

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÁLCOOL ETÍLICO CONTRA BACTÉRIAS HOSPITALARES MULTIRRESISTENTES

**KEVIN EDUARDO PALHARES¹; ALLISON CARLOS ASSUNÇÃO SILVA²;
PEDRO RASSIER SANTOS³; ROSANA BASSO KRAUS⁴; MARISA CASTRO
JARA⁵; PATRÍCIA SILVA NASCENTE⁶**

¹Universidade Federal de Pelotas – kevinpalhares4@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – allisonassun10@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rassier1907@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rosana_basso_kraus@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – marisajara@terra.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – patsn@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas pois reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas (COSTA & JUNIOR, 2017). Devido ao desenvolvimento de multirresistência aos atuais antimicrobianos as infecções bacterianas tem aumentado consideravelmente em ambiente hospitalar e tornaram-se um problema de saúde publica em todo o mundo (FARIA *et al.*, 2016). A nível mundial, 25% das mortes ocorridas são decorrentes de infecções e 1,4 milhões de pessoas, sofrem de infecções adquiridas em hospitais (PAIM *et al.*, 2014; BASSO *et al.*, 2016), nesse cenário, os desinfetantes e antissépticos são ferramentas importantes para o controle e prevenção de infecções em hospitais, ambulatórios, clínicas e consultórios (OMS, 2009). Como muitas bactérias tem um curto tempo de geração, o qual pode ser de minutos, elas conseguem responder rapidamente a mudanças ambientais, tornando-se resistentes. A resistência que pode ocorrer também a nível de desinfetantes e antissépticos é inevitável, tendo em vista a natural adaptação da célula bacteriana ao agente químico, por exemplo (SANTOS, 2004).

O álcool etílico 70% é frequentemente utilizado para evitar a proliferação e contaminação de microrganismos, sendo considerado um agente microbicida de nível intermediário, segundo a classificação do Center of Diseases Control and Prevention, e comumente o mais aceito pelo seu custo benefício em relação aos outros produtos disponíveis no mercado (GRAZIANO *et al.*, 2013). Pensando nisso, torna-se imprescindível a realização de testes periodicamente para observar a ação desses antissépticos nas bactérias presentes no ambiente. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do álcool etílico contra bactérias hospitalares multirresistentes.

METODOLOGIA

Amostras:

Para os testes microbiológicos foram utilizadas bactérias multirresistentes de origem hospitalar estocadas no Laboratório de Micologia e Bioprospecção do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do IB, com resistência a pelo menos três classes de antibióticos. O uso de amostras hospitalares para fins científicos encontra-se respaldado por aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) nº: 2.961.379. 2.985.372 e pela Comissão Nacional Ética em Pesquisa (CONEP) nº: 2.880.831

Os micro-organismos armazenados em refrigeração foram semeados em meio Ágar Müller-Hinton e incubado a 36°C por 24 h.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM):

A CIM foi determinada a partir da técnica de Microdiluição em Caldo (MC), de acordo com o CLSI, 2006 (Protocolo M7-A6), para bactérias, adaptado para o agente antisséptico (Álcool etílico absoluto PA 99,5% - Synth), o qual foi solubilizado em caldo Müller-Hinton de forma a se obter a concentração inicial de 70%. Placas estéreis foram previamente preenchidas com 100 µL de caldo Müller-Hinton; em seguida acrescentou-se o composto antisséptico nos poços correspondentes a segunda coluna, realizando-se em seguida dez sucessivas microdiluições (1:2), obtendo-se dessa forma uma faixa de concentração de 0,14 – 70%. Em seguida adicionou-se 5 µL do inóculo bacteriano em todos os poços, exceto nos da primeira coluna.

O teste foi realizado em duas duplicatas, em que a primeira e última coluna foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente

Após 24h na estufa a 36°C, a CIM foi determinada por método colorimétrico utilizando 60 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,015%, com posterior leitura de absorbância em 492 nm (EZ Read 400).

Determinação da Concentração Bactericida Mínima CBM:

Para obter a CBM, foi utilizada uma alíquota de 5 µL do poço da microplaca correspondente a CIM, bem como de poços anteriores a esse, as quais foram semeados em placa com meio de cultura Ágar Müller-Hinton e incubadas por 24h, de forma que se fosse possível determinar as concentrações que poderiam ser bactericidas.

Análise estatística:

Os resultados do perfil de absorbância foram tabulados em software excel para posterior análise estatística no GraphPad Prism 7.0, mediante Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida por teste Tukey para diferenciar os grupos, considerando estatisticamente significativo $p < 0,05$. Para melhor visualização dos resultados os dados foram expressos em %, utilizando a equação:

$$\text{Absorbância da concentração (%)}: \frac{\text{Absorbância do poço}}{\bar{x} \text{ absorbância controle positivo}} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O álcool etílico mostrou uma boa atividade bacteriostática com faixa de ação de 1,09 – 70%, dois isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter cloacae* mostraram-se mais sensíveis, com valor da CIM em 1,09%; enquanto *Staphylococcus aureus* e um isolado de *Acinetobacter baumannii* apresentaram menor sensibilidade ao mesmo, com a CIM de 8,75 e 4,38%, respectivamente (**tabela 01**). Acreditamos que esses diferentes resultados, especialmente para os isolados de *Acinetobacter baumannii*, podem refletir o diferente perfil de resistência a antimicrobianos apresentado por cada isolado, bem como devido a fatores intrínsecos de cada isolado e espécie. Por outro lado, mesmo na concentração mais alta e com conhecida atividade bactericida, o álcool etílico 70% não mostrou-se eficiente para causar a morte das bactérias aqui descritas.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana *in vitro* de antisséptico (álcool etílico) em diferentes concentrações contra bactérias multirresistentes de origem hospitalar.

Isolados bacterianos	Concentração Inibitória Mínima (%)	Concentração Bactericida Mínima (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i> ^{1e2}	1,09	--
<i>Acinetobacter baumannii</i> ³	2,19	--
<i>Acinetobacter baumannii</i> ⁴	4,38	--
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,09	--
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,19	--
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,75	--

Andrade *et al.*, (2007) em pesquisa realizada na Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP, utilizando álcool gel 70% contra bactérias hospitalares mediante o emprego da metodologia de gotejamento, obtiveram atividade antibacteriana frente a todos os isolados, incluindo *Staphylococcus aureus*, destaca-se que os resultados aqui descritos abordam uma diferente metodologia a qual emprega álcool 70% adicionado em meio nutritivo, situação que ocorre apenas em poucas situações reais, não sendo a majoritária encontrada em ambientes hospitalares, por exemplo.

Em outro estudo realizado com profissionais de saúde vinculados a 2 hospitais da cidade de Teresina - PI, avaliou-se a eficácia de alguns produtos antissépticos como o álcool etílico 70% e álcool gel 70% nas mãos desses profissionais. Como resultado, foi possível observar uma bem sucedida diminuição das UFC's para ambos, sendo o álcool gel 70% o mais promissor, uma vez que proporcionou uma redução de até 93,80% nas UFCs (ROSADO & SILVA, 2016).

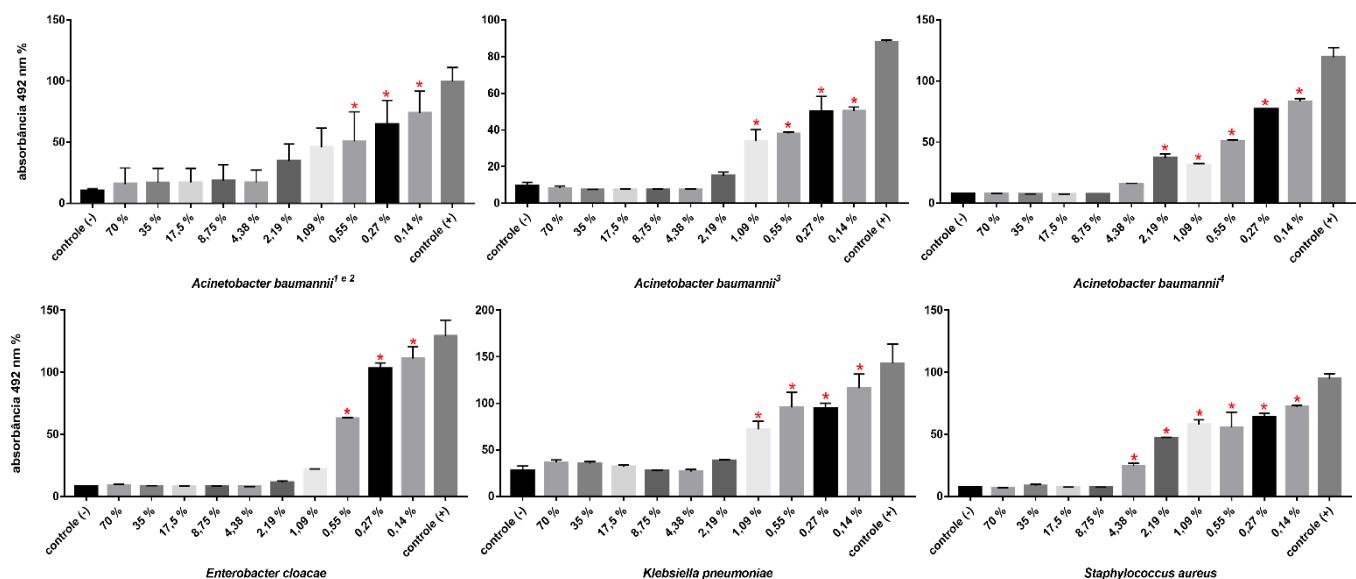


Gráfico 01: Porcentagem de absorbância em função do comprimento de onda (492 nm) emitido pelo corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT), para diferentes faixas de concentração de álcool etílico testadas *in vitro* contra bactérias multirresistentes.

No gráfico acima, é possível observar a absorbância de CTT em função das diferentes concentrações de álcool etílico testadas *in vitro* contra bactérias multirresistentes, em que é possível se observar claramente a CIM. As colunas que apresentam um asterisco na parte superior, suas respectivas absorbâncias mostraram uma diferença estatisticamente significativa em relação a apresentada

pelo controle negativo. É possível observar claramente que as doses maiores de álcool etílico resultaram em uma menor absorbância, a qual reflete um menor percentual de bactérias capazes de metabolizar o corante e como consequência, gerar a coloração mensurada.

4. CONCLUSÕES

Os resultados aqui descritos mostram que o álcool etílico apresentou atividade bacteriostática, mesmo em concentrações baixas, contra bactérias multirresistentes de origem hospitalar. Não observou-se atividade bactericida mesmo para a maior concentração empregada. Acreditamos que os resultados possam refletir a metodologia usada e que a mesma reflete poucas situações reais, o que mostra a necessidade do emprego de outras metodologias para ampliar os resultados aqui descritos e validá-lo em outras situações, como por exemplo, aquelas em que se usa um agente antisséptico sem o fornecimento de um meio nutritivo para as bactérias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, D. De *et al.* (2007) 'Atividade antimicrobiana in vitro do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade', *Medicina (Ribeirão Preto)*, 40(2), pp. 2–6.
- Basso, M. E. *et al.* (2016) 'Prevalência de infecções bacterianas em pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI) Prevalence of bacterial infections in patients admitted to an intensive care unit', *RBAC*, 48(4), pp. 383–388..
- CLSI. (2006). 'Clinical and Laboratory Standards Institute', *M2a9* (Vol. 23).
- Costa, A. L. P. da and Junior, A. C. S. S. (2017) 'Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública : uma breve revisão de literatura', *Estação Científica (UNIFAP)*, 7(2), pp. 45–57.
- Faria, T. V. de, Pessalacia, J. D. R. and Silva, E. S. da (2016) 'Fatores de risco no uso de antimicrobianos em uma instituição hospitalar: reflexões bioéticas', *Acta Bioethica*, 22(2), pp. 321–329.
- Graziano, M. U., Souza, R. Q. De and Lascala, C. A. (2013) 'Artigo Original Eficácia da desinfecção com álcool 70 % (p / v) de superfícies contaminadas sem limpeza prévia', *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 21(2).
- OMS – Organização Mundial de Saúde. 'WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care'. Geneva: WHO, 2009.
- Paim, R. S. P., Lorenzini, E. and De (2014) 'Estratégias para prevenção da resistência bacteriana: contribuições para a segurança do paciente', *Revista CUIDARTE*, 5(2), pp. 757–764.
- Rosado, A. V. and Silva, F. L. da (2016) 'Evaluating the effectiveness of antiseptics in the hands of health professionals', *Rev. Saúde em Foco*, 3(1), pp. 01–19.
- Santos, N. de Q. (2004) 'A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar', *Texto Contexto Enferm 2004*; 13, pp. 64–70.