

Serviço

APLICAÇÃO DO CLORETO DE BENZALCÔNIO EM CENTRO CIRÚRGICO: ALGUMAS EXPERIÊNCIAS EM LABORATÓRIO

* *Terezinha Costa Carvalho Parlato*
** *Larceny Moreira Vital*

1. INTRODUÇÃO:

Por ocasião do I Encontro de Enfermeiras de Centro Cirúrgico, realizado durante a Semana da Enfermagem, em 1969, no auditório da Johnson & Johnson do Brasil (em São Paulo), assistimos a palestras que versaram sobre esterilização física e química.

Tornou-se evidente a divergência de opiniões sobre o uso de agentes químicos, métodos e técnicas empregadas em diversos hospitais. Sentimos nessa ocasião a necessidade de conhecer a atuação dessas diferentes classes de substâncias químicas, citadas na tabela de Spaulding, que as diferencia por níveis de desinfetantes, e que eram usados no Hospital das Clínicas. Em vista dessas palestras, o Serviço de Enfermagem do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em contato com o Departamento de Biologia da Johnson & Johnson, providenciou um estágio para enfermeiras nesse Departamento. A fim de atender a esta atividade, foram designadas pela Diretoria do Serviço de Enfermagem duas enfermeiras das Unidades de Enfermagem e uma de Centro Cirúrgico.

No início o estágio consistiu em práticas e técnicas microbiológicas, que teve por finalidade nos familiarizar com os métodos empregados por aquele Departamento, o que nos possibilitou iniciar um trabalho de pesquisa experimental.

Face à incidência de infecções cruzadas nos hospitais, ressaltamos por intermédio deste trabalho o uso seguro e adequado

* Enfermeira de Centro Cirúrgico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

** Enfermeira de Clínica Cirúrgica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

de agentes químicos que deveriam ser empregados como desinfetantes, antissépticos e esterilizantes.

Tratando-se de agentes químicos em uso num grande hospital, como é o Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, onde a maioria dos produtos são preparados, na Seção de Química Industrial, existe a fácil aquisição dos mesmos e conseqüentemente, isto dificulta a escolha adequada para uma determinada aplicação.

Baseados em dados laboratoriais obtidos em pesquisas bibliográficas, poderíamos concluir como deveriam ser aplicadas estas substâncias e como são limitadas suas atividades sobre os microorganismos. Contudo, resultados laboratoriais incompletos, ocasionariam interpretações precipitadas, não concluindo sobre as atividades anti-microbianas, isto é, bactericida ou bacteriostática.

Chamamos a atenção para êsse aspecto, pois podemos ficar confundidos ante o aparecimento de tantos agentes químicos, cujo nome comercial e apresentação, muitas vezes não nos convence. Desnecessário se torna para nossos propósitos, nos alongarmos neste aspecto, pois os testes bacteriológicos por nós realizados confirmam o que descrevemos anteriormente.

O presente trabalho tem por finalidade esclarecer estas dúvidas e também aprimorar técnicas, que certamente virão beneficiar as atividades nos mais diversos setores dos hospitais.

Dos vários agentes químicos testados, como sejam: Tego (r), Germekil (r1), Oxianeto de Mercúrio (r2), Cidex (r3) e outros, escolhemos para o presente estudo um composto quaternário de amônia, o Cloreto de Benzalcônio.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO:

Indagávamos há um ano atrás: será o Cloreto de Benzalcônio um agente químico esterilizante? Poderemos continuar a usá-lo com esta finalidade?

Na seqüência deste trabalho, procuramos afirmar conclusivamente, em concordância com os mais diversos autores, entre estes Spaulding, quanto ao emprego de produtos desta classe (Compostos quaternários de amônia).

(r) Tego — T. H. Goldschmit-A-G, Essen/Alemanha

(r1) Germekil — Laboratório Darrow

(r2) Oxianeto de Mercúrio — Henry Farma Produtos Químicos

(r3) Cidex — Divisão Ethicon, Johnson & Johnson

3. CONSIDERAÇÕES SÔBRE COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIA:

3.1. Agentes ativos de superfície:

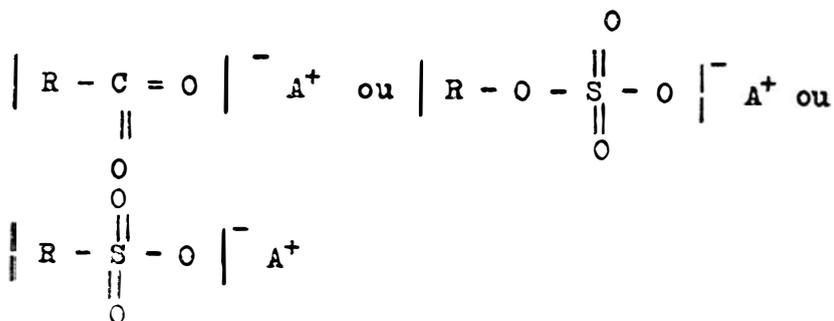
São substâncias que modificam a tensão superficial, influenciando, portanto, no grau de dispersão, a difusão, a umectação, embebição ou a penetração, assim como a forma de líquidos que são colocados em contato com outros líquidos, destes com sólidos ou com gases.

Eles precipitam, desnaturam ou formam complexos com proteínas, podendo exercer atividades citolíticas, bactericida, etc...

São classificados como: Aniônicos, Catiônicos e Não iônicos, conforme variação da atividade encontrada nos sais que têm um ion de maior peso molecular que outro, em relação com os complexos ionizados formados entre agentes químicos e microorganismos.

A. Compostos aniônicos:

Contém uma parte hidrofóbica (oleosolúvel). Pertencem a esse grupo: sal doméstico, louril-sulfato sódico, amidas sulfatadas e outros. A intensidade de ação aumenta quando o pH baixa.

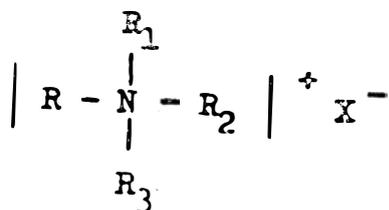


B. Compostos catiônicos:

Contém o grupo hidrofóbico, porém possuem um grupo hidrofílico carregado positivamente, podendo ser um composto quaternário de amônia (cloreto de benzalcô-

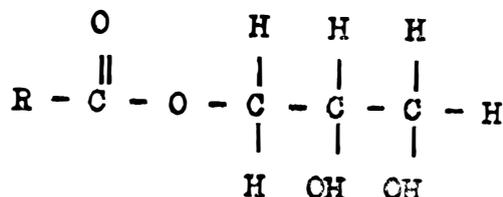
nio), ou antibiótico polipeptídicos, (tirotricina, gramlicidina).

A intensidade de ação aumenta quando o pH se eleva.



C. Compostos não iônicos:

Possuem a parte hidrofóbica equilibrada por um grupo hidrofílico, como o óxido de etileno polimerizado, ou um álcool poliídrico. Pertencem a esse grupo o Tween 80, um polioxialquil derivado do monooleato de Sorbitan e outros ésteres polioxietilênicos como o Triton WR 1339.



3.2. Generalidades:

Os compostos quaternários de amônia pertencem a uma classe especial de desinfetantes químicos caracterizados como um grupo de aminas que podem ser sintetizados para dar compostos de nitrogênio com o último radical tendo a valência 5. São agentes catiônicos.

As aminas podem ser consideradas como substitutos das amônias; assim o amônio quaternário composto é considerado como substituto de sais de amônia.

Os compostos quaternários são preparados pela condensação de uma amina terciária e um sal alquil. A amina terciária pode ter uma variedade de alquil ou grupos de aril como substituindo para um átomo de hidrogênio da amônia ou ainda uma amina aromática semelhante a piridina.

Portanto, o número de compostos que podem ser preparados é bastante elevado, porém, somente com valor desinfetante. Representa bem, como droga principal deste grupo, o cloreto de benzalcônio (Zefiran*), usado nas soluções de 1% ou 1^o%. Os agentes catiônicos agem rapidamente e não são praticamente irritantes: são queratolíticos e emulsionantes. Quando aplicado sobre a pele, formam em geral uma película cuja face em contato com o tegumento tem fraco poder germicida.

Como catiônico, o cloreto de benzalcônio apresenta incompatibilidade com os agentes aniônicos, como os sabões. Relativamente atóxicos os compostos quaternários de amônia, quando aplicados sobre a pele, embora a toxicidade aguda e crônica quando administrados por via oral a animais, seja baixa, o seu uso parenteral pode produzir ações sistêmicas graves. Deve-se, portanto, evitar seu emprego em lavagens de cavidades orgânicas.

Atuam mais sobre bactérias gram + e menos sobre gram —; embora tenham ação também sobre fungos, protozoários e vírus, não os matam, tampouco destroem esporos; não podem ser usados como esterilizantes.

A. Mecanismo de ação:

Parecem interferir com os mecanismos enzimáticos das bactérias. Suas atividades antibacterianas se devem a reatividade química e sua adsorvilidade. Os efeitos tóxicos desses agentes são devidos a sua ação química sobre estruturas celulares, especialmente a membrana celular, impedindo o escoamento de constituintes citoplasmáticos para o exterior da célula, bem como, selecionam a entrada de nutrientes para o interior da mesma.

Assim, qualquer agente químico que danifique a membrana semi-permeável, por alteração de sua estrutura físico-química, tende a produzir uma desorganização geral da fisiologia celular.

B. Influência do ambiente químico:

Uma substância em geral, pode afetar os microorganismos da seguinte forma:

(*) Adsorção dos CQA — A propriedade de concentrar-se na superfície dá a esses agentes seu quase único valor para desinfetante de superfície, para preparação da pele no pré-operatório, etc... Os ions ativos são adsorvidos rapidamente.

- a) servindo como nutriente e assim possibilitando o seu crescimento;
 - b) impedindo o seu crescimento num meio — efeito bacteriostático;
 - c) produzindo morte do microorganismo — efeito bactericida.
- C. Fatores gerais que em conjunto afetam os componentes e o processo:**
- a) temperatura;
 - b) fenômenos de superfície, especialmente adsorção, tensão superficial, alterações de permeabilidade e difusão;
 - c) concentração hidrogeniônica;
 - d) presença de outros eletrólitos que influenciam a ionização do agente químico e as propriedades das células;
 - e) presença de substância orgânica, especialmente proteínas que podem reagir com a substância ou formar películas protetoras nos microorganismos reduzem em geral a ação do desinfetante;
 - f) pressão;
 - g) tempo.

3.3. Cloreto de benzalcônio:

Nome Registrado: Zefirol (*) e cloreto de Zefirol.

Inscrito na Farmacopéia Brasileira; mistura de cloreto de alquildimetilbenzilamônio em que o R da fórmula em geral representa uma mistura de alquilas. É um pó branco ou branco amarelado, amorfo ou em forma de massa gelatinosa de odor aromático, sabor amargo, muito solúvel em água, álcool e acetona, praticamente insolúvel no éter e levemente no benzeno.

Coeficiente fenólico: 300.

No comércio apresenta-se nas formas de solução (aquosa) e tinturas (solução em álcool, água e acetona) a 1% e creme a 1:10.000.

Matérias primas para a sua preparação: metilbenzilamina e o Lorol (álcool correspondente ao ácido láurico).

Mistura de álcoois obtidos por hidrogenação de ácidos graxos extraídos de gorduras vegetais, principalmente de

(*) Zefirol — Laboratório Bayer.

coco. Trata-se o lorol com o cloreto de tionila e faz-se o cloreto de ácido resultante condensar com a metilbenzila-
mina; em seguida quarterniza-se o produto assim obtido
com o cloreto de metila.

Devido a carga positiva do nitrogênio quaternário êsses
compostos são incompatíveis com substâncias como os sa-
bões, sais aniônicos, geralmente formando compostos in-
solúveis.

A ação diminuidora da tensão superficial apenas atua fa-
cilitando as relações de contato com a superfície a de-
sinfetar e não como agente bactericida. A ação antibacte-
riana é reduzida grandemente em presença de matéria or-
gânica (sôro, sangue, pús, etc...).

Uso: desinfecção da pele (campo operatório, pequenas fe-
ridas e escoriações), tratamento de processos infecciosos
cutâneos, vaginais, oculares, vesicais. (Indicação do fabri-
cante). Desinfecção de algum instrumental cirúrgico, son-
das de borracha, máscaras, umidificadores, ou seja, obje-
tos que somente entrem em contato com a pele intacta
(Indicação de Spaulding).

3.4. **Relação de autores que efetuaram estudos relativos aos compostos quaternários de amônia:**

- 3.4.1. Einhorn — 1905. Uso como antisséptico: desin-
fecção cirúrgica e geral.
- 3.4.2. Kahn — 1911. Reycheer — 1913. Síntese e refe-
rências limitadas a atividade antimicrobiana dos
compostos quaternários de amônia.
- 3.4.3. Wetzel — 1935 -- Uso na limpeza cirúrgica das
mãos estudo de um dos compostos superior ao
uso do álcool;
- 3.4.4. Schmidt — 1935 Caesar, 1935, Seeman — 1935,
Rodercurt — 1934, descreveram o sucesso do uso
dessas soluções em Ginecologia e instrumental ci-
rúrgico;
- 3.4.5. Heineman e outros (1937, atividade sôbre fungos
(fungicida); Dunn (1936), atividade contra uma
variedade de fungos;
- 3.4.6. Fair e colaboradores (1945), Kessel e Moore (1946)
destruição de cistos de Entamoeba histolytica;
Johnson e Trussel (1943), Quisno e Foter (1946),
atuação nas Trichomonas vaginais; Morgan
Campbel (1946), Lawrence (1946), destruição da
Tr. foetus;

- 3.4.7. Hotchkiss (1946), desprendimento de N e P da célula; Galton (1951), desprendimentos: constituintes da célula e que parte da ação germicida devido a ação tardia dos CQA;
- 3.4.8. Lawrence (1950), Glassmann (1948), revisão desses compostos considerando propriedades químicas, físicas, biológicas e aplicação como antisséptico;
- 3.4.9. Tamasik (1955), danificação e desnaturação da membrana citoplasmática e citoplasma das células bacterianas, pelo composto;
- 3.4.10. Dawson e alli (1953), microscópio eletrônico efeito sobre Staphilococcus Aureus: ação na célula e membrana;
- 3.4.11. Kundsinn (1960), Halacka e Neswal (1962), citam uso como agente antimicrobiano, porém pouco usado e conhecido;
- 3.4.12. D'Arcy e Taylor (1962), atividades farmacodinâmicas, bloqueador de agentes iônicos e propriedades antimicrobianas;
- 3.4.13. Klein e De Forest (1963, 1965), Cloreto Benzalcônio 1%: inativou viroses lipofílicas: Herpes simples, vaccínia, Ásia — tipo influenza e Adenovírus;
- 3.4.14. Arostrong e Froelich (1964), Cloreto de Benzalcônio, inativa, virus da influenza, sarampo, hidrofobia, varíola.

4. MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS EMPREGADOS:

4.1. Microorganismos:

Os bastonetes esporulados dividem-se habitualmente em dois gêneros:

- o gênero *Bacillus* que consiste em aeróbios estritos e anaeróbios facultativos;
- o gênero *Clostridium*, que consiste em anaeróbios estritos. Não somente são incapazes de crescer em presença de oxigênio livre, como também, este elemento lhes é altamente tóxico, exceto quando estão no estado de esporos.

- 4.1.1. **Bacilo Subtilis** — Aeróbio esporogênico — Gram-positivo. Bastonetes retos de 2 a 8 micra de comprimento por 0,7 micra de largura. Os esporos estão situados mais próximos a uma das extremidades.

Formam cadeias longas e os esporos só existem nestas cadeias.

- 4.1.2. **Clostridium Sporogenes:** descrito definitivamente por Metchnikoff em 1908. É um bacilo anaeróbio, gram-positivo muito móvel, formando esporos ovais subterminais;
- 4.1.3. **Stafilococcus Aureus:** é um coco esférico cujo diâmetro médio é 0,8 micra. Gram-positivo, podendo ocorrer, no meio dos cachos algumas formas gram-negativas. Não formam cápsulas nem esporos. Devido a frequência e importância dos estafilococos nas infecções piogênicas, traumáticas e cirúrgicas, foi utilizado em nossos testes.
- 4.1.4. **Escherichia coli:** bastonetes gram-negativos de 2 a 3 micra de comprimento por 0,6 micra de largura apresentando ocasionalmente formas filamentosas.

4.2. Método bacteriológico padrão:

Prova para determinar a ação esporicida: (A.O.A.C. 1966)*

Este método se aplica a desinfetantes ou esterilizantes líquidos ou gasosos, miscíveis em água para determinar a presença ou ausência de atividade esporicida.

Os testes cujos resultados iremos apresentar foram efetuados nas concentrações mais usadas e estão classificados conforme quadro abaixo.

Outros testes foram realizados, porém omitidos deste trabalho, devido ao seu pequeno valor.

CONCENTRAÇÃO E NÚMERO DE PROVAS EFETUADAS

CLORETO DE BENZALCÔNIO	NÚMERO DE PROVAS EFETUADAS	TABELAS
1/1000	1	A
1/100	5	B
5/100	2	C
Cl. Benz. fluidos biológicos	2	D e D'
Cl. Benz. Neutralizante	3	E

(*) Official Methods of analysis of the association of official agricultural Chemists.

5. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE AÇÃO ESPORICIDA:**5.1. Descrição do método para testar a ação esporicida do cloreto de Benzalcônio a 1°/oo:****5.1.1. Finalidade:**

Este método foi elaborado para testar a ação do cloreto de Benzalcônio contra esporos bacterianos.

5.1.2. Microorganismos e meio de cultura:**A. Microorganismos usados:**

Clostridium Sporogenes
Bacilus Subtilis

B. Meios de cultura:

Eugon Broth (Difco)
Fluid Thioglicolate Medium (Difco)

5.1.3. Material necessário:

- Tubos de pirex 25x200mm.
- Placas de Petri 15x20mm. forradas com papel de filtro.
- Pipetas de 10ml.
- Alça de platina e gancho (alça de 4mm. de diâmetro).
- Estantes — Solução de cloreto de Benzalcônio.
- Banho-maria.
- Alças de sutura — Alças padronizadas (3 voltas de fio de sêda n.º 3, equivalente, a 21/2 polegadas). Estas alças são colocadas em placas de Petri e esterilizadas a 121°C 15 lb. por 30 minutos.

5.1.4. Desenvolvimento do Teste — 1.ª Fase:

- Em 2 tubos 25x200mm. contendo 35 ml. de meio de cultura Eugon Broth e Thioglicolate Medium, inocular uma alçada de Bacilus Subtilis e Clostridium Sporogenes.
- Incubar por 72 horas a 37°C.
- Após êsse período de incubação. aquecer os tubos a 80°C durante 10 minutos a fim de serem eliminadas as formas vegetativas esporuladas menos resistentes.
- Colocar 5 alças de sutura em cada tubo contendo os esporos e esperar 15 minutos. Após êsse período de contato, retirar as alças com auxílio de um gancho e colocá-las em placas de Petri, estéreis, forradas com papel filtro.

Deixar secar à temperatura ambiente, durante 22 a 26 horas.

5.1.5. Desenvolvimento do Teste — 2.^a Fase:

- Colocar 10 ml. de cloreto de Benzalcônio 1% em 2 tubos de 25x200mm.
- Das alças de sutura (5) de cada microorganismo, colocar uma no meio de cultura, (Thioglicolate Medium) e uma no meio de cultura Eugon Broth, para controle.
- As 8 alças restantes colocar em contato com o cloreto de Benzalcônio.
- Após 10', 30', 1 hora e 2 horas de contato com o agente químico em teste, transferir as alças para os respectivos meios de cultura Thioglicolate Medium e Eugon Broth.
- Incubar por uma semana a 37°C.
- Os tubos controle devem apresentar abundante crescimento.

5.1.6. Contra Prova:

- Dos tubos que apresentam ausência de crescimento, transferir as alças de sutura para um novo tubo com meio de cultura.
- No tubo em que houve ausência de crescimento e do qual foi retirada a alça de sutura, inocular uma alçada do tubo controle.

5.1.7. Como interpretar os resultados:

- A. Ação esporicida.** São indispensáveis 3 condições:
- ausência de crescimento no tubo contendo alça de sutura;
 - ausência de crescimento no tubo para o qual foi transferida a alça de sutura;
 - presença de crescimento no tubo **a**, após ser reinoculado uma alçada do tubo controle.
- B. Ação bacteriostática.** São indispensáveis 3 condições:
- ausência de crescimento no tubo contendo meio de sutura e alça de sutura;
 - presença de crescimento no tubo ao qual foi transferida a alça de sutura;
 - ausência ou presença de crescimento no tubo

após ser reinoculado com uma alçada de tubo controle.

Quando houver ausência de crescimento pode-se concluir presença de ação inibidora do cloreto de Benzalcônio.

Quando houver presença de crescimento, pode-se concluir que o meio de cultura exerceu ação inativadora sobre o cloreto de Benzalcônio ou então a concentração residual do referido agente não foi suficiente para exercer qualquer atividade sobre o microorganismo.

Ação esporicida do cloreto de Benzalcônio a 1%

Tempo de contato	1. ^a prova		Contra prova		2. ^a prova		Contra prova	
	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. SP.	B. S.
10 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
30 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
1 hora	+	—	+	—	+	—	+	—
2 horas	+	—	+	—	+	—	+	—

(+) = crescimento

(—) = ausência de crescimento

NOTA: Os mesmos testes foram efetuados para verificação da ação esporicida do cloreto de Benzalcônio, em concentrações diferentes. As tabelas B e C indicam esses resultados.

Ação esporicida do cloreto de Benzalcônio a 1%

Tempo de contato	1. ^a prova		Contra prova		2. ^a prova		Contra prova	
	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. SP.	B. S.
10 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
30 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
1 hora	+	—	+	—	+	—	+	—
2 horas	+	—	+	—	+	—	+	—

(+) = crescimento

(—) = ausência de crescimento

Ação esporicida do cloreto de Benzalcônio a 5%

Tempo de contato	1. ^a prova		Contra prova		2. ^a prova		Contra prova	
	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.
10 min.	—	—	—	—	—	—	—	—
30 min.	—	—	—	—	—	—	—	—
1 hora	—	—	—	—	—	—	—	—
2 horas	—	—	—	—	—	—	—	—

(—) = ausência de crescimento

5.2. Cloreto de Benzalcônio a 1% + Neutralizante Tween 80:**5.2.1. Finalidade:**

Este método foi elaborado para neutralizar a ação residual do cloreto de Benzalcônio, sobre os microorganismos em teste.

5.2.2. Microorganismo e meio de cultura:**A. Microorganismos usados:**

- Clostridium Sporogenes
- Bacilus Subtilis

B. Meios de cultura:

- Eugon Broth (Difco)
- Fluid Thioglicolate Medium (Difco)

5.2.3. Material necessário:

- 4 tubos 25 x 200 mm.
- 12 tubos contendo meio de cultura.
- 3 erlenmayer
- 2 placas de Petri
- alça de platina e gancho
- alça de sutura
- solução neutralizante Tween 80
- solução de cloreto de Benzalcônio 1%

5.2.4. Desenvolvimento do Teste — 1.^a Fase:

- Colocar 5 ml. de Tween + 1,0 g. de Thioglicolato de sódio em 1 erlenmayer e completar com água destilada estéril até atingir 100 ml.. Esterilizar esta solução a 121° C durante 15 minutos.
- Colocar 9 ml. desta solução em um tubo e 10 ml. da solução de cloreto de Benzalcônio 1% em 2 tubos.

- Passar as 8 alças contaminadas com esporos das placas de Petri para os tubos contendo solução de cloreto de Benzalcônio.

Após 10' de contato transferir as alças para o tubo contendo a solução neutralizante. Após 10', 30', 1 h e 2 h de contato com a solução neutralizante, transferir as alças para os meios de cultura.

5.2.5. Desenvolvimento do Teste — 2.^a Fase (viabilidade do meio de cultura):

- Passar as alças contaminadas com esporos para os meios de cultura.
- Teste de neutralizante (ação bactericida ou bacteriostática).
- Deixar 2 alças contaminadas com esporos em contato com a solução neutralizante durante 2 horas; após, transferir para os meios de cultura.
- Incubar por uma semana a 37° C.

Ação esporicida do cloreto de Benzalcônio a 1% com neutralizante (++)

Tempo de contato	1. ^a prova		Contra prova		2. ^a prova		Contra prova	
	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.
10 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
30 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
1 hora	+	—	+	—	+	—	+	—
2 horas	+	—	+	—	+	—	+	—

(+) = crescimento

(—) = ausência de crescimento

(++) Tween

5.3. Cloreto de Benzalcônio a 1% + neutralizante (Duponol C):

5.3.1. Finalidade:

Em vista do resultado obtido com o neutralizante Tween 80 não ter sido satisfatório, o mesmo teste foi repetido com Duponol C na concentração idêntica ao cloreto de benzalcônio, isto é, 1%, e com Duponol C a 2,5%, ampliando-se a faixa dos tempos de contato.

**Ação esporicida do cloreto de Benzalcônio
a 1% com neutralizante (++)**

Tempo de contato	1. ^a prova		Contra prova		2. ^a prova		Contra prova	
	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. SP.	B. S.
10 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
20 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
30 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
1 hora	+	—	+	—	+	—	+	—
1:30 hs.	—	—	+	—	+	—	+	—
2 horas	—	—	+	—	+	—	+	—

(++) Duponol C 1%

**Ação esporicida do cloreto de Benzalcônio
a 1% com neutralizante (++)**

Tempo de contato	1. ^a prova		Contra prova		2. ^a prova		Contra prova	
	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. Sp.	B. S.	Cl. SP.	B. S.
10 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
20 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
30 min.	+	—	+	—	+	—	+	—
1 hora	+	—	+	—	+	—	+	—
1:30 hs.	+	—	+	—	+	—	+	—
2 horas	+	—	+	—	+	—	+	—

(++) Duponol C 2,5%

6. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE AÇÃO BACTERICIDA:

6.1. Cloreto de Benzalcônio a 1% em presença de fluidos biológicos:

6.1.1. Finalidade:

Este método foi elaborado para testar a ação do cloreto de Benzalcônio em presença de fluidos biológicos (sêro humano).

6.1.2. Microorganismos usados e meio de cultura:**A. Microorganismos:**

- Escherichia Coli — 1133
- Stafilococos Aureus — 209 (1209)

B. Meios de cultura:

- Bacto Penassay
- Brain Heart Infusion

6.1.3. Material necessário:

- 1 pipeta de 10 ml.
- 1 pipeta de 1 ml.
- 1 alça de platina
- 10 tubos de 25 x 200mm.
- 8 tubos c/ meio de cultura
- 2 estantes
- sôro humano (filtrado em membrana Millig G.S.)

6.1.4. Preparo do Inoculum:

Preparar uma suspensão de uma cultura de 24 horas de Escherichia Coli e Stafilococos Aureus, com 10 ml. de solução salina. Pipetar 1 ml. dessa suspensão e transferir para 9 ml. de solução salina. Em seguida transferir para o meio de cultura Bacto Penassay e Brain Heart Infusion, na proporção de 1/100. Vazar 20 ml. do meio inoculado para as placas de Petri e deixar solidificar.

6.1.5. Desenvolvimento do Teste:

- colocar em 2 tubos 9 ml. de cloreto de Benzalcônio a 1% + 1 ml. de sôro humano estéril. Esperar 10';
- colocar em 4 tubos 0,5 ml. do inoculum de Stafilococos Aureus;
- após 10' de contato do cloreto de Benzalcônio com o sôro humano estéril, transferir uma alçada para o tubo com Escherichia Coli;
- nos intervalos de 30', 1', 2', 5', e 10' retirar uma alçada para o meio de cultura;
- a prova acima foi repetida com o inoculum de Stafilococos Aureus, porém no seguinte tempo de contato: 30', 1 hora, 2 horas;
- incubar por uma semana a 37°C.

6.1.6. **Resultado observado:** ação bactericida evidenciada.

6.2 **Cloreto de Benzalcônio a 1% em presença de fluidos biológicos (com uso de placas de Petri):**

6.2.1 **Finalidade:**

Este método foi elaborado para testar a ação do cloreto de Benzalcônio a 1% em presença de fluidos biológicos (sêro humano), com uso de placas de Petri.

6.2.2. **Microorganismos usados e meio de cultura:**

A. Microorganismos usados:

— *Stafilococos Aureus* — 209 (1209).

B. Meio de cultura:

— Penassay Seed Agar (Difco).

6.2.3. **Material necessário:**

- 2 tubos 25x200mm.
- 3 placas de Petri.
- 1 pinça
- sêro humano (filtrado em membrana Millig G.S.)
- discos de papel filtro Whatnus (3mm.)
- solução salina de NaCl 0,9%.

6.2.4. **Preparo do Inoculum:**

Preparar uma suspensão de uma cultura de 24 horas de *Stafilococos Aureus*, com 10 ml. de solução salina. Pipetar 1 ml. dessa suspensão e transferir para 9 ml. de solução salina. Em seguida transferir para o meio de cultura Penassay Seed Agar na proporção de 1/100. Vazar 20 ml. do meio inoculado para as placas de Petri e deixar solidificar.

Transferir os discos que estão em contato com a solução de cloreto de Benzalcônio para as placas de Petri acima mencionadas.

Incubar por uma semana a 37°C.

Se o sêro humano inativar a ação do desinfetante, haverá um crescimento de diâmetro maior ao redor dos discos contidos nas placas.

**CRESCIMENTO OBSERVADO EM PLACAS COM DISCOS
CONTENDO CLORETO DE BENZALCÔNIO
COM E SEM SÔRO HUMANO.**

CLORETO DE BENZALCÔNIO A 1%		CLORETO DE BENZALCÔNIO A 1% SÔROHUMANO	
DISCO 1	2,12 mm.	DISCO 1	2,445 mm.
DISCO 2	2,375 mm.	DISCO 2	2,045 mm.
DISCO 3	2,28 mm.	DISCO 3	1,596 mm.
DISCO 4	2,253 mm.	DISCO 4	2,042 mm.

7. CONCLUSÃO:

Ante os resultados obtidos podemos concluir que o Cloreto de Benzalcônio não tem ação esporicida quando usado em concentrações as mais diversas (1^o/00, 1%, 5%). É um agente bacteriostático e seu uso deve ser restringido a desinfecção e antissepsia.

BIBLIOGRAFIA

1. PERKINS, John J. — Principles and Methods of Sterilization. Charles C. Thomas — Publisher U.S.A. — 1956.
2. LAWRENCE, Carl A. — BLOCK, Seymour S. — Desinfection, Sterilization, and Preservation. Lea Febiger. Philadelphia 1968.
3. CORBET, Charles Edward. Elementos de Farmacodinâmica S.P. Artes Médicas, 1966.
4. REDDISH, G. F. — Antiseptic disinfectants fungicides and Chemical and physical Sterilization — Philadelphia Febiger, 1954.
5. ZINSSER, Hans — BAYNE-JONES, Stanhope, Tratado de Bacteriologia — Rio de Janeiro — 1947 — 8.^o ed, Imprensa Nacional — p.107.
6. ZOGRAFI, George, Platel R. Praful — WEINER, D. Norman — Interactions between brange II and selected long chain Quaternary Ammonium Salts. Journal Of Pharmaceutical Sciences — V 53 p 544-549-964
7. STAINIER Y. Roger, DOUDOROFF, Michael — ADELBEGA EDWARREL — Mundo dos Micróbios. Editôra Edgar Blucher Ltda. USP — 1969.
8. Evaluated by A.M.A. Council on Drugs — New and Nonofficial Drugs — 1964.
9. BIER, Otto — Bacteriologia e Imunologia — Ed. Melhoramentos — 13.^a ed. — 1966.
10. COLLINS C. H. — Microbiological Methods London Butterworths — 1964.