNA, L. L.; FERREIRA, M. J; SANTOS, O. D. H. Avaliação de parâmetros físico-químicos em formulações de sabonetes líquidos com diferentes concentrações salinas. **Anais Eletrônicos da XV Semana Científica Farmacêutica**, Goiânia: UFG, 2007. n.p.

DI MARTINO, P. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in Microbiology**. Paris. v. 154, p. 9-16, 2003.

DRAELOS, Z. D. **Cosméticos em dermatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p. 219-222.

DRINKELA, A.; FERIÉ, J.; MBATA, M.; SCHMID-GRENDELMEIER, M.; HATZ, C. Efficacy of triclosan soap against superficial dermatomycoses: a double-blind clinical trial in 224 primary school-children in Kilombero District, Morogoro Region, Tanzania. **International Journal Dermatology**. 46 Suppl 2:23-8, 2007.

DUBNAU, D.; TURGAY, K. Regulation of competence in *Bacillus subtilis* and its relation to stress. **Bacterial Stress Responses**. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds) ASM Press, Washington, DC, 485p., 2000.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Detergent and skin irritation. **Clinical Dermatology**. 14:15-21, 1996.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Detergent and skin irritation. **Clinical Dermatology**. 14:15-21, 1996.

ENDTZ, H. P.; RUIJIS, G. J.; VAN KLINGEREN, B. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following introduction of fluorquinolones in veterinary medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 27, p.199-211, 1991.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; SCHELESKY, M. E. Doseamento da potência da ciprofloxacina em comprimidos orais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 17 – 20, 2005. Farmacopeia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu; 2001. pt. 2. p.146.

EWG - Environmental Working Group. **Pesticide in Soap, Toothpaste and Breast Milk - Is It Kid-Safe?: Triclosan No Better Than Plain Soap**. Disponível em < <http://www.ewg.org/node/26859>>. Acesso em 11 dez. 2012.

FAN, F.; YAN, K.; WALLIS, N. G.; REED, S.; MOORE, T. D.; RITTENHOUSE, S. F.; DE WOLF, W. E. JR.; HUANG, J.; MCDEVITT, D.; MILLER, W. H.; SEEFELD, M. A.; NEWLANDER, K.A.; JAKAS, D.R.; HEAD, M.S.; PAYNE, D.J. Defining and combating the mechanisms of triclosan resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46 (11), 3343-3347, 2002.

Farmacopeia Brasileira, v. 2. 5. ed. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ed. eletrônica. Brasília: ANVISA, 2010. 546 p. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf> Acesso em 03 dez. 2012.

FERNANDES, P. E. **Novo método de síntese de nano partículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano**. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M. A. V.; VILAR, M. C. M.; LOUREIRO, N. G.; PEREIRA, R. G. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. Vol. 19 Nº 4, Outubro-Dezembro, 2007.

FONSECA, A.; PRISTA, L.N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia**. São Paulo: Roca, 1993. p. 48-53.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Triclosan: what consumers should know**. 2010. Disponível em <<http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm205999.htm>>. Acesso em 03 abr. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FDA finalizes report on 2006 spinach outbreak**. 2007. Disponível em <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108873.htm>>. Acesso em 04 mai. 2012.

GARCIA-GODOY, F.; DEVIZIO, W.; VOLPE, A. R.; FERLAUTO, R. J.; MILLER, J. M. Effect of a triclosan/copolymer/fluoride dentifrice on plaque formation and gingivitis: a 7-month clinical study. **American Journal of Dentistry**. April, 4(2): 102, 1990.

GARCÍA-RODRÍGUES, J. A.; FRESNADILLO, M. J.; GARCÍA, M. I.; GARCÍA-SÁNCHEZ, E.; GARCÍA -SÁNCHEZ, J. E.; TRUJILLANO, I. Multicenter Spanish study of ciprofloxacin susceptibility in gram-negative bacteria. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**. v. 14, p.456-459, 1995.

GAUTÉRIO, D. P.; RIBEIRO, M. O.; GROLL, A. V.; SILVA, M.; RAMOS, D. F.; ROSSETTI, M. L.; SCAINI, C. J.; DA SILVA, P. E. A. **Perfil de sensibilidade ao triclosan de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniazida**. VITTALLE, Rio Grande, 20(1): 99-105, 2008.

HAAS, C. N.; MARIE, J. R.; ROSE, J.B.; GERBA, C.P. Assessment of benefits from use of antimicrobial hand products: reduction in risk from handling ground beef. **International Journal of Hygiene and Environment Health**. v. 208, p. 461-466, 2005.

Harry's Cosmetology. 7th. ed. New York: Chemical Publishing Company; 1982.

HERALD, P. J.; ZOTTOLA, E. A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal Food Protection**. v. 51, n. 6, p. 445-448, 1988.

HERBERT, S.; BARRY, P.; NOVICK, R. P. Subinibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**. 5, 2996-3003, 2001.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. M. **Manual de cosmetologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. 244 p.

HSDB: Hazardous Substances Databank, 2004. **National Library of Medicine Toxnet**. N^o 3380-34-5, Triclosan. Disponível em <<http://www.toxnet.nlm.nih.gov>>. Acesso em 20 dez. 2012.

IMBERT, C.; LASSY, E.; DANIAULT, G.; JACQUEMIN, J. L.; RODIER, M. H. Treatment of plastic and extracellular matrix components with chlorhexidine or benzalkonium chloride: effect on *Candida albicans* adherence capacity in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 281-287, 2003.

JAWETZ E. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução Eduardo Cesar Tondo. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 543-582

JONES, R. D.; JAMPANI, H. B.; NEWMAN, J. L.; LEE, A. S. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. **American Journal of Infection Control**. 28, 184-96, 2000.

KAYLON, B. D.; OLGUN, U. Antibacterial efficacy of triclosan-incorporates polymers. **American Journal of Infect Control**, v.29, n. 2, p. 124-125, 2001.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. São Paulo, 2004.

KORTING, H. C.; HÜBNER, K.; GREINER, K.; HAMM, G.; BRAUN-FALCO, O. Differences in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparations of pH 5,5 and pH 7,0. **Acta Dermato Venereologica**. 14:101-4, 1990.

KORTING, H. C.; BRAUN-FALCO, O. The effect of detergents on skin pH and its consequences. **Clinical Dermatology**. 14:23-7, 1996.

LAGES, S. L.; RAMAKRISHNAN, M. A.; GOYAL, S. M. In-vivo efficacy of hand sanitisers against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. **Journal of Hospital Infection**. 68(2):159-63, 2008.

LINDSTRÖM, A.; BÜRGE, I. J.; POIGER, T.; BERGQVIST, P. A.; MÜLLER, M. D.; BUSER, H. R. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 2322–2329, 2002.

LITZ, V. M.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; PILOTTO, F. Antissepsia de mãos na indústria de carnes: avaliação da clorhexidina, triclosan e iodóforo na redução da contaminação microbiana em manipuladores. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35: 321 - 326, 2007.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**. 234: 634-640, 2002.

LUNDMARK, L. The evolution of liquid soap. **Cosmetics & Toiletries**, v.107, p. 49-53, 1992.

MCGOWAN, J. E. JR. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **American Journal of Infection Control**. 34: (Suppl1): S29-S37, 2006.

MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 531-532, 1998.

MING, X.; NICHOLS, M.; ROTHENBURGER, S. *In vivo* antibacterial efficacy of MONOCRYL plus antibacterial suture (Poliglecaprone 25 with triclosan). **Surgery Infections**. (Larchmt) 8, 209-14, 2007.

MOREIRA, A. C. A.; PEREIRA, M. H. Q.; PORTO, M. R.; ROCHA, L. A. P.; NASCIMENTO, B. C.; ANDRADE, P. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v.8, n.2, p.153-161, mai./ago. 2009.

MORITA, A. T.; ZAMBERLAN, R. D. T.; SHIMIZU, R. N.; PALMEZAN, E.; DEMARQUETTE, N. R. Avaliação do método da gota pendente para determinação da tensão superficial de líquidos de baixos pesos moleculares e polímeros fundidos. **Congresso brasileiro de engenharia e ciência dos materiais**, Anais, 14, São Pedro – SP, 2000.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

ORTOFARMA. Procedimento operacional padrão: sugestão de procedimento para determinação da viscosidade no Copo Ford. **Ortofarma Laboratório de Controle de Qualidade**. Matias Barbosa – MG. Disponível em < <http://www.ortofarma.com.br/site/index.php>>. Acesso em 28 fev. 2013.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(2): 301-307, Abr./Jun. 2008.

PASSOS, MARIA HELENA C. R; KUAYE, ARNALDO Y. Relato de surto de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus*: importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista Instituto Adolfo Lutz**; 56(1):71-6, 1996.

PASTORIZA, L.; CABO, M. L.; BERNARDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; HERRERA, J. R. Combined effects of modified atmosphere packaging and lauric acid on the stability of pre-cooked fish products during refrigerated storage. **European Food Research and Technology**, v. 215, p.189–193, 2002.

PAUL, K. B.; HEDGE, J. M.; BANSAL, R.; ZOELLER, R. T.; PETER, R.; DEVITO, M. J.; CROFTON, K. M. Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal, and early neonatal thyroxine: a dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. **Toxicology**. Oct 9; 300(1-2):31-45, 2012. Disponível em <<http://sbc-cosmetologia.com.br/toxicologia-triclosan.php>>. Acesso em 21 dez. 2012.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p. 181-186, 2000.

PERESI, JACQUELINE TANURY MACRUZ; ALMEIDA, IVETE APARECIDA ZAGO CASTANHEIRA DE; TEIXEIRA, INARA SIQUEIRA DE CARVALHO; LIMA, SONIA IZAURA DE; CARNICEL, FÁTIMA APARECIDA; HOFFMANN, FERNANDO LEITE. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro

de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista Instituto Adolfo Lutz**; 63(2):232-237, jul.-dez. 2004.

PEREIRA, T. L. **Reologia Aplicada nas Indústrias: Farmacêutica, Alimentícia, Cosmética e Química**. 2005. Disponível em: <<http://amigonerd.net/biologicas/farmacia/reologia-aplicada-nas-industrias-farmaceutica-alimenticia-cosmetica-e-quimica>>. Acesso em 09 de fev. 2013.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Estética-cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Organização Andrei, 1998. p.88-90.

PIDDOCK, L. J. V.; WRAY, C.; MCLAREN, I. Quinolone resistance in *Salmonella* spp.: veterinary pointers. **The Lancet**. v. 336, p.125, 1990.

RENSING, C.; MITRA, B.; ROSEN, B. P. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 94: 14326-14331, 1997.

ROTTER, M.; SATTAR, S.; DHARAN, S.; ALLEGRANZI, B.; MATHAI, E.; PITTET, D. Methods to evaluate the microbicidal activities of hand-rub and hand-wash agents. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 191 e 199, 2009.

ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology Reviews**. v. 51, p. 365-379, 1987.

SADER, H. S.; MENDES, R. E.; GALES, A. C.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **Journal of Pneumology**. 27(2) – mar-abr de 2001.

SCHMID, M. H.; KORTING, H. C. The concept of the acid mantle of the skin: its relevance for the choice of skin cleansers. **Dermatology**. 191:276-80, 1995.

SCHWEIZER, H. P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 1, p. 1-7, 2001.

SIMÕES, R. C. S.; MERLINI, S. P.; SILVA, R. P. R.; BASTOS, R. S.; TORRES, S. A.; BASTOS, J. R. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. **Revista Brasileira de Odontologia**. Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 91- 4, jan./jun. 2011.

STICKLER, D. Biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 2, p. 270-275, 1999.

STONE, L. S.; ZOTTOLA, E. A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**. v. 50, p. 957-960, 1985.

TAN, L.; NIELSEN, N. H.; YOUNG, D. C.; TRIZNA, Z. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. Use of antimicrobial agents in consumer products. **Archives of Dermatology**. 138(8):1082-6, 2002.

TANOMARU, J. M. G.; NASCIMENTO, A. P.; WATANABE, E.; MATOBA-JÚNIOR, FUMIO; TANOMARU-FILHO, M.; ITO, I. Y. Antibacterial activity of four mouthrinses containing triclosan against Salivary *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 569-572, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 57-65; 101.

UNIÃO EUROPEIA. Jornal Oficial da União Europeia. Legislação 75 (L075) de 23 de março de 2010. **Decisão da Comissão de 19 de Março de 2010**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/JOIndex.do>>. Acesso em 20 de mar. 2013.

United States Pharmacopeia, USP29–NF24 pg. 2197. Pharmacopeial Forum: Volume N° 31(5) pg. 1408. Disponível em: <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m85150.html>. Acesso em 20 de jan. 2013.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 163-171, 2002.

WILLIAMS, M. D.; WILKINS, S. T. **Bergey's. Manual of Determinative Bacteriology.** 9th ed., Baltimore; 1994.

ZAFAR, A. B.; BUTLER, R. C.; REESE, D. J.; GAYDOS, L. A.; MENNONNA, P. A. Use of 0.3 % triclosan (Bacti-Stat) to eradicate an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal nursery. **American Journal of Infection Control.** Volume 23, Issue 3, June 1995, Pages 200–208.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial films in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology.** Amsterdam, v. 23, p. 125-148, 1994.

ANEXOS

ANEXO I

Cálculo da viscosidade dos sabonetes em centistokes.

Amostras	Tempo de escoamento em segundos (t).	Viscosidade em centistokes (V) - Orifício 4: fórmula $V=3,85(t-4,49)$	Viscosidade em centistokes (V) - Orifício 5: fórmula $V=12,1(t-2)$	Média
1A	65,655		770,2255	775,96
1B	66,603		781,6963	
2A	53,139		618,7819	611,87
2B	51,997		604,9637	
3A	68,564		805,4244	793,44
3B	66,583		781,4543	
4A	73,977	267,52495		268,06
4B	74,254	268,5914		
5A	63,239		740,9919	728,44
5B	61,164		715,8844	
6A	99,398	365,3958		355,46
6B	94,236	345,5221		

ANEXO II

Cálculo do pH dos sabonetes.

Amostras	pH	Média
1A	6,19	6,2
1B	6,21	
2A	6,78	6,78
2B	6,78	
3A	6,07	6,07
3B	6,08	
4A	6,4	6,43
4B	6,46	
5A	6,54	6,55
5B	6,57	
6A	5,95	5,95
6B	5,96	

ANEXO III

Cálculo da densidade dos sabonetes em g/mL.

Amostras	Peso M_0 (g)	Peso M_1 (g)	Peso M_2 (g)	Densidade (g/mL)	Média
1A	32,538	61,884	62,283	1,0135	1,0148
1B	31,238	61,071	61,553	1,0161	
2A	31,225	61,097	61,748	1,0217	1,0223
2B	32,477	61,795	62,47	1,023	
3A	31,88	62,29	62,752	1,0151	1,0131
3B	31,826	62,266	62,744	1,0157	
4A	31,282	61,071	61,755	1,0229	1,0233
4B	31,225	61,05	61,758	1,0237	
5A	32,464	61,813	62,431	1,021	1,0212
5B	32,456	61,764	62,396	1,0215	
6A	31,859	62,297	62,818	1,0171	1,0175
6B	31,828	62,252	62,797	1,0179	

ANEXO IV

Cálculo da tensão interfacial dos sabonetes em mN/m.

Amostras	Tensão Interfacial (mN/m)	Média
1A	14,12	14,42
1B	14,73	
2A	22,55	23,94
2B	25,33	
3A	26,56	26,7
3B	26,84	
4A	26,85	26,89
4B	26,93	
5A	26,54	26,59
5B	26,64	
6A	19,71	20,47
6B	21,24	

ANEXO V

Cálculo da concentração microbiana final após a adição de 5 mL de uma solução contendo triclosan a 1 % (m/v) e 50 µL da suspensão contendo os micro-organismos aos tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Muller-Hinton.

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

onde:

C_i = concentração microbiana inicial

C_f = concentração microbiana final

V_i = volume inicial

V_f = volume final

$$C_i = 1,0 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$$

$$C_f = ?$$

$$V_i = 50 \text{ µL} = 0,05 \text{ mL}$$

$$V_f = 10 \text{ mL}$$

$$1,0 \times 10^8 \cdot 0,05 = C_f \cdot 10$$

$$C_f = 5,0 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$$

ANEXO VI

Cálculo da variação (Δ) do teor de triclosan nos sabonetes antissépticos em relação à concentração indicada nos rótulos dos sabonetes antissépticos (0,5 % (m/m)).

$\Delta = [(Concentração \text{ de Triclosan Encontrada (\%)} \times 100 (\%)) / Concentração \text{ de Triclosan no Rótulo da Embalagem (\%)}] - 100$

$$\Delta_1 = [(0,674 \times 100) / 0,5] - 100 = + 34,80$$

$$\Delta_2 = [(0,658 \times 100) / 0,5] - 100 = + 31,60$$

$$\Delta_3 = [(0,528 \times 100) / 0,5] - 100 = + 5,60$$

$$\Delta_4 = [(0,526 \times 100) / 0,5] - 100 = + 5,20$$

$$\Delta_5 = [(0,451 \times 100) / 0,5] - 100 = - 9,80$$