



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

NATÁLIA AUGUSTO BENEDETTI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS
COMPOSTOS DO ESMALTE DE UNHA (ACETATO
DE ETILA E ACETATO DE BUTILA) NO
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Enfermagem junto ao Programa de Pós
Graduação - Mestrado Acadêmico em Enfermagem da
Faculdade de Medicina Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Orientadora: Profa. Dra. Ione Corrêa
Coorientador: Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias

**Botucatu
2016**

NATÁLIA AUGUSTO BENEDETTI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS COMPOSTOS DO
ESMALTE DE UNHA (ACETATO DE ETILA E ACETATO DE
BUTILA) NO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Enfermagem junto ao Programa de Pós
Graduação - Mestrado Acadêmico em Enfermagem
da Faculdade de Medicina Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu.

Orientadora: Profa. Dra Ione Corrêa.

Coorientador: Prof.Dr.João Manuel Grisi Candeias

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Benedetti, Natália Augusto.

Avaliação da atividade antiviral dos compostos do esmalte de unha (Acetato de Etila e Acetato de Butila) no herpesvírus bovino tipo 5 / Natália Augusto Benedetti. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Ione Corrêa
Coorientador: João Manuel Grisi Candeias
Capes: 40400000

1. Agentes antivirais. 2. Produtos para Unhas e Cutículas. 3. Unhas. 4. Citotoxicidade. 5. Hepatite por vírus. 6. Vírus do herpes em animais. 7. Doenças transmissíveis em animais.

Palavras-chave: Centros de embelezamento e estética; Doenças transmissíveis; Efeito citopatogênico viral; Hepatite viral humana; Herpesvirus bovino 5.

Folha de Aprovação

NATÁLIA AUGUSTO BENEDETTI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS COMPOSTOS DO
ESMALTE DE UNHA (ACETATO DE ETILA E ACETATO DE BUTILA) NO
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ione Corrêa

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Presidente e Titular 01 – Profa. Dra. Ione Correa / Instituição: Departamento de
Enfermagem da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Titular 02 – Profa. Dra. Ilda de Godoy / Instituição: Departamento de Enfermagem
da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Titular 03 – Profa. Dra. Arianne Polidoro Dini / Instituição: Faculdade de Enferma-
gem – Universidade Estadual de Campinas.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Denise e Irineu e minha irmã Cristiane.

Os dias seguiram... O tempo passou... Talvez a companhia tenha sido escassa e o diálogo interrompido, mas o amor, o carinho e o respeito em nada foram alterados. Vocês compreendiam e o apoio espontâneo, o incentivo visível, a prece segredada me foi fundamental. Obrigada.

Agradecimentos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida professora Dra. Ione Corrêa, que nesse longo período de ensinamentos, teve a paciência e a sabedoria de me conduzir pelos caminhos do conhecimento e na realização deste estudo tão especial em minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao querido Professor Dr. João Manoel Grisi Candeias,
pelos ensinamentos e por me dar tranquilidade e a
confiança que precisava, durante o estudo realizado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por atender minhas preces e me dar paz nos momentos de angústia.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, pela oportunidade de cursar o Mestrado Acadêmico em Enfermagem.

À coordenação do Mestrado Acadêmico em Enfermagem e a todos os professores, pelo apoio ao corpo discente e por proporcionarem tantos conhecimentos para este aprendizado.

A todos os funcionários do Departamento de Enfermagem, pelo acolhimento e paciência com todos os alunos.

A todos os funcionários do Laboratório de Virologia pela paciência e pelo carinho que me acolheram neste momento tão importante da minha vida profissional, em especial a Ana Cláudia Cícero, Ivana Castilho e Luiz Severino.

À Gerência de Enfermagem, as Enfermeiras Karen Batista e Liriane Garita, por me incentivarem na realização deste aprendizado.

À Bibliotecária da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Rosemary Cristina da Silva pela colaboração na conferência das referências desta dissertação.

À querida Jacqueline Kurissio, aluna de doutorado, que me passou seus conhecimentos e me orientou com todo carinho a prática Laboratorial, que você tenha muito sucesso na sua vida e carreira profissional.

À amiga querida Rafaela Aparecida Prata, aluna do mestrado acadêmico, por me dar força nos momentos mais difíceis do estudo e contribuir com seus conhecimentos ao longo deste estudo. Que você realize todos os seus objetivos.

À minha querida amiga Thais Alves Barbosa, aluna do mestrado acadêmico, por me ajudar e me passar confiança nos momentos difíceis. Que você alcance todos os seus objetivos e sucesso profissional.

À querida Gabriela Corrêa Carvalho, aluna do Curso de Graduação Farmácia, que mesmo distante me incentivou e contribuiu com seus conhecimentos neste estudo. Que você realize todos os seus sonhos.

Ao fotógrafo Silvio Geraldo dos Santos Júnior, pela gentileza da foto realizada para ilustrar o estudo.

Em especial ao Sr. José Aparecido Siqueira Campos pelo incentivo em não desistir do aprendizado e do conhecimento por meio do estudo.

Aos funcionários do Ambulatório Mion, Hospital das Clínicas Unesp Botucatu, pela compreensão de minhas ausências e por me incentivarem à dedicação neste estudo.

Epígrafe

Epígrafe

*Tudo quanto pedirdes, orando, crede
que o recebereis e o obtereis.*

(MC 11, 24)

Resumo

Resumo

Benedetti, N.A. **Avaliação da atividade antiviral dos compostos do esmalte de unha (acetato de etila e acetato de butila) no herpesvírus bovino tipo 5.** 2016.74f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Introdução: O Sistema de Vigilância Sanitária da Itália detectou 445 casos de hepatite B e 69 de hepatite C, relacionados aos tratamentos de beleza. Fato esse alarmante, pois, os cuidados com a aparência, têm levado a população a buscar os padrões de beleza estabelecidos pela mídia. Destacando-se que os salões de beleza no Brasil estão cada vez mais comuns com a atuação dos profissionais de manicure e pedicure. Entretanto, os produtos cosméticos necessitam de uma avaliação da qualidade sanitária, ou seja, testes que indiquem a quantidade de micro-organismos viáveis em cada amostra. Pois, evidências mostram a sobrevivência dos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* no esmalte de unha. Todavia, a composição e a fabricação do esmalte são pouco conhecidas, devido várias etapas estarem envolvidas na produção dos esmaltes de unhas comuns. **Objetivo:** Avaliar a ação dos solventes presentes no esmalte de unha, o acetato de etila e o acetato de butila, sobre o herpes vírus bovino tipo 5. **Método:** Realizou ensaios da atividade antiviral nas diferentes fases do ciclo replicativo com os solventes, acetato de etila e o acetato de butila. **Resultados:** No pré-tratamento, não houve replicação viral no acetato de etila a partir da diluição 10^{-6} e no acetato de butila 10^{-5} . No pós-tratamento não houve replicação viral no acetato de etila a partir da diluição 10^{-7} e no acetato de butila 10^{-5} e na inativação viral, tanto o acetato de etila como o butila, após 48 e 72 horas, todas as diluições apresentaram replicação viral, 10^{-1} a 10^{-10} . **Discussão:** Apesar de não identificar na literatura relatos específicos sobre solventes acetato de etila e acetato de butila na atividade antiviral, o presente estudo evidenciou que apesar de pouca diferença entre as diluições sequenciais desses solventes, houve replicação viral em diluições mais concentradas de vírus e de solventes. A limitação do estudo, com o uso do esmalte de unha, se deu pelo fato deste produto não ser diluído em meio de cultura para células em sua totalidade, além de conter substâncias muito voláteis que secam o produto rapidamente. **Conclusão:** Concluiu-se que houve replicação viral nas diferentes diluições, em maior concentração de solvente e maior número de vírus. Para diminuir o risco de contaminação cruzada da população pela disseminação de micro-organismos, mostra a necessidade dos órgãos fiscalizadores atuarem mais nesses estabelecimentos, educando e verificando a rotina do trabalho desses profissionais.

Descritores: Centros de embelezamento e estética, Doenças transmissíveis, Efeito citopatogênico viral, Hepatite viral humana, Herpesvirus bovino 5.

Abstract

Abstract

Benedetti, N.A. Evaluation of the antiviral activity of nail polish compounds (ethyl acetate and butyl acetate) in bovine herpesvirus type 5. 2016.74f. Dissertation (Master of Nursing) - School of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Introduction: The Health Surveillance System in Italy detected 445 cases of hepatitis B and 69 hepatitis C related to beauty treatments. These alarming facts, for care of the appearance have led people to look for the beauty standards set by the media. If highlighting the beauty salons in Brazil is becoming more common with the activities of manicure and pedicure professionals. However, cosmetic products require a quality assessment of the health, is tests which indicate the amount of viable microorganisms in each sample. For evidence shows the survival of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* in nail polish. However, the enamel composition and manufacturing are little known due several steps are involved in the production of common nail enamels. **Objective:** To evaluate the action of solvents present in nail enamel, ethyl acetate and butyl acetate, about herpesvirus bovine type 5. **Method:** The antiviral activity test performed at different stages of the replicative cycle of the solvents, ethyl acetate and butyl acetate. **Results:** In the pre-treatment, there was no viral replication in the ethyl acetate dilution from 10^{-6} to 10^{-5} in butyl acetate. In the post-treatment there was no viral replication in ethyl acetate from the dilution 10^{-7} and 10^{-5} butyl acetate and viral inactivation, both the ethyl acetate and the butyl after 48 and 72 hours, all dilutions they showed viral replication, 10^{-1} to 10^{-10} . **Discussion:** Although not identify the specific reports literature solvents ethyl acetate and butyl acetate in antiviral activity, this study showed that despite little difference between serial dilutions of these solvents, there viral replication in more concentrated dilutions of virus and solvents. A limitation of the study, using the nail polish, was due to the fact that this product is not be diluted in culture medium to cells in its entirety, and contain highly volatile substances that dry the product quickly. **Conclusion:** We conclude that there was viral replication in the different dilutions, higher solvent concentration and a higher number of viruses. To reduce the risk of cross-contamination of the population by the spread of micro-organisms, it shows the need for regulatory agencies act more in these establishments, educating and checking the routine work of these professionals.

Key words: Beautification and Aesthetics, Communicable diseases, viral cytopathogenic effect, Human Viral Hepatitis, Bovine herpesvírus 5.

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição das diferentes diluições de vírus BoHV-5 em relação ao efeito citopático.....	48
Tabela 2. Distribuição das diferentes diluições de vírus BoHV-5 e do solvente acetato de etila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.....	49
Tabela 3. Distribuição das diferentes diluições de vírus BoHV-5 e do solvente acetato de butila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.....	50
Tabela 4. Distribuição das diluições do solvente acetato de etila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.....	51
Tabela 5. Distribuição das diluições do solvente acetato de butila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.....	52
Tabela 6. Distribuição das diluições sequenciais do vírus BoHV-5 e o solvente acetato de etila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.....	53
Tabela 7. Distribuição das diluições sequenciais do vírus BoHV-5 e o solvente acetato de butila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.....	54

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do acetato de etila.....	38
Figura 2. Estrutura química do acetato de butila.....	39
Figura 3. Foto da Câmara de Neubauer.....	41
Figura 4. Desenho do grid da Câmara de Neubauer.....	41
Figura 5. Foto ilustrativa do Kit de unha.....	66

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS -	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BoHV-5 -	Herpesvírus bovino tipo 5
CO ₂ -	Gás carbônico
CPE -	Efeito Citopático
DITC ₅₀ -	50% Dose Infectante do tecido celular
DMEM -	Dubelcco's modified Eagle médium
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DP -	Distância Proporcional
LDH -	Enzima mitocondrial
MDBK -	Madin-Darby bovine kidney
mL -	Mililitro
MTT -	3-4,5- Dimethythiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PH -	Potencial hidrogeniônico
μL -	microlítro

Sumário

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	26
2.OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Tipos de estudo.....	37
3.2 Local de Pesquisa.....	37
3.3 Células e Vírus.....	37
3.4 Solventes Testados.....	38
3.5 Aspéctos Éticos.....	39
3.6 Etapa Laboratorial.....	39
3.6.1 Preparo do Cultivo Celular para Inoculação do Vírus.....	39
3.6.2 Contagem Celular.....	40
3.6.3 Manutenção das Células.....	41
3.6.4 Determinação do Título Infeccioso Viral.....	42
3.6.5 Título Viral.....	42
3.6.6 Determinação da Viabilidade Celular pelo Método Colorimétrico.....	43
3.6.7 Ensaio da Atividade Antiviral nas Diferentes Fases do Ciclo Replicativo.....	44
4. RESULTADOS.....	47
5. DISCUSSÃO.....	55
6.CONCLUSÃO.....	61
7.RECOMENDAÇÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	67

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os cuidados com a aparência, sob influência da sociedade, têm levado a população a buscar os padrões de beleza estabelecidos pela mídia. Tanto que foi desenvolvida uma pesquisa, visando à qualificação para o trabalho, em salões de beleza, na aquisição de conhecimentos, conscientização referente às atitudes simples de higienização, uso compartilhado de instrumentos e a possibilidade de transmissão de doenças¹.

Segundo Classificação Brasileira de Ocupações do Ministério do Trabalho, os salões de beleza no Brasil são cada vez mais comuns e, para a atuação dos profissionais de manicure e pedicure que cuidam, respectivamente de mãos e pés, são necessários no mínimo, o ensino fundamental incompleto ou curso básico para embelezamento².

Em uma pesquisa realizada no interior de São Paulo com esmalte de unha mostrou que quatro espécies de fungos sobreviveram no esmalte, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*³.

Desta maneira, Bou-Chacra e Mitsuko⁴ já relatavam que os produtos cosméticos necessitam de uma avaliação da qualidade sanitária, ou seja, testes que indicam a quantidade de micro-organismos viáveis ou não em cada amostra.

Nesse contexto, estudo realizado para identificar as principais etapas envolvidas na produção do esmalte de unha que são pouco conhecidas, mostrou os principais componentes envolvidos como: o solvente acetato de etila e acetato de butila, solução alcoólica de cânfora a 2 %, tolueno, nitrocelulose, formaldeído, isopropanol e óxido de ferro para a coloração. Ainda segundo os autores, verificou-se que ao misturar todos esses componentes, por serem muito voláteis, houve perdas de reagentes durante a pesquisa, porém, estabeleceram alguns fatores envolvidos na avaliação do esmalte como: densidade, o PH, a viscosidade e o tempo de secagem⁵.

O solvente acetato de etila pertence à família dos ésteres, é um líquido

límpido, incolor, de odor forte e frutal, alta volatilidade. É utilizado como solvente produzido industrialmente ou em laboratórios acadêmicos, a partir da reação de ácido acético com etanol, em presença de ácido sulfúrico. Atualmente é utilizado em formulações do esmalte de unha e acetona ⁶.

O solvente de acetato de butila pertence à família dos ésteres acéticos, utilizado como solvente polar. É um líquido transparente, incolor, volátil e com odor frutal característico, obtido pela reação química do ácido acético com n butanol ⁷.

Nesse sentido, para o desenvolvimento e a produção de medicamentos, cosméticos e fitoterápicos, a evolução tecnológica exige a qualidade e segurança dos produtos por meio do cumprimento de normas regulamentadoras ⁸.

No entanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010) ⁹ define que a estabilidade microbiológica deve manter sua esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano. Para isso, é necessário que o profissional farmacêutico tenha o conhecimento físico-químico das características dos produtos, manuseio, preparação, interações, conservação até o produto final.

Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos, a avaliação microbiológica deve ser realizada, por meio de contagem microbiana e do sistema de testes de conservantes do produto, permitindo verificar se as escolhas dos componentes das formulações comprometem a sua eficácia¹⁰.

Dessa forma, a cosmetovigilância é uma importante ferramenta que analisa os produtos pós- comercialização¹¹. De acordo com a RDC 322 da Vigilância Sanitária de 2005, este sistema facilitará na comunicação por parte do usuário, sobre problema decorrente ao uso de produtos e também acesso ao consumidor à informação¹².

Uma pesquisa realizada na Itália, no período de 1997-2002, com a utilização do banco de dados do Sistema de Vigilância sanitária para hepatites virais agudas, na qual, detectou 2.964 casos de hepatite B e 598 casos de hepatite C, sendo que 15% (445) dos casos agudos eram de hepatite B e 11,5% (69) de casos agudos de hepatite C, relacionados aos tratamentos de beleza ¹³.

O vírus da hepatite B é uma das principais causas de doença hepática no

mundo e estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas já tiveram contato com o vírus¹⁴.

O vírus é um parasita intracelular que usa o mecanismo das células para se replicar e deve ser assegurado, que o vírus tenha condições ideais para crescimento¹⁵, diferente do mecanismo de reprodução dos fungos que em laboratório, são inoculados em Sabouraud Dextrose Agar (DIFCO)³.

Há pouco mais de 70 anos as células de mamíferos foram cultivadas pela primeira vez em laboratório. A partir daí, uma infinidade de famílias virais foram isoladas e identificadas, sendo algumas destas, associadas às doenças da época. Por meio da microscopia óptica, a presença do vírus é identificada de forma indireta, por meio de alterações morfológicas nas células, denominadas efeito citopático (CPE)¹⁶.

Dessa forma, os vírus são parasitas específicos, ou seja, penetram apenas em determinados tipos de células, denominados especificidade viral. Tal fato impede, portanto, o uso destes vírus como modelo experimental. Já, o herpesvírus bovino, por ser um vírus envelopado, serve de modelo em estudos de atividade antiviral, devido sua excelente adaptação e replicação em culturas celulares específicas¹⁵.

O herpesvírus, membro da família *Herpesviridae*, é representado por vírus que infectam os vertebrados, incluindo aves, peixes e vários mamíferos, principalmente os humanos. Apresentam uma grande importância médica por estarem envolvidos em muitas doenças. Essa família possui uma grande variação de vírus, e é subdividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirus*, *Bethaherpesvirus* e *Gammaherpesvirus*¹⁶.

A literatura mostra que os estudos relacionados à atividade antiviral *in vitro* avaliam basicamente, a capacidade que o vírus tem de se replicar em cultivos celulares, monitoradas pela presença do efeito citopático, ou seja, alteração morfológica que ele causa nas células¹⁷.

Em uma pesquisa realizada com a atividade *in vitro* de três drogas antivirais (Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet), sobre os herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5, em cultivo celular, contribuiu para o delineamento de terapias experimentais e para o tratamento de algumas dessas enfermidades, em situações especiais¹⁸.

Segundo Freitas¹⁷, pesquisas são necessárias para a avaliação da citotoxicidade de material- testes, devido os mesmos se apresentarem tóxicos para as células e se tornam inviáveis na realização de estudos de atividade antiviral.

A atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos mostrou potencial para o desenvolvimento de teste na avaliação da atividade antiviral, frente aos lentivírus de pequenos ruminantes¹⁹.

Em pesquisa que avaliou o efeito do óleo de copaíba utilizado como cicatrizante, mostrou a proliferação de células Madin Darby Bovine Kidney, MDBK, por meio de multiplicação celular²⁰.

Estudo aponta a prevalência de doenças e infecções causadas pelo vírus da Imunodeficiência Humana (AIDS), hepatite B e C entre profissionais da saúde devido ao crescente número de acidentes de trabalhos²¹.

Dessa forma, os riscos ocupacionais de trabalhadores da área de saúde, ao adquirirem patógenos veiculados pelo sangue, já está documentado²². Os acidentes com materiais biológicos humanos (sangue, secreções e excreções), provocados por manuseio de objetos perfurocortantes, podem levar as doenças na forma aguda, crônica ou até mesmo à morte^{16,23}.

Pinheiro e Zeitoune²⁴ referem que o conhecimento dos profissionais de enfermagem sobre a hepatite B, medidas de biossegurança utilizadas e a discussão sobre as implicações desta doença, precisam de treinamento permanente, visando o aumento dos conhecimentos quanto à tomada de decisão em caso de exposição às secreções corporais, para minimizar as consequências desta ocorrência.

Os riscos dos profissionais de saúde à infecção por hepatites B e C, no exercício da atividade profissional no ambiente hospitalar, constitui fator de risco de infecção ocupacional, em virtude da ocorrência ao contato direto com os pacientes e da exposição aos fluidos corporais²⁵.

A transmissão do vírus hepatite B e C, por meio de instrumentos de manicure e pedicure, evidenciou um número significativo de casos de infecção pelo uso inadequado de materiais²⁶.

O compartilhamento de lâminas, materiais de manicures e pedicures, são fatores de riscos associados aos vírus da hepatite B e C e devem ser considerados

pelas autoridades, a fim de fornecer informações e estratégias de políticas públicas em seu controle^{26,27}.

Os conhecimentos dos profissionais de salões de beleza, em relação à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e hepatite, são insuficientes ou incorretos, sobre o conceito, a transmissão, a prevenção e os meios de esterilização^{28,29}. Os profissionais de manicure, pedicure e podóloga não imunizados com a vacina contra a Hepatite B e o baixo conhecimento sobre essas doenças, necessitam de campanhas de vacinação e cursos destinados a esse público, tornando possível a prevenção e o controle na transmissão do vírus^{28,30,31}

Pesquisa realizada na Colômbia, no intuito de avaliar a efetividade dos processos de desinfecção dos utensílios em salões de beleza e o cumprimento dos protocolos de higiene, desinfecção e esterilização, de acordo com a Resolução 2827 de 2006, concluiu que houve crescimento bacteriano de: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de outros micro-organismos oportunistas³².

Para determinar a prevalência do vírus da hepatite A, B e C em uma amostra de esteticistas do Rio de Janeiro, foi aplicado um questionário para estes profissionais, identificando o fator de risco sócio- demográfico o conhecimento e a atitude em relação à hepatite viral. Os autores destacaram ainda uma alta prevalência de infecção por hepatite viral A e uma baixa prevalência de infecção por hepatite viral B e C, entre amostras das esteticistas estudadas³³.

Na avaliação do controle de infecção em procedimentos de manicure e pedicure, em estudo realizado em São Paulo, mostrou que 93% das manicures e pedicures reutilizavam os materiais descartáveis como lixas e palitos. Ressalta ainda que 74% referiram lavar as mãos entre um cliente e outro, embora 80% não utilizavam luvas cirúrgicas durante procedimentos com riscos de sangramento, 54% relatou não realizar qualquer ação quando em contato com o sangue do cliente e 93% dos profissionais não limpavam os materiais antes da esterilização. Durante o processo de observação identificou-se baixa aderência pelos profissionais no uso das recomendações de biossegurança³⁴.

O conhecimento de 90 funcionários de estabelecimentos comerciais de

manicure e pedicure, de Santo André e São Bernardo do Campo, sobre os processos de desinfecção e esterilização de artigos críticos, apresentaram deficiências importantes relacionadas à limpeza e à esterilização dos instrumentais³⁵.

Um manual de atualização e aperfeiçoamento sobre informações técnico-científicas de biossegurança, com intuito de ser um processo funcional e operacional, de fundamental importância em serviços de saúde, não só por abordar medidas de controle de infecções para proteção da equipe de assistência e usuários da saúde, mas também por ter um papel fundamental na consciência sanitária, da comunidade, na preservação do meio ambiente e na manipulação do descarte de resíduos químicos, tóxicos e infectantes e na redução geral de riscos à saúde e acidentes ocupacionais³⁶.

A produção científica mundial em relação ao conhecimento e adesão às recomendações de biossegurança, entre os profissionais do segmento de estética e beleza e os riscos biológicos a que estão expostos, destacam baixa adesão dos profissionais ao uso de equipamentos de proteção individual, lavagem das mãos e proteção vacinal e esperam que tais achados possam subsidiar reflexões sobre práticas seguras neste segmento, voltadas para profissionais e clientes³⁷.

Estudos sobre procedimentos de biossegurança adotados e exposição ocupacional pelos profissionais de manicure, pedicure e outros, evidenciaram a falta de conhecimentos sobre o assunto e a deficiência na regulamentação desses serviços. Campanhas de educação em saúde, associadas às políticas públicas, boas práticas de biossegurança e vigilância nos estabelecimentos, são necessárias para melhorar a qualidade da assistência e diminuir os riscos de transmissão de doenças infecciosas^{38, 39}.

As atitudes voltadas à educação em biossegurança, entre profissionais de centros de embelezamentos, tornam-se cada vez mais necessárias, uma vez que profissionais da área podem influenciar direta ou indiretamente a saúde dos seus clientes⁴⁰.

Estudo com a participação de 67 manicures mostrou que 48% delas, não receberam informações sobre as doenças infectocontagiosas e apenas 21%

utilizavam luvas, durante os procedimentos. A preocupação com a esterilização do material é maior, uma vez que 58% relataram que esterilizavam, porém os métodos não eram adequados. Quanto à imunização, 54% afirmou estar vacinada. Os indicadores analisados demonstram a vulnerabilidade da grande maioria das manicures, quanto às doenças infectocontagiosas, que podem ser adquiridas no cotidiano do trabalho ⁴¹.

De acordo com manual de orientação para instalação e funcionamento de institutos de beleza sem responsabilidade médica, conhecer possibilidades e riscos de transmissão de doenças, noções de higiene, de processos, desinfecção de utensílios e instrumentos e o cuidado no uso de determinados produtos é fundamental na prestação desse tipo de serviço, com qualidade. As práticas coerentes a serem adotadas pelos estabelecimentos de beleza consistem em um conjunto de medidas que visam garantir a qualidade sanitária em conformidade com ⁴²:

- Código Sanitário Estadual - Lei n. 10.083/98.
- Decreto nº 20.931, de 11/01/1932.

Artigo 25: *“Os institutos de beleza, sem direção médica, limitar-se-ão aos serviços compatíveis com sua finalidade, sendo terminantemente proibida aos que neles trabalham a prática de intervenções de cirurgia plástica, por mais rudimentares que sejam, bem como, a aplicação de agentes fisioterápicos e a prescrição de medicamento”.*

- Decreto nº 12.342, de 27 de setembro de 1.978.

Artigo 218: *“Os estabelecimentos de que tratam esta seção estão sujeitos à vistoria pela autoridade sanitária, e só poderão ser utilizados para o fim a que se destinam, não podendo servir de acesso a outras dependências”.*

Parágrafo único – *“São permitidas outras atividades afins, a critério da autoridade sanitária, respeitando as áreas mínimas exigidas”.*

Segundo o Guia Técnico para Profissionais de Beleza da Coordenação de Vigilância em Saúde ⁴³, recomenda-se iluminação e ventilação adequada, instalação elétrica suficiente, pisos e paredes laváveis, ralos, pias exclusivas para limpeza de materiais, equipamentos adequados para esterilização de materiais,

descrevendo passo a passo como proceder cada processo e as legislações vigentes.

Os estabelecimentos devem ter um manual de rotinas e procedimentos, que é um roteiro descritivo de cada serviço prestado, mostrando as recomendações sobre as atividades executadas⁴³.

A postura ética do profissional da beleza inclui as condutas de biossegurança, que devem ser adotadas em diversas áreas, incluindo a área de maquiagem. A sugestão desse trabalho surgiu, pelo conhecimento dos riscos de contaminação, que podem comprometer não só o resultado final, a maquiagem, mas também a saúde do cliente e do profissional⁴⁴.

Sobre a biossegurança e o sistema de informação, é importante analisar a construção de solidariedade cognitiva e prática entre a ciência da informação e o campo da biossegurança favorecendo estratégias e instrumentos de monitoramento de riscos, por meio da organização de informação, em termos de relevância quantitativa e qualitativa⁴⁵.

Tendo em vista a preocupação com disseminação de micro-organismos por instrumentais que entram em contato com fluidos corporais e a ausência de estudos *in vitro*, relatando a ação dos solventes do esmalte de unha, o acetato de etila e acetado de butila, em modelos de vírus experimentais, o presente trabalho teve o propósito de avaliar a ação destes compostos presentes no esmalte de unha, sobre o herpesvírus bovino tipo 5.

Objetivos

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral *in vitro* de dois compostos do esmalte de unha (acetato de etila e acetato de butila).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar a ação dos solventes, acetato de etila e acetato de butila em concentração máxima não tóxica para a célula Madin- Darby Bovine Kidney no herpesvírus bovino tipo 5.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipos de Estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental que constitui em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto. As pesquisas experimentais constituem no mais valioso procedimento disponível aos cientistas, para testar hipóteses que estabelecem relações de causa e efeito entre as variáveis. Em virtude de suas possibilidades de controle, os experimentos oferecem garantia maior do que qualquer outro delineamento é de que a variável independente causa efeitos na variável dependente⁴⁶.

3.2 Local da Pesquisa

A etapa laboratorial foi realizada no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.

3.3 Células e Vírus

Para os ensaios celulares foi utilizada a linhagem Madin- Darby Bovine Kidney (MDBK) derivada de rim de bovino, que estava congelada em criotubos de 1,5 mL e armazenada em reservatório de nitrogênio líquido.

Na realização dos ensaios virais foram utilizadas amostras de Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) congeladas em criotubos de 1,5 mL de vírus a -80°C.

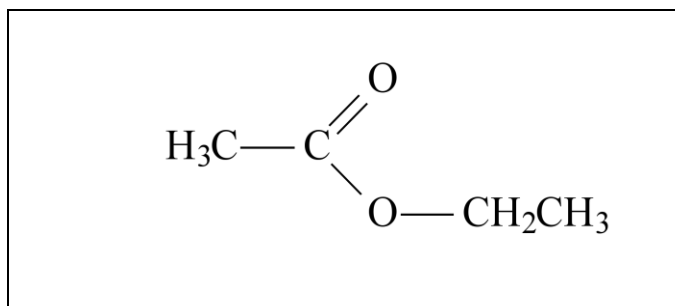
Informo ainda que tanto as células quanto os vírus foram adquiridos do Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.

3.4 Solventes testados

Os solventes testados foram: acetato de etila e o acetato de butila, que segundo Farmacopeia Brasileira, os insumos farmacêuticos, os medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária devem atender às normas e especificações estabelecidas⁴⁷.

Este mesmo autor descreve o solvente acetato de etila como uma estrutura química composto de carbono, hidrogênio e oxigênio - $C_4H_8O_2$ e massa molecular 88,11. (Figura 1). É um solvente líquido límpido, incolor, volátil, de odor característico e sua densidade aproximadamente 0,90. Temperatura de ebulição é aproximadamente 77 °C, o índice de refração (20 °C): 1,371 a 1,373. Conservação em recipientes bem fechados, sendo que ao armazenar deve se proteger do calor é também um produto inflamável⁴⁷.

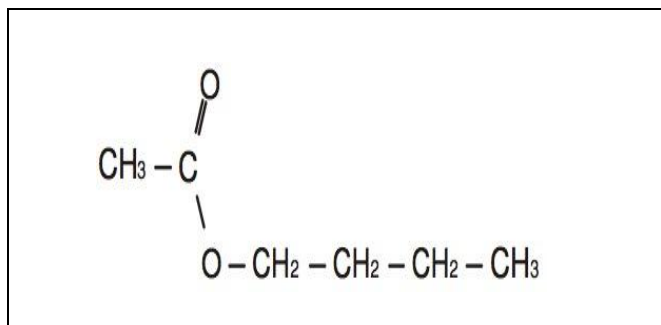
Figura 1- Estrutura química do acetato de etila



Fonte: ebah⁴⁸

O solvente de acetato de butila possui em sua estrutura química e massa molecular – $C_6H_{12}O_2$ – 116,16. (Figura 2). Apresenta se como um líquido incolor e inflamável com odor adocicado de fruta. A temperatura de ebulição é de 125°C a 126°C e o índice de refração é de 20°C. Pouco solúvel em água. Miscível em etanol e éter etílico. Conservado em recipientes fechados⁴⁷.

Figura 2- Estrutura química do acetato de butila



Fonte: ebah⁴⁸

3.5 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido liberado do parecer técnico, segundo ofício 006/2016-CEP de 25 de janeiro de 2016, pois a pesquisa não envolve direta ou indiretamente Seres Humanos. Resolução n°. 466, de 12 de Dezembro de 2012⁴⁹.

3.6 Etapa Laboratorial

3.6.1 Preparo de cultivo celular (MDBK) para inoculação do vírus (BoHV-5)

O armazenamento em nitrogênio líquido é a melhor forma de estocar células, de modo a preservar a capacidade proliferativa e a viabilidade⁵⁰.

Procedimento: As células Madin-Darby bovine kidney (MDBK) foram descongeladas do reservatório de nitrogênio, em banho Maria, a 37°C e colocadas em frascos de cultura de 75cm², para possibilitar sua multiplicação, ou seja, a monocamada celular, suplementada de meio Dubelcco's modified Eagle médium (DMEM) e soro fetal bovino 10% e mantida por sete dias em estufa a 37°C.

Decorridos os sete dias, o meio de cultura do frasco da monocamada celular

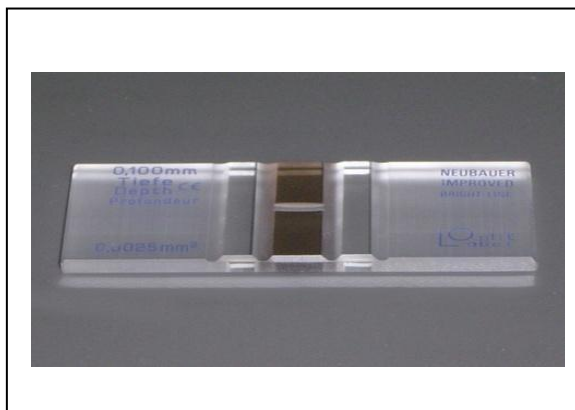
foi cuidadosamente retirado e desprezado. Em seguida foi adicionado meio DMEM sem o soro fetal bovino ao frasco, contendo a monocamada, realizando leve agitação para que toda a área do frasco, contendo as células do substrato, fosse lavada. Este meio foi então removido e a solução de tripsina- EDTA foi adicionada cinco mL num frasco de 75cm², permitindo que toda a área em que as células se encontravam entrassem em contato com a solução. Em seguida o frasco foi incubado a 37°C, por cinco minutos. Após este período, a cultura foi examinada no microscópio óptico para verificar se as células haviam sido removidas da superfície do frasco. Em seguida, 10 mL de meio DMEM com soro fetal bovino 10% foram adicionados, com uma pipeta, misturando-se suavemente à solução. Após, 50 µL de suspensão celular foi retirado com pipeta e colocado em um tubo eppendorf para a realização da contagem⁵⁰.

3.6.2 Contagem Celular

Na análise da viabilidade celular, por contagem manual, por meio da câmara Neubauer, utilizou-se o reagente azul de tripana, na concentração de 1%, na solução salina. Este reagente é excluído do citoplasma de células viáveis; já as células mortas são incapazes de excluí-lo e coram em azul⁵⁰.

Procedimento: Para a realização de contagem celular manual, foi misturado 50 µL da suspensão de células, com igual volume de azul de tripan; o fator de diluição foi igual a dois. A seguir, foram pipetados 15 µL da suspensão com o azul de tripan e colocada delicadamente na superfície da câmara de Neubauer. (Figura 3, pg 41).

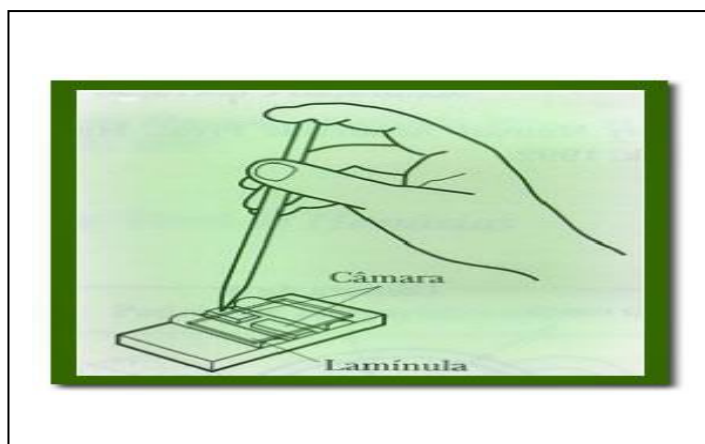
Figura 3- Foto de Câmara de Neubauer.



Fonte: Gonçalves⁵¹.

O líquido atravessa o “grid” por capilaridade e fica retido entre a câmara e a lamínula (Figura 4). As células foram observadas utilizando-se objetiva 10X ao microscópio óptico. A proporção entre o número de células vivas e o total (vivas e mortas) forneceu uma porcentagem da viabilidade celular, a qual foi superior a um percentual de 90 %⁵⁰.

Figura 4- Desenho do grid da Câmara de Neubauer.



Fonte: Gonçalves⁵¹.

3.6.3 Manutenção das células

Culturas de células aderidas são examinadas em microscópio óptico invertido de modo que se possa observar o aspecto geral e a confluência da cultura.

Procedimento: Para a manutenção das células MDBK, frascos de cultura celular foram mantidos a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂, sendo observados diariamente, de modo a verificar a formação da monocamada de células. Quando estas se mostraram homogêneas e confluentes, ou seja, em torno de um percentual de 90%, foi necessário repicar a cultura. O crescimento das células é inibido pelo contato, o que ocorre em alta confluência. Se as células permanecerem nesta condição, descolam do frasco, o que inviabiliza a cultura⁵².

3.6.4 Determinação do título infeccioso viral

A determinação do título infeccioso das suspensões virais é um procedimento imprescindível à subsequente avaliação adequada de qualquer atividade antiviral⁵³.

Procedimento: consiste em contar o número de partículas virais, por unidade de volume, capazes de infectar células permissivas. Tal determinação foi efetuada, segundo o método das diluições-limites, com cálculo do ponto de infecção 50%, de acordo com a metodologia clássica de Reed e Muench (1938). Foi quantificado pelo valor recíproco da diluição do vírus que teve a capacidade de infectar 50% das células inoculadas, sendo expresso como a dose infectante a 50% do tecido celular (DITC₅₀) por mL. A DITC₅₀ não revela quantas unidades infecciosas podem estar presentes na amostra, mas somente se esta dose ou diluição produzirá efeito citopático em cerca de 50% das unidades experimentais⁵³.

3.6.5 Titulação viral

A partir da suspensão - estoque viral, foi preparada uma série de diluições na razão de 1:10 em tubos de microtitulação, em banho de gelo, com meio DMEM,

sem soro fetal bovino (900 µL de meio +100 µL da suspensão viral). Esta série de diluições 10^{-1} e 10^{-10} foram adicionadas ao tapete celular previamente formado e o efeito citopático viral foi observado microscopicamente. A titulação foi realizada em placas de microtitulação de 96 cavidades de células MDBK ($3,0 \times 10^5$ células/ml), com oito cavidades para cada diluição, cada cavidade contendo 100 µL da suspensão viral. As microplacas foram mantidas a 37°C, em estufa de CO₂, durante 72 horas. Após este intervalo, foi realizada a contagem do número de cavidades nas quais houve ou não o efeito citopático. Portanto, foi determinada a diluição que produziu resposta positiva em 50% das amostras (50DITC50= 50% dose infectante do tecido celular = DI50= dose infectante 50%)⁵³.

Foram contadas em cada diluição as cavidades infectadas como positivas, utilizando o símbolo (+), ou seja, as cavidades que tiveram efeito citopático. As não infectadas como negativas, utilizando o símbolo (-), para as cavidades que não tiveram efeito citopático. Foram calculadas as porcentagens de cavidades infectadas para cada diluição e o valor encontrado foi multiplicado pelo volume adicionado a cada cavidade, no caso 100 µL, obtendo-se o valor de DITC₅₀/ml⁵³. Caso a diluição que infecta 50% das cavidades vier a variar entre duas diluições, o título poderá ser calculado por meio da distância proporcional (DP) entre as mesmas, pelas seguintes fórmulas:

$$DP = \frac{(\% \text{ de positivas acima de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ de positivas acima de } 50\%) - (\% \text{ de positivas abaixo de } 50\%)} \quad (\text{I})$$

$$\text{Log DITC50} = (DP \times \log \text{ do fator de diluição}) + (\log \text{ da diluição acima de } 50\%) \quad (\text{II})$$

3.6.6 Determinação da viabilidade celular pelo método colorimétrico (MTT)

O teste de MTT⁵³ (3-4,5-Dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi utilizado para investigar a toxicidade dos solventes de acetato de etila e acetato de butila para as células MDBK. O fundamento da técnica consiste na metabolização do MTT, de coloração amarela, pela enzima mitocondrial LDH de células viáveis, formando formazan, que é um cristal de cor violeta. Portanto, é um ensaio diretamente proporcional, sendo que quanto maior a intensidade da cor, maior a absorbância e, portanto, maior a viabilidade celular e menor a toxicidade dos solventes.

Procedimento: Uma suspensão de células MDBK, contendo aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída (100µL/cavidade), em placas de microtitulação de 96 cavidades. As contagens foram realizadas na câmara de Neubauer e as células foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°, até confluência (24horas). Em seguida, o meio foi aspirado e foram adicionados 100µL/cavidade dos solventes- testes diluídos na razão 1:2, ou seja, diluições sequenciais de 2^{-1} a 2^{-10} . Foi realizado controle celular negativo com 100 µL meio DMEM/cavidade, e o controle positivo com 100µL de Dimetilsulfóxido (DMSO)/cavidade. Em seguida as placas em duplicata foram mantidas a 37° C, por 72horas. Transcorrido este período, os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados, sendo em seguida adicionados 50µL da solução MTT/cavidade (Sigma), a 1mg/mL em meio DMEM. As placas foram mantidas por mais quatro horas, nas mesmas condições. Após este período, foi retirado o meio contendo MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionado 100µL de DMSO/cavidade, para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas, levemente, à temperatura ambiente, por 10 minutos, para que todo o formazan fosse solubilizado e foram lidas no espectrofotômetro a 540 nm (Bio-Tek, Elx 800)⁵³.

3.6.7 Ensaio da atividade antiviral nas diferentes fases do ciclo replicativo com o solvente acetato de etila e o acetato de butila.

Os três testes foram realizados em placas de microtitulação de 96 cavidades

(duplicata), com 100 µL/cavidade de células MDBK, que foram cultivadas em garrafas, anteriormente. As placas de microtitulação foram preparadas 24 horas antes e incubadas em estufa a 37°C. O teste possui um controle celular com apenas meio DMEM, e um controle viral e em cada tipo de teste avaliou uma variável diferente por meio de visualização do efeito citopático (+) ou ausência do efeito citopático (-):

Teste de inativação viral: determinou o efeito da inativação viral, isto é, destruição do vírus ou pela interferência em sua habilidade em iniciar um ciclo de replicação.

Procedimento: Foram adicionadas quantidade de vírus BoHV- 5 titulado, com a quantidade do solvente de acetato de etila ou acetato de butila diluído, na concentração não tóxica para a célula MDBK, em 10 tubos Falcon de 15 mL, mantendo-se em contato por 1 hora na ausência de células, em temperatura ambiente. Após este período, a placa de microtitulação de 96 cavidades com células MDBK confluentes, foram adicionados 100µl/cavidade de cada diluição dos tubos Falcon (10^{-10} a 10^{-1}), incubadas em estufa a 37°C e realizado a leitura da placa em microscópio invertido em 24, 48 e 72 horas¹⁵.

Pré-tratamento: Ocorreu o tratamento das células MDBK com o solvente acetato de etila ou acetato de butila em concentração não tóxica para a célula, com o propósito de avaliação do bloqueio de receptores celulares.

Procedimento: Foram adicionados 100 µl do solvente de acetato de etila ou acetato de butila, em concentrações de diluições não tóxica para a célula, por cavidade de placas de microtitulação, de 96 cavidades de células MDBK confluentes, mantendo-se em contato por 1 hora e incubado em estufa a 37°C. Decorrido este período, foram retirados o sobrenadante de cada cavidade, com o uso do pipetador multicanal e realizada a lavagem das células três vezes consecutivas, com 100µL de Meio DMEM, sem soro fetal bovino e, depois, adicionado 100 µL/cavidade do vírus BoHV-5, diluído na razão 1:10, ou seja, diluições sequenciais 10^{-1} a 10^{-10} e feita a leitura em microscópio invertido após 24, 48 e 72 horas de incubação¹⁵.

Pós-tratamento: Foi feita a inoculação das células com o vírus BoHV- 5,

diluído na razão 1:10, onde pretendeu verificar a capacidade de interferir na replicação viral.

Procedimento: Foram adicionados 100 µl do vírus BoHV- 5, diluído na razão 1:10, ou seja, diluições sequenciais 10^{-10} a 10^{-1} por cavidade de placas de microtitulação, de 96 cavidades de células MDBK confluentes, mantendo-se em contato por 1 hora e incubado em estufa a 37°C. Após este período, foram retirados o sobrenadante de cada cavidade, com o uso do pipetador multicanal e realizada a lavagem das células três vezes consecutivas, com 100µL de Meio DMEM, sem soro fetal bovino e, logo depois, adicionado 100 µL/cavidade do solvente acetato de etila ou acetato de butila, diluído na concentração não tóxica para a célula e feita a leitura em microscópio invertido após 24, 48 e 72 horas de incubação¹⁵.

Resultados

4. RESULTADOS

No presente estudo, o resultado da titulação viral foi obtido pela visualização da ocorrência do efeito citopático (+) até a concentração de diluição 10^{-6} (Tabela 1), sendo que a diluição da dose infectante a 50% do tecido celular (DITC₅₀) ficou entre as diluições 10^{-5} a 10^{-6} . Quando se utilizou o método Reed Muench, obteve-se um título de $10^{5,5}$ DITC₅₀/mL de vírus BoHV-5, uma vez que os valores DITC₅₀ indicaram a capacidade do vírus de infectar apenas 50% das células MDBK. Para atingir essa visualização foram necessárias 72 horas de incubação para determinar o título viral.

Tabela 1. Distribuição das diferentes diluições de vírus BoHV-5 em relação ao efeito citopático.

Diluições	Efeito Citopático
10^{-1}	+
10^{-2}	+
10^{-3}	+
10^{-4}	+
10^{-5}	+
10^{-6}	+
10^{-7}	-
10^{-8}	-
10^{-9}	-
10^{-10}	-

(+): Efeito citopático
(-): Não houve efeito citopático

O resultado da determinação da viabilidade celular, pelo método colorimétrico (MTT), que apresentou maior viabilidade celular e menor toxicidade do solvente, nas diluições sequenciais do solvente acetato de etila, foram nas concentrações que apresentaram 2^{-6} a 2^{-10} . O teste foi realizado em duplicata e teve um controle negativo que apresentou maior viabilidade celular e um controle positivo que teve menor viabilidade celular.

Enquanto que para o resultado da determinação da viabilidade celular, que

apresentou maior viabilidade celular e menor toxicidade, nas diluições sequenciais do solvente acetato de butila, foram nas concentrações de 2^{-8} a 2^{-10} . O teste foi realizado em duplicata e teve um controle negativo que apresentou maior viabilidade celular e um controle positivo que teve menor viabilidade celular.

No que se refere aos ensaios de atividade antiviral, o resultado do teste de inativação viral com o solvente acetato de etila, não houve efeito citopático (-), nas concentrações de diluições 10^{-1} a 10^{-10} , em 24 horas de incubação. A leitura da microplaca por meio da visualização em 48 e 72 horas de incubação, apresentou efeito citopático (+) nas concentrações de diluições 10^{-1} a 10^{-10} , ou seja, não houve interferência na replicação viral nestas diluições (Tabela 2). O teste teve um controle celular com apenas meio DMEM, e apresentou ausência de efeito citopático (-) e o controle viral que apresentou efeito citopático (+).

Tabela 2. Distribuição das diferentes diluições de vírus BoHV-5 e do solvente acetato de etila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.

Diluições	Efeito Citopático		
	24	48	72
10^{-1}	-	+	+
10^{-2}	-	+	+
10^{-3}	-	+	+
10^{-4}	-	+	+
10^{-5}	-	+	+
10^{-6}	-	+	+
10^{-7}	-	+	+
10^{-8}	-	+	+
10^{-9}	-	+	+
10^{-10}	-	+	+

(+): Efeito citopático

(-): Não houve efeito citopático

No que se refere aos ensaios de atividade antiviral, o resultado do teste de inativação viral com o solvente acetato de butila, não houve efeito citopático (-), nas concentrações de diluições 10^{-1} a 10^{-10} , em 24 horas de incubação. A leitura da microplaca por meio da visualização em 48 e 72 horas de incubação, apresentou efeito citopático (+) nas concentrações de diluições 10^{-1} a 10^{-10} , ou seja, não houve interferência na replicação viral nestas diluições (Tabela 3). O teste teve um controle celular com apenas meio DMEM, e apresentou ausência de efeito citopático (-) e o controle viral que apresentou efeito citopático (+).

Tabela 3. Distribuição das diferentes diluições de vírus BoHV-5 e do solvente acetato de butila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.

Diluições	Efeito Citopático		
	24	48	72
10^{-1}	-	+	+
10^{-2}	-	+	+
10^{-3}	-	+	+
10^{-4}	-	+	+
10^{-5}	-	+	+
10^{-6}	-	+	+
10^{-7}	-	+	+
10^{-8}	-	+	+
10^{-9}	-	+	+
10^{-10}	-	+	+

(+): Efeito citopático
(-): Não houve efeito citopático

O resultado do ensaio de pré-tratamento das células MDBK com as diluições do solvente acetato de etila e inoculação viral, não houve efeito citopático (-) nas diluições 10^{-5} a 10^{-10} em 24 horas de incubação. A leitura da microplaca por meio da visualização em 48 e 72 horas de incubação, também não houve efeito citopático (-), nas diluições 10^{-6} a 10^{-10} , ou seja, houve bloqueio dos receptores

celulares nestas diluições (Tabela 4). O controle celular com apenas meio DMEM, não houve efeito citopático (-) e o controle viral apresentou efeito citopático (+).

Tabela 4. Distribuição das diluições do solvente acetato de etila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.

Diluições	Efeito Citopático		
	24	48	72
10 ⁻¹	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+
10 ⁻⁵	-	+	+
10 ⁻⁶	-	-	-
10 ⁻⁷	-	-	-
10 ⁻⁸	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-

(+): Efeito citopático
(-): Não houve efeito citopático

O resultado do ensaio de pré-tratamento das células MDBK com as diluições do solvente acetato de butila e inoculação viral, não houve efeito citopático (-) nas diluições 10⁻⁵ a 10⁻¹⁰ em 24 horas de incubação. A leitura da microplaca por meio da visualização em 48 e 72 horas de incubação, não houve efeito citopático (-) e nas diluições 10⁻⁶ a 10⁻¹⁰, ou seja, houve bloqueio dos receptores celulares nestas diluições, (Tabela 5, pg. 52). O controle celular com apenas meio DMEM, não teve efeito citopático (-) e o controle viral apresentou efeito citopático (+).

Tabela 5. Distribuição das diluições do solvente acetato de butila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.

Efeito Citopático			
Diluições	24	48	72
10 ⁻¹	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+
10 ⁻⁵	-	+	+
10 ⁻⁶	-	-	-
10 ⁻⁷	-	-	-
10 ⁻⁸	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-

(+): Efeito citopático
(-): Não houve efeito citopático

O resultado do ensaio de pós-tratamento da inoculação da célula MDBK com as diluições sequenciais com o vírus BoHV 5 e o solvente acetato de etila, não houve efeito citopático (-) nas diluições 10⁻⁶ a 10⁻¹⁰ em 24 horas de incubação. A leitura da microplaca por meio da visualização em 48 e 72 horas de incubação, não houve efeito citopático (-) nas diluições 10⁻⁷ a 10⁻¹⁰, ou seja, houve interferência na replicação viral, nestas diluições, (Tabela 6, pg. 53). O controle celular com apenas meio DMEM, não apresentou efeito citopático (-) e o controle viral apresentou efeito citopático (+).

Tabela 6. Distribuição das diluições sequenciais do vírus BoHV- 5 e o solvente acetato de etila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.

Efeito Citopático			
Diluições	24	48	72
10 ⁻¹	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+
10 ⁻⁶	-	+	+
10 ⁻⁷	-	-	-
10 ⁻⁸	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-

(+): Efeito citopático
(-): Não tem efeito citopático

O resultado do ensaio de pós-tratamento da inoculação da célula MDBK com as diluições sequenciais com o vírus BoHV 5 e o acetato de butila, não houve efeito citopático (-) nas diluições 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰ em 24 horas de incubação. A leitura da microplaca por meio da visualização em 48 e 72 horas de incubação, não houve efeito citopático (-) nas diluições 10⁻⁵ a 10⁻¹⁰, ou seja, houve interferência na replicação viral, nestas diluições (Tabela 7, pg. 54). O controle celular com apenas meio DMEM, não apresentou efeito citopático (-) e o controle viral apresentou efeito citopático (+).

Tabela 7. Distribuição das diluições sequenciais do vírus BoHV-5 e o solvente acetato de butila em relação ao efeito citopático nos períodos de incubação 24, 48 e 72 horas.

Efeito Citopático			
Diluições	24	48	72
10 ⁻¹	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+
10 ⁻⁴	-	+	+
10 ⁻⁵	-	-	-
10 ⁻⁶	-	-	-
10 ⁻⁷	-	-	-
10 ⁻⁸	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-

(+): Efeito citopático
(-): Não tem efeito citopático

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

É importante salientar que não foi encontrado na literatura estudo com composto do esmalte de unha, os solventes, acetato de etila e acetato de butila, em uma avaliação de atividade antiviral, não permitindo comparação dos resultados, sugerindo trabalho inédito.

Na avaliação da atividade antiviral, a dose infectante nesta pesquisa para cultura de tecido celular, o título foi de $10^{5,5}$ por mL, o que difere com a maioria dos resultados encontrados na literatura que utilizaram este mesmo método para determinar a diluição de vírus capaz de infectar 50% de células inoculadas. Freitas¹⁷ encontrou um título de 10^4 por mL, ao avaliar atividade antiviral de compostos naturais contra dois tipos de vírus, herpes simples humano tipo 1 e poliovírus tipo 2. Enquanto a pesquisa desenvolvida por D Àngelo et al⁵⁴, ao inocularem células MDBK com herpesvírus bovino tipo 1, determinaram título de $10^{6,5}$ e $10^{4,8}$ por mL, tendo como intuito a comparação da sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto e murino. Outra avaliação utilizando herpesvírus bovino tipo 5 como candidatos à vacina, utilizando o mesmo método, determinou o título viral com um valor de $10^{7,4}$, dose infectante para cultura do tecido celular por mL⁵⁵. Na análise realizada por Mancini et al⁵⁶, em relação a atividade antiviral de compostos fenólicos do alecrim foi encontrado um título de $10^{9,5}$ por mL. De acordo com Pavão⁵⁷, em relação à citotoxicidade e interferência do extrato aquoso de *Ateleie glazioviana* (espécie vegetal) sobre a interação do herpesvírus bovino (BoHV-1), com oócitos bovinos durante o período de maturação in vitro encontrou um título de $10^{5,5}$ por mL.

Entretanto ao analisar os dados obtidos com os localizados na literatura, sugere que o valor do título encontrado depende do número de células inoculadas, ou seja, a capacidade que o vírus teve de infectar 50% das células.

Foi encontrado na literatura pesquisa sobre a toxicidade celular para avaliação de diferentes compostos em diferentes concentrações e diluições, porém é escassa em relação aos solventes analisados nesta pesquisa. Apesar de utilizarem células do rim de boi em outros estudos, diferem quanto aos compostos tratados⁵⁸.

Embora perceba-se pelos trabalhos localizados de atividade antiviral de substratos de plantas que utilizam os solventes para extração de compostos bioativos presentes na planta^{17,59}. Isso nos mostra a dificuldade comparativa para avaliação da toxicidade celular a estes solventes testados.

Apesar de não identificar na literatura relatos específicos sobre solventes acetato de etila e acetato de butila na atividade antiviral, o presente estudo evidenciou que apesar de pouca diferença entre as diluições sequenciais, houve replicação viral em diluições mais concentradas de vírus e de solventes. Em outra avaliação da atividade antiviral realizada por Luchemeyer⁵⁹, com extratos do composto natural de folhas de erva-mate, por meio dos ensaios de replicação viral no pré-tratamento, pós- tratamento e ação virucida ou inativação viral. Embora utilizada mesma metodologia, as diluições sequenciais dos extratos do composto natural foram diferentes. Ressalva ainda no ensaio de ação virucida e no pós-tratamento, os compostos inativaram as partículas virais em todas as diluições sequenciais. No entanto, quando os compostos foram adicionados às células antes de ocorrer à inoculação viral, no pré-tratamento, houve replicação viral nas diluições sequenciais. Em outra pesquisa ainda analisando a atividade antiviral, realizada por Müller⁶⁰, em plantas brasileiras, contra o herpesvírus humano tipo1 utilizando ensaios de ação virucida, pré e pós-tratamento desses compostos apresentaram maior inibição da replicação viral foram os tratamentos de ação virucida ou simultâneo como citado e o pós-tratamento, no pré-tratamento apresentou menos eficácia da ação dos solventes na inibição da replicação viral. As análises dos ensaios foram realizadas por meio de visualização do efeito citopático e ensaio colorimétrico.

A limitação do presente estudo, com o uso do esmalte de unha, se deu pelo fato deste produto não ser diluído em meio de cultura para células (DMEN) em sua totalidade, além de conter substâncias muito voláteis que secam o produto rapidamente. Estes dados vem corroborar com a pesquisa de Silva et al⁵ que estudaram os componentes do esmalte de unha, e estabeleceram a proporção dos reagentes envolvidos, mesmo com perdas de produtos devido sua volatilidade. Os dados da presente pesquisa diferem do estudo desenvolvido por Almeida³. Neste

estudo concluiu que o esmalte é um veículo possível de transmissão de micro-organismo, pois utilizou o esmalte de unha, que é composto por: uma combinação complexa de substâncias como resinas, solventes, plastificantes, minerais, pigmentos sintéticos e agentes naturais, sem precisar diluí-lo em meio de cultura, pois utilizou Sabouraud Dextrose Agar, e provou a contaminação e o crescimento de quatro espécies de fungos no esmalte.

Os solventes presentes no esmalte são considerados voláteis⁵, e o profissional de manicure e pedicure, em seu uso diário de trabalho, com o esmalte de unha, de uso coletivo, nos sugere que a concentração destes compostos voláteis, seja menor comparando a sua concentração inicial e final do frasco. Pela volatilidade do solvente a concentração possivelmente difere da preconizada pelo órgão fiscalizador. Em relação esmalte aberto por vários dias, ou seja, considerado mais velho, teve um crescimento maior de fungos. Extrapolando esta possibilidade da concentração destes solventes serem modificados pela volatilidade e podendo alterar sua ação antiviral, sugere que o esmalte pode ser um potencial reservatório ou até mesmo veículo possível de transmissão de vírus. Investigações são necessárias para aprofundar os conhecimentos em relação aos mecanismos de transmissão de vírus, bactérias e fungos por meio do esmalte de unha. Estes dados vêm acrescentar ao estudo de Melo e Isolani²⁶ ao analisarem um número significativo de casos de infecção da hepatite B e hepatite C que provavelmente ocorreram devido ao uso inadequado de materiais de manicure e pedicure por meio do compartilhamento. No entanto os centros de embelezamento que oferecem ao público estes procedimentos devem seguir legislação sanitária vigente, de forma a garantir a segurança dos clientes, bloqueando a cadeia de transmissão por meio destes produtos³⁵.

Pesquisa desenvolvida anteriormente já demonstrava a preocupação da transmissão de micro-organismos em salões de beleza, que há necessidade de uma melhor regulamentação desses serviços pela legislação sanitária⁶¹.

Refletindo sobre os salões de beleza que realizam procedimentos complexos às vezes invasivos, pele e mucosas, há necessidade de maior conhecimento sobre os riscos de cada procedimento a população assim como para os trabalhadores

desta área. Estes dados reforçam os achados de Garcia et al ⁶², quando relatam que os profissionais da área de beleza e os clientes expostos aos riscos patológicos, relacionados à falta do uso de equipamento de proteção individual e os procedimentos de esterilização de materiais inadequados, sugerem a necessidade de ações de qualificação aos profissionais quanto aos aspectos da importância da saúde coletiva.

A adoção das medidas de biossegurança, preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, é necessária para a prevenção da transmissão de micro-organismos entre clientes e profissionais. Entretanto, a baixa adesão às medidas de biossegurança por profissionais foram citados em vários estudos ^{37,38,39,40}. Destacam pouco conhecimento dos profissionais pela falta de informação, os métodos incorretos na esterilização de materiais, a falta de limpeza de superfícies, condutas inadequadas pós-acidente com materiais perfurocortantes e reforçam a necessidade de maior assistência dos órgãos públicos aos profissionais deste segmento na adoção de medidas de biossegurança ^{33, 34, 41,42}.

Pela possibilidade de contaminação no uso de materiais de salões de beleza, compartilhados, por meio de um acidente por contato com materiais biológicos, ou seja, sangue e fluidos corporais, Gir et al ⁶³, citam em seu estudo, a melhor alternativa na prevenção de transmissão de micro-organismos é indicar o uso de material individual e evitar a exposição direta ao sangue. Enquanto Almeida ³, ressalva que além do esmalte de unha apresentar a possibilidade de disseminação de micro-organismos, os fungos, os instrumentais também apresentam riscos biológicos pelo uso compartilhado desses materiais, o que se pode sugerir na possível ocorrência da contaminação pelo vírus.

Na preocupação de disseminação de micro-organismos, os cuidados na desinfecção e esterilização de materiais são preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo ⁶⁴, que estabelecem medidas de biossegurança para obter um ambiente livre de riscos aos trabalhadores e clientes. Pensando na prevenção de doenças transmitidas em um local de grande rotatividade, o salão de beleza, há necessidade de rever junto à Vigilância Sanitária o cumprimento das boas práticas de manuseio de materiais de uso

coletivo junto à fiscalização com maior periodicidade.

Várias doenças são transmitidas pelos fluidos corporais conforme pesquisas realizadas em hospitais ao relatar grande número de notificações de acidentes perfurocortantes e contaminação dos profissionais de saúde, principalmente pelo vírus da hepatite e HIV. Esta preocupação em relação à prevenção de disseminação de micro-organismos foi criada a proposta do uso das medidas de biossegurança em instituições de saúde. Pensando que o embelezamento pode ser considerado como o cuidado do outro, nos sugere a implantação de medidas semelhantes para segurança do cliente em salões de beleza^{36,37,38,39,40}.

Ao falar de segurança do cliente há necessidade de se pensar, nos vários eixos de atendimento ao cliente, principalmente nos casos de processos invasivos, como a proposta de embelezamento da unha no Brasil, portanto é importante enfatizar as medidas de biossegurança.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que houve replicação viral nas diferentes diluições, em maior concentração de solvente e maior número de vírus. Portanto, isso nos sugere a necessidade de cursos de capacitação sobre o possível risco do uso de esmalte de unha de forma coletiva.

Este dado nos permite concluir ainda, que há necessidade de novas pesquisas nesta área, para diminuir o possível risco disseminação de micro-organismos e a contaminação cruzada da população.

Para evitar a exposição aos potenciais riscos os órgãos fiscalizadores deveriam atuar mais nesses estabelecimentos, de forma educativa e na observação da dinâmica do trabalho desses profissionais. Ou até mesmo sugerir às indústrias de esmaltes, elaborarem frascos com quantidades menores com propósito de uso unitário.

Conclui-se ainda que toda esta problemática da exposição da população cada vez mais jovem que busca o salão de beleza no cuidado da aparência, propomos algumas medidas de acordo com a revisão da literatura e do presente resultado desta pesquisa, para controle de transmissão de micro-organismos pelo esmalte e instrumentais utilizados em centros de embelezamento.

RECOMENDAÇÕES

7. RECOMENDAÇÕES SOBRE AÇÕES DE PREVENÇÃO NO CONTROLE DE TRANSMISSÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM SALÕES DE BELEZA.

As ações de prevenção para o controle de Infecção relacionada à assistência a saúde, em especial em salões de embelezamento, deva ter envolvimento do órgão fiscalizador nacional, local, proprietários, funcionários e a população em geral no controle de transmissão de micro-organismos, conforme recomendações abaixo:

ORGÃO FISCALIZADOR LOCAL

- Deva incentivar por meio de fiscalização o registro de abertura junto à Agência de Vigilância Sanitária;
- Estipular prazos no cumprimento das normas e documentação vigente para a abertura do serviço;
- Conscientizar a população da obrigatoriedade desta unidade possuir o certificado da vigilância sanitária afixado em local de fácil visualização;
- Utilizar a mídia para divulgação dos potenciais riscos da população em salões de embelezamento.

PROPRIETÁRIOS DOS SALÕES DE EMBELEZAMENTO

- Deva seguir as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária na implementação de salões de beleza;
- Cumprir determinações da Vigilância Sanitária local na prevenção de riscos a população.

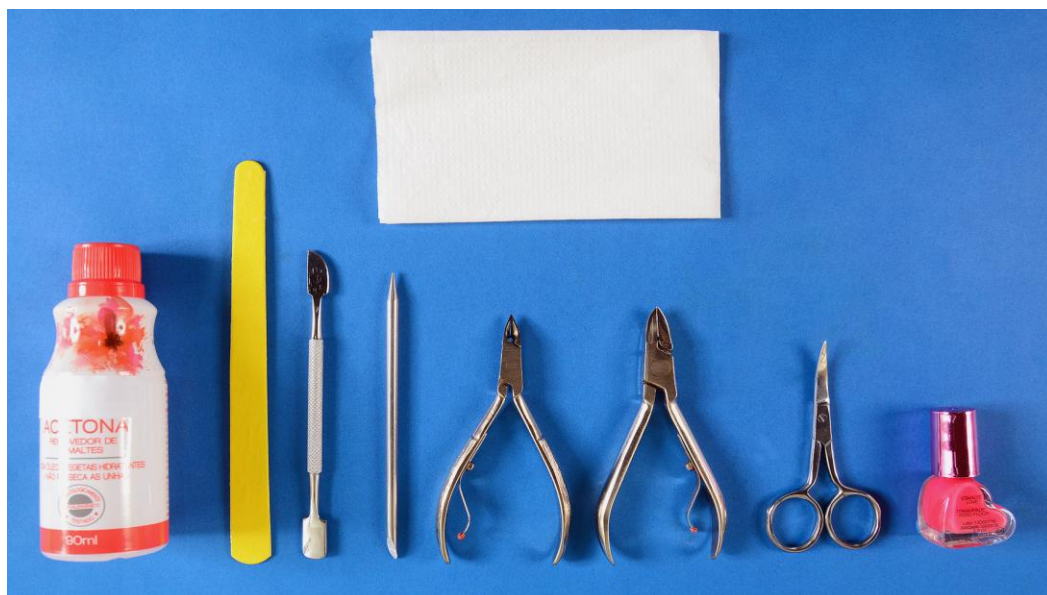
PROFISSIONAIS

- Atualizar- se profissionalmente;
- Manter a carteira de vacinação em dia
- Conhecer as ações em caso de acidentes com perfurocortantes;
- Deva incentivar a utilização individual do “*Kit unha*” (Figura 5), contendo: alicate de cutícula e unha, tesoura, palito, espátula, lixa, esmalte e papel toalha.
- Proceder aos métodos de desinfecção e esterilização de acordo com normas da Vigilância Sanitária;
- Utilizar os equipamentos de proteção individual;
- Utilizar bacias com proteção de plástico descartável com troca a cada cliente;
- Os materiais descartáveis deverão ser desprezados em recipientes resistentes e com tampa;
- Proporcionar ambiente e procedimento com segurança aos clientes.

CLIENTES

- Utilizar salões de beleza que tenham registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- Verificar se os profissionais realizam atividades de atualizações e apresenta preocupações com riscos à população
- Observar a limpeza do local e a lavagem das mãos pelos profissionais antes e após o atendimento ao cliente;
- Ter um kit individual para os materiais como alicate de cutícula e unha, tesoura, espátula, lixa, palito e papel toalha e esmalte;
- Não fazer empréstimos dos materiais determinados como individuais;
- Se optar por usar os instrumentais do salão verificar se existe procedimento de esterilização adequado.

Figura 5. Foto ilustrativa do Kit de unha.



Fonte: Autora

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Vieira Junior EE. Modelo de curso para treinamento dos profissionais que atuam nos salões de beleza usando a teleducação interativa [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.
2. Ministério do Trabalho e Emprego. Classificação Brasileira de Ocupações. Brasília (DF): MTE; 2002.
3. Almeida MTG. Nail polishes: Uncommon fomites for the transmission of pathogenic fungi. *J Microb Biochem Technol*. 2013; 5: 4.
4. Bou- Chacra NA, Ohara MT. Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2003; 39:2.
5. Silva TS, Tristão MS, Andrade Neto MC, Freitas PL, Pereira TDL, Pimenta JS, et.al. Produção de esmaltes comuns de unhas. In: Resumo do 7º Encontro de Tecnologia da Uniube; 16-18 Nov 2011; Uberaba, Brasil. Uberaba: Uniube; 2011.p.1-3.
6. Medeiros JC. Preparação e identificação do acetato de etila e do borato de etila. In: Relatório da Universidade Estadual da Paraíba; 11 Set 2011. Paraíba, Brasil.
7. Wikipedia. A enciclopedia livre [Internet]. São Petesburg (FL): Wikimedia Founation; 2015 [acesso 15 Dez 2015]. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org>.
8. Yamamoto CH, Pinto TJA, Meurer VM, Carvalho AM, Rezende P. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na Zona da Mata, MG. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*. Belo Horizonte; 2004.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta pública no. 25, de Março de 2010. [Internet]. Brasília.: Ministério da Saúde. 2010. [cited 2015 Dezembro de 20]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos [Internet]. Agência nacional de vigilância sanitária. 1ª Ed. Brasília: ANVISA, 2004.
11. Moraes IP, Canuto RF. A importância da estabilidade em produtos cosméticos. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Anápolis (GO): Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Goiás; 2011.

-
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 322, de 31 de Dezembro de 2005. [internet]. Brasília: Ministério da Saúde. 2005 [cited 2015 Dezembro 20]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>.
 13. Mariano A, Mele A, Tosti ME, Parlato A, Gallo G, Ragni P, et al. Role of beauty treatment in the spread of parenterally transmitted hepatitis viruses in Italy. Itália. J Med Virol. 2004; 74: 216-20.
 14. Lopes TGSL, Schinoni MI. Aspectos gerais da hepatite B. Rev Ciênc Biol. 2011; 10:337-44.
 15. Kohn LK, Queiroga C, Martini M, Barata LE, Porto OS, Souza L, et al. In vitro antiviral activity of Brazilian plants (*Maytenus ilicifolia* and *Aniba rosaeodora*) against bovine herpesvirus type 5 and avian metapneumovirus. Pharm Biol. 2012; 50:1269-7.
 16. Stephens PRS, Oliveira MBSC, Ribeiro FC, Carneiro LAD. Capítulo Virologia. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de Saúde. Rio de Janeiro: Ed. IOC; 2010. v. 4, p. 125-220.
 17. Freitas AM. Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2001.
 18. Dezengrine R, Silva SC, Weiss M, Kreutz LC, Weiblen R, Flores EF. Atividade de três drogas antivirais sobre o herpesvírus bovino tipo 1, 2 e 5 em cultivo celular. Pesq Vet Bras. 2010; 30: 855-60.
 19. Araujo SAC, Teixeira MFS, Dantas VM, Miranda AM, Lima FES, Melo VSP et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. Rev Ciênc Anim. 2008; 18: 25-31.
 20. Nogueira EO, Novaes ASM, Sanchez CMS, Andrade CM, Silva MFA. Avaliação do efeito do óleo- resina de copaíba (*Copaifera* SP.) na proliferação celular *in vitro*. Braz J Vet Res Anim Sci. São Paulo. 2012; 49: 293- 00.
 21. Gir E, Takahash RF, Oliveira MAC de, Nichiata LYI, Ciosak SI. Biossegurança em DST/AIDS: condicionantes da adesão do trabalhador de enfermagem às precauções. Ver Esc Enferm. USP 2004 Set; 38: 245- 53.
 22. Canini SRMS, Gir E, Hyashida M, Machado AA. Acidentes perfurocortantes entre trabalhadores de enfermagem de um hospital universitário do interior paulista. Ver Lat Am Enferm. 2002; 10: 172- 8. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2001.

-
23. Ciorlia LAS, Zanetta DMT. Hepatite C em Profissionais de Saúde: risco de exposição e infecção. *Rev Bras Saúde Ocup.* 2003; 28: 91-100.
 24. Pinheiro J, Zeitoune RCG. Hepatite B: conhecimento e medidas de biossegurança e a saúde do trabalhador de enfermagem. *Esc Anna Nery Rev Enferm.* 2008; 12: 258- 64.
 25. Silva JR, Alves F. O Risco dos Profissionais de Saúde à infecção por Hepatites B e C. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Belo Horizonte (MG): Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix; 2013.
 26. Melo FCA, Isolani AP. Hepatite B e C: do risco de contaminação por materiais de manicure/pedicure à prevenção. *SaBios: Rev Saúde Biol.* 2011; 6: 72-8.
 27. Valois RC, Maradei- Pereira LMC, Crescente JAB, Oliveira- Filho AB, Lemos JAR. HCV infection through perforating and cutting material among candidates for blood donation in Belém, Brazilia Amazon. *Rev Inst Med Trop.* 2014; 56: 511- 15.
 28. Moreira ACA, Silva FL, Silva JKF, Carvalho JLM. Grau de Informação dos Profissionais de Salões de Beleza sobre AIDS e Hepatite. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2013; 12: 359-66.
 29. Gir E, Gessolo F. Conhecimentos sobre AIDS e Alterações nas Ações profissionais das Manicures de Ribeirão Preto. *Rev Esc Enferm USP.* 1998; 32:91-100.
 30. Garbaccio JL, Oliveira AC. Adesão e Conhecimento sobre o uso de equipamentos de proteção individual entre manicures e pedicures. *Rev Bras Enferm.* 2015; 68: 52-9.
 31. Silva LMS, Silva DC, Diniz JS, Felipe IMA, Nunes SPH. Prevenção da transmissão de hepatites virais entre manicures e pedicures - uma revisão. *Infarma Ciênc Farm.* 2014; 26: 82-9.
 32. Corrales CL, Sánchez CL, Tunjano JCO, Gómez CPL. Evaluación de la efectividad de los procesos de desinfección de los utensílios en salones de belleza en un municipio de Cundinamarca. *Nova Public Cient.* 2007; 5: 65-9.
 33. Villar LM, Paula VS, Almeida AJA, Rodrigues ÓKM, Miguel JC, Lampe E. Knowledge and prevalence of viral hepatitis among beauticians. *J Med Virol.* 2014; 86: 15-21.

-
34. Deneluz AC, Oliveira ACDS, Fogaccia R. Survey of Hepatitis B and C infection: producers at manicure and pedicure facilities in São Paulo, Brazil. *Bras J Infect Dis*. 2010; 14: 502-7.
 35. Yoshida CH, Oliveira RA, Coelho PG, Fonseca FLA, Filipini R. Processo de Esterilização de Instrumentais em Estabelecimentos Comerciais com Serviços de Manicures e Pedicures. *Acta Paul Enferm*. 2014; 27: 18-22.
 36. Oppermann CM, Pires LC. Manual de biossegurança para serviços de saúde. Porto Alegre: PMPA/ SMS/CGVS; 2003.
 37. Garbaccio JL, Oliveira AC. Biossegurança e risco ocupacional entre profissionais do segmento de beleza e estética: revisão integrativa. *Ver Eletr Enf*. 2012; 14: 702-11.
 38. Diniz AF, Matté CR. Procedimentos de biossegurança adotados por profissionais de serviços de embelezamento. *Saúde Soc*. 2013; 22:751-9.
 39. Oliveira MSN, Figueiredo IGA, Lucena JD, Sousa AM, Uchoa FNM. Investigação da exposição ocupacional de manicure: um estudo transversal. *Rev Inter Toxicol Risco Amb Soc*. 2015; 8:131-44.
 40. Oliveira TC, Santos MSB, Silva JAO, Brasil RAS, Medeiros AH, Souza MS. Biossegurança ações em centros de estética e embelezamento. *Rev Trab Acad Universidade Juiz de Fora*. 2014; 9:1-5.
 41. Oliveira FM, Alves AS, Santos LA, Santana TLS, Silva GM, Kameo SY. Adesão às Medidas de Biossegurança à Hepatite B por Manicures. *Ensaio Cienc Biol Agrar Saúde* 2014; 18:83-90.
 42. Grau MAF, Marcatto MISJ, Sales ZU, Vranjac RM, Maradei R, Pereira, et al. Manual de orientação para instalação e funcionamento de institutos de beleza sem responsabilidade médica. São Paulo: Secretaria do Estado de São Paulo, Centro de Vigilância Sanitária; 2012.
 43. Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo. Coordenação de Vigilância em saúde (COVISA). Beleza com segurança guia técnico para profissionais. São Paulo; 2009.
 44. Lovo FG. Biossegurança Aplicada para Área da Maquiagem [Trabalho de Conclusão de Curso]. Pólo Boa Esperança: Curso Superior em Tecnologia em Gestão de Beleza, Educação a Distância, Universidade Luterana do Brasil; 2011.

-
45. Ardións JP, Navarro MBM, Cardoso TAO. Biossegurança e sistemas de informação: a rede e o gerenciamento de risco. *Cad Saúde Colet.* 2013; 21: 303-8.
 46. Gil AC. Como elaborar projetos de pesquisa. 4a ed. São Paulo: Atlas; 2007.
 47. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopéia Brasileira. 5a ed. Brasília: ANVISA; 2010: v1.
 48. Ebah.com.br[Internet]. sl.sn; 2015[acesso em 13 Maio 2015]. Disponível em <http://www.ebah.com.br>.
 49. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Resolução Nº 466, 12 de Dezembro de 2012. São Paulo: Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ipiranga; 2012.
 50. Gorjão R. Contagem de células. In: Peres CM, Curi R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2005. Cap. 5, p. 22-4.
 51. Gonçalves VN. Pesquisa Laboratorial do Mestrado: Técnica Câmara de Neubauer [Internet]. sl: Ebah; 2011 [acesso 15 Junho 2015]. Disponível em <http://www.ebah.com.br>.
 52. Martins AKA, Boaventura MFC, Lima MMR. Cultivo de linhagens permanentes. Peres CM, Curi R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2005. Cap. 9, p. 41-49.
 53. Chávez JÁ. Avaliação da Atividade Anti-Rábica in vitro de compostos fenólicos sintéticos [dissertação]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.
 54. D'Angelo MD, Galuppo AG, Gonçalves RF. Estudo comparativo da sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino ao herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). *Arq Inst Biol.* São Paulo. 2002; 69: 19- 22.
 55. Souza LFL. Comparação de isolados de herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV- 5) como candidatos à vacina [dissertação]. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2006.
 56. Mancini DAP, Torres RP, Pinto JR, Mancini- Filho J. Inhibition of DNA virus: herpes- 1 treatment extracted from rosemary spice. *Braz J Pharm Scienc.* 2009; 45: 127- 33.
 57. Pavão DL. Avaliação da citotoxicidade e interferência da *Ateleia gaziioviana* na interação do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) com oócitos bovinos

maturados in vitro [dissertação]. São Paulo. Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios; 2009.

58. Rigotto C. Proposta da utilização de adenovírus como indicadores de contaminação viral humana em ostras de cultivo [dissertação]. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis; 2003.
59. Lückemeyer DD. Avaliação da ação anti- herpética de *Ilex paraguaiensis* A. ST. , Aquifoliaceae (erva- mate) [dissertação]. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
60. Müller VDM. Triagem antiviral de extratos vegetais: fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. ST. Hil. Aquifoliaceae (erva- mate) [dissertação]. Florianópolis. Universidade federal de Santa Catarina; 2006.
61. Garbaccio JL, Oliveira AC. O risco oculto no segmento de estética e beleza: uma avaliação do conhecimento dos profissionais e das práticas de biossegurança nos salões de beleza. Text Cont Enferm. 2013; 22: 989- 98.
62. Garcia KAP, Bento CF, Costa KF. Riscos ocupacionais de uma amostra dos profissionais da beleza do município de Goiania. Ver Vis Acad. 2012; 102- 15.
63. Gir E, Takahash RF, Oliveira MACde, Nichiata LYI, Closack SI. Biossegurança em DST/AIDS: condicionantes da adesão do trabalhador de enfermagem às precauções. Rev Esc Enferm. USP.2004; 38: 245- 53.
64. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2010. Disponível em: portal.anvisa.gov.br.