



PDS HPPC

Programa de Desenvolvimento Setorial de
Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ABDI, ABIHPEC e SEBRAE

GUIA DE MICROBIOLOGIA

1ª EDIÇÃO

ABDI

AGÊNCIA BRASILEIRA
DE DESENVOLVIMENTO
INDUSTRIAL

ABIHPEC

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA
INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL,
PERFUMARIA E COSMÉTICOS

SEBRAE

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS
MICRO E PEQUENAS EMPRESAS



Programa de Desenvolvimento Setorial de
Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ABDI, ABIHPEC e SEBRAE

GUIA DE MICROBIOLOGIA

1ª EDIÇÃO

CONTROLE MICROBIOLÓGICO NA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL,
PERFUMARIA E COSMÉTICOS

PROCEDIMENTOS, PARÂMETROS, ORIENTAÇÕES E METODOLOGIAS ANALÍTICAS



2015

APRESENTAÇÃO

O Programa de Desenvolvimento Setorial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (PDS/HPPC), coordenado pela Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), em parceria com a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) e o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), apresenta o Guia de Microbiologia, nova publicação do PDS/HPPC. O Guia faz parte de uma série temática, que visa disponibilizar para as indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) um valioso suporte técnico, estruturado sob a forma de fascículos ou livretos, sobre temas pontuais referentes às etapas, procedimentos, controles e/ou ações pertinentes ao processo produtivo.

O gerenciamento da qualidade microbiológica é uma etapa primordial para assegurar a qualidade do produto final, assim como o controle de qualidade microbiológica possui função de extrema importância, na garantia da segurança e da qualidade dos produtos de HPPC.

A partir deste pensamento, a ABIHPEC coordena o Comitê Brasileiro de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos ABNT/CB 57 e representa o Brasil em reuniões internacionais do ISO/TC 217 Cosmetics no grupo da ISO - International Organization for Standardization, que discute os trabalhos relacionados a este tema por meio de sua Comissão de Estudo de Microbiologia, grupo aberto a participação de toda a sociedade brasileira, em atendimento as regras da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Este fascículo é uma recomendação e disponibiliza um condensado de práticas e metodologias específicas para o setor de HPPC quanto ao controle microbiológico aplicável a estes produtos, bem como no que se refere ao ambiente produtivo, sistemas instalados, equipamentos, matérias-primas e insumos utilizados, em especial para as micro e pequenas empresas.

Os critérios adotados e as práticas descritas neste guia, refletem as normas e os regulamentos técnicos vigentes, estabelecidos para o setor no âmbito de seu controle microbiológico observado o rigor pertinente à matéria.

Nosso agradecimento ao grupo de profissionais de notório saber, participantes da elaboração e revisão desta ferramenta, cuja aplicabilidade e observação ao conteúdo por parte dos produtores e importadores refletirá em produtos disponíveis no mercado com a conformidade requerida para uso seguro de seus consumidores.

A contribuição dos técnicos que atuam no setor foi fundamental para que o trabalho tivesse os critérios necessários e refletisse a responsabilidade e atitude do setor de HPPC.

O Guia não pretende esgotar o assunto e temos a expectativa que novas publicações seguirão no futuro.

João Carlos Basilio | Presidente

Renata Teixeira do Amaral | Gerente de Assuntos Regulatórios

COORDENAÇÃO TÉCNICA

Renata Amaral – ABIHPEC

Juliana Souza – ABIHPEC

APOIO GERENCIAL E COORDENAÇÃO DO PROJETO PDS

Eliene da Conceição - ABIHPEC

ELABORAÇÃO DO MANUAL

Artur João Gradim - AVISA

Marina Anjos - AVISA

GRUPO DE TRABALHO

Andrea Carotta - HYPERMARCAS

Carolina Cacaís - AVISA

Danielle Cunha - JOHNSON & JOHNSON

Débora Rodriguez - NATURA

Karla Constâncio - L'ACQUA DI FIORI

Maria A. Marcondi - HYPERMARCAS

Silvia Yuko Eguchi - GRUPO INVESTIGA

Thamires Rodrigues - AVISA

Vera Lúcia Siqueira - SANQUIMIUS

COLABORADORES

Flávia Montibeller – OXITENO

Juliana Shiki – MARY KAY

Karina Silva – AMWAY

PARCEIROS NO PDS-HPPC

ABDI / ABIHPEC / SEBRAE

LISTA DE SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AW. - Atividade da água ou *water activity*

ATCC - *American Type Culture Collection*

CADRI - Certificado de Movimentação de Resíduos de Interesse Ambiental

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

FMEA - Análise de modo e efeito de falha ou *Failure Mode and Effects Analysis*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO - *International Organization for Standardization*

HPPC - Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

NBRC - *NITE Biological Research Center*

NCTC - *National Collection of Type Cultures*

OGM's - Organismos geneticamente modificados

REBLAS - Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde

SDA - *Sabouraud dextrose agar*

TSA - *Tryptic soy agar*

UFC - Unidade formadoras de colônia ou *colony forming unit*

USP - Farmacopéia Americana ou *United State Pharmacopeia*

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO.....	5
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MICROBIOLOGIA.....	13
2.1	FORMULAÇÃO.....	13
2.1.1	Formulando para não contaminar.....	13
2.2	BIOSSEGURANÇA EM LABORATÓRIOS.....	13
3	CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE PRODUTOS DE HPPC.....	17
3.1	MARCO REGULATÓRIO (RDC 481/99 E GENERALIDADES APLICÁVEIS).....	17
3.2	PRODUTOS E SUSCEPTIBILIDADE.....	18
3.2.1	AW - Atividade da água.....	18
3.2.2	pH.....	18
3.2.3	Teor Alcoólico.....	19
3.3	MATÉRIAS-PRIMAS.....	19
3.3.1	Água.....	19
3.3.1.1	Parâmetros Microbiológicos.....	20
3.3.1.2	Água potável.....	20
3.3.1.3	Portaria MS nº 2914/11.....	21
3.3.1.4	Processos de Purificação.....	21
3.3.1.5	Validação.....	24
3.3.1.6	Uso racional e sustentável.....	24
3.3.2	Matérias-primas de origem animal/vegetal/mineral.....	25
3.3.3	Matérias-primas de origem sintética.....	25
3.4	MATÉRIAS-PRIMAS DE AÇÃO CONSERVANTE.....	25
3.5	EMBALAGEM.....	34
4	GESTÃO DA QUALIDADE.....	35
4.1	CONTROLE DE QUALIDADE DOS EQUIPAMENTOS.....	36
4.2	CONTROLE DE QUALIDADE DE MEIO DE CULTURA, REAGENTES E KITS COMERCIAIS.....	36
4.3	CONTROLE DE QUALIDADE DE COLABORADORES.....	37
4.4	GARANTIA DA QUALIDADE.....	38
4.4.1	Ensaio de Proficiência.....	38
4.4.2	Conceitos Qualificação e Validação.....	38

4.4.3	Incerteza de Medição.....	39
4.4.4	Auditorias Internas.....	39
4.4.5	Controle de Registros.....	40
4.4.6	Relatório de Ensaio.....	41

5 LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA42

5.1	BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO	42
5.1.1	Pessoal.....	42
5.1.2	Instalações Prediais.....	42
5.1.2.1	Fluxo das atividades.....	43
5.1.2.2	Materiais e Tipos.....	43
5.1.2.3	Armazenagem.....	44
5.1.2.4	Higienização (limpeza) e Sanitização.....	44
5.1.3	Equipamentos.....	44
5.1.3.1	Tipos.....	44
5.1.3.2	Qualificação/Calibração/Aferição.....	45
5.1.3.3	Manutenção Preventiva e Corretiva.....	45
5.2	CEPAS.....	46
5.2.1	Identificação de Microrganismos.....	46
5.2.1.1	Coloração de Gram.....	46
5.2.1.2	Coloração de <i>Wirtz-conklin</i>	47
5.2.1.3	Kits de Identificação.....	47
5.2.2	Manutenção de cepas.....	47
5.2.3	Controle de geração.....	52
5.2.4	Validade.....	53

6 CONTROLE E PREPARO DE MATERIAIS PARA ANÁLISE54

6.1	PREPARO DE MATERIAIS E DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	54
6.1.1	Meios de cultura e soluções.....	54
6.1.1.1	Pesagem de meios de cultura.....	56
6.1.1.2	pH.....	57
6.1.1.3	Tipos de esterilização.....	57
6.1.1.4	Validade.....	57
6.1.1.5	Promoção de crescimento / esterilidade.....	58
6.1.1.6	Armazenagem.....	59
6.1.2	Amostras para análise microbiológica.....	60
6.1.2.1	Assepsia.....	60

6.1.2.2	Pesagem.....	60
6.1.2.3	Definição número de amostras.....	60
6.2	INATIVAÇÃO DE SISTEMAS ANTIMICROBIANOS.....	61

7 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS62

7.1	PLAQUEAMENTO.....	62
7.2	CONTAGEM DE MESÓFILOS AERÓBIOS TOTAIS.....	62
7.2.1	Tempo e Temperatura Ótimas de Incubação.....	63
7.2.2	Leituras / cálculos.....	63
7.3	PESQUISA DE PATÓGENOS E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	63
7.3.1	Coliformes Totais e Fecais (<i>Escherichia coli</i>);.....	63
7.3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
7.3.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	66
7.3.4	Clostrídios sulfito redutores.....	67
7.4	TESTE DE DESAFIO DA EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE (CHALLENGE TEST).....	68
7.4.1	Nível de Inóculo.....	69
7.4.2	Microrganismos a serem inoculados.....	70
7.4.3	Volume de microrganismo por amostra.....	71
7.4.4	Homogeneização e armazenagem das amostras inoculadas.....	72
7.4.5	Validação do neutralizante utilizado no teste.....	72
7.4.6	Temperatura e tempo de incubação.....	73
7.4.7	Períodos de teste.....	74
7.4.8	Critério de aceitação (Log de redução por categoria de produtos).....	74
7.4.9	Leituras / Cálculos.....	75
7.5	HALO DE INIBIÇÃO.....	75
7.5.1	Seleção do meio de cultura e microrganismo a ser utilizado.....	75
7.5.2	Difusão em Ágar.....	76
7.5.3	Leitura.....	77
7.5.4	Critério de aceitação.....	77
7.6	REDUÇÃO LOGARÍTIMICA.....	78
7.7	ATIVIDADE ANTISSÉPTICA.....	78
7.7.1	Preparação dos microrganismos-teste.....	79
7.7.2	Toxicidade e Eficácia do Neutralizante.....	79
7.7.2.1	Avaliação da toxicidade do Neutralizante.....	79
7.7.2.2	Eficácia da Neutralização.....	80
7.7.3	Avaliação da Atividade Antimicrobiana da amostra.....	81

7.7.4	Análise de Resultados.....	82
8	CONTROLE MICROBIOLÓGICO NO AMBIENTE INDUSTRIAL	83
8.1	CLASSIFICAÇÃO DE RISCO/SUCEPTIBILIDADE A CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MATERIAIS E ÁREAS	83
8.1.1	Definição dos pontos (alto/médio e baixo risco).....	83
8.1.2	Frequência de testes.....	84
8.1.3	Análise dos dados.....	84
8.2	AMOSTRAGEM (TÉCNICA/TIPO)	85
8.2.1	Amostragem de ambientes: ar (estático e dinâmico).....	86
8.2.2	Superfícies e Equipamentos (rodac/ swab).....	86
8.2.3	Pessoal (swab/rodac).....	87
8.2.4	Matérias-primas- retenção (referências regulatórias).....	88
8.2.5	Outros insumos de processo (panos, escovas, esponjas).....	89
9	LIMPEZA E SANITIZAÇÃO	90
9.1	DEFINIÇÃO CRITICIDADE (PIOR CASO POR AGRUPAMENTO DE PRODUTO/ EQUIPAMENTO/UTENSÍLIOS/PISO).....	90
9.2	QUALIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS	93
9.2.1	Agentes de limpeza, sanitizantes e sua concentração	93
9.2.2	Frequência e tempo de contato	97
9.3	VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE LIMPEZA E SANITIZAÇÃO	97
10	RESÍDUOS / DESCARTES DE MATERIAIS	99
10.1	PROCEDIMENTOS PARA DESCARTE DE MATERIAIS COM RISCO BIOLÓGICO	99
10.2	DESCONTAMINAÇÃO	99
10.3	IDENTIFICAÇÕES DAS ÁREAS COM RISCO MICROBIOLÓGICO -	100
10.4	DERRAMAMENTO DE MATERIAIS CONTAMINADOS	100
11	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
12	GLOSSÁRIO	102
13	BIBLIOGRAFIA.....	104

1 INTRODUÇÃO

Esta publicação destina-se aos profissionais que trabalham com produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos nas áreas de fabricação, qualidade e áreas indiretamente relacionadas à estas. Ainda que a unidade não conte com instalações laboratoriais para análises microbiológicas, a compreensão do conteúdo deste guia servirá como suporte para que contratação de serviço de terceiros seja mais criteriosa, tanto no momento de escolha das análises requeridas e dos prestadores de serviço, como também no planejamento de amostragem e interpretação dos resultados analíticos obtidos.

Técnicos analistas em geral, formuladores de produtos e demais profissionais de pesquisa e desenvolvimento, operadores de fábrica como também compradores, pessoal de Marketing e não apenas os profissionais microbiologistas compõem o público-alvo deste trabalho.

Poderão ainda encontrar suporte técnico para o seu dia-a-dia, professores, alunos e interessados em ingressar na atraente área de HPPC.

Conforme a legislação brasileira vigente e harmonizada no Mercosul, é exigida a apresentação dos dados de Análises Microbiológicas, no ato da regularização do produto. E nas inspeções, é exigida a apresentação dos dados de controle de qualidade dos lotes, dos métodos de ensaio e dos registros das análises.

Este Guia tem por objetivo apresentar aos profissionais e ao segmento da área de Microbiologia uma abordagem sobre os procedimentos, parâmetros e análises microbiológicas em produtos acabados e matérias-primas para HPPC.

2 MICROBIOLOGIA

2.1 FORMULAÇÃO

2.1.1 Formulando para não contaminar

Assegurar a qualidade microbiológica dos produtos é um desafio que deve se iniciar na fase de pesquisa e desenvolvimento. Os químicos formuladores geralmente dão pouca importância para o fato de que certas fórmulas são mais facilmente preservadas da contaminação por microrganismos do que outras. Observar os aspectos físico-químicos destas fórmulas e identificar os fatores que as tornam menos susceptíveis à sobrevivência e ao crescimento de fungos e bactérias pode determinar uma nova técnica de formular o sistema conservante do produto; pode transformar o jeito de se criar fórmulas.

Relegar para o final do trabalho a escolha dos conservantes, tratando-os como simples coadjuvantes é um método que não condiz com as tendências de minimização do uso de conservantes. A criação de produtos autoconservantes atende à demanda de um segmento crescente de consumidores que preferem usar produtos cada vez mais seguros, exige o projeto de complicações regulatórias, além de reduzir custos. Simplesmente retirar os conservantes da fórmula não é a solução.

Algumas das tendências da nova formulação de produtos são: o ajuste da atividade de água e do pH; a utilização de agentes antioxidantes, tensoativos e quelantes; a aplicação de determinadas fragrâncias e de extratos naturais e outros mecanismos para fazer uso de propriedades antimicrobianas ou de componentes de fórmula que são multifuncionais e não são regulamentados como conservantes. A opção por embalagens não-contaminantes do tipo dose única ou *dispensers* também é uma tática para minimizar ou zerar o uso de conservantes (Kabara; Orth, 1997).

É preciso enfatizar que a fabricação de produtos autoconservantes é possível em operações que adotam boas práticas de fabricação e que contam com instalações e equipamentos favoráveis ao controle microbiológico.

Assim, o futuro da qualidade microbiológica de produtos de HPPC é desafiante não apenas para microbiologistas e gestores da qualidade, mas primeiramente para os formuladores e demais profissionais que atuam em tecnologias de inovação.

2.2 BIOSSEGURANÇA EM LABORATÓRIOS

Biossegurança refere-se ao conjunto de medidas voltadas para a prevenção, controle, minimização ou eliminação dos riscos presentes nas atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento

tecnológico e prestação de serviços que podem comprometer a saúde de seres humanos, animais, ambientes e/ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

Partindo-se do princípio de que a prevenção de acidentes é responsabilidade de todos, e considerando-se a natureza dos serviços efetuados em laboratórios de microbiologia, os profissionais devem se informar e estar aptos a cumprir as normas estabelecidas. Portanto, os treinamentos e reciclagens devem ser programados para assegurar que todos os profissionais participem. Se ocorrerem acidentes, estes devem ser comunicados e devidamente monitorados.

Cada laboratório deve dispor de um manual de biossegurança que identifique os riscos e especifique as práticas e os procedimentos que minimizem ou eliminem estes riscos. Deve dispor dos equipamentos de proteção individual e de proteção coletiva necessária às operações.

Os materiais contaminados por agentes biológicos devem ser tratados e dispostos corretamente. Estes podem ser: bactérias, fungos, além das amostras biológicas, não frequentemente encontradas em laboratórios de produtos de HPPC.

Conforme o grau de patogenicidade, os agentes biológicos são entendidos segundo a classificação de risco a seguir (BRASIL, 2006):

- Classe de risco 1: baixo risco para o indivíduo e para a coletividade, com baixa probabilidade de causar doença ao ser humano.
- Classe de risco 2: risco individual moderado para o indivíduo e com baixa probabilidade de disseminação para a coletividade. Podem causar doenças ao ser humano, entretanto, existem meios eficazes de profilaxia e/ou tratamento.
- Classe de risco 3: risco elevado para o indivíduo e com probabilidade moderada de disseminação para a coletividade. Podem causar doenças e infecções graves ao ser humano, entretanto nem sempre existem meios eficazes de profilaxia e/ou tratamento.
- Classe de risco 4: risco elevado para o indivíduo e com probabilidade elevada de disseminação para a coletividade. Apresenta grande poder de transmissibilidade de um indivíduo a outro. Podem causar doenças graves ao ser humano, ainda não existem meios eficazes para a sua profilaxia ou seu tratamento.

Os laboratórios para controle microbiológico de produtos de HPPC, geralmente se enquadram na classe de risco 2.

Com relação ao descarte de resíduos gerados no laboratório, deve ser observado o cumprimento da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), Lei Nº 12.305 de 2 de Agosto de 2010, que define os

termos: resíduos de serviços de saúde e os rejeitos, estes como sendo os resíduos sólidos que, depois de esgotadas todas as possibilidades de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis, não apresentem outra possibilidade que não a disposição final ambientalmente adequada.

As Boas Práticas de Laboratório, que devem estar descritas num manual, podem ser resumidas conforme segue.

- 1.** Restringir o acesso de pessoas ao laboratório; somente os indivíduos autorizados podem ingressar nos ambientes laboratoriais;
- 2.** Observar os princípios básicos de higiene, entre eles: manter as mãos limpas e unhas aparadas; sempre lavar as mãos antes e após procedimentos (manuseio de materiais biológicos viáveis; uso das luvas; antes de sair do laboratório; antes e após a ingestão dos alimentos e bebidas, etc.). Se não existirem pias no local, deve-se dispor de líquidos anti-sépticos para limpeza das mãos;
- 3.** Proibir: a ingestão e/ou o preparo de alimentos e bebidas, fumar, mascar chicletes, manipular lentes de contato, utilização de cosméticos e perfumes, armazenamento de alimentos para consumo nas áreas de manipulação de agentes biológicos e químicos. Em todos os laboratórios deve haver uma área designada como refeitório;
- 4.** Pipetar com a boca é expressamente proibido e jamais se deve colocar na boca objetos de uso no laboratório (canetas, lápis, borrachas, pipetas, entre outros);
- 5.** Utilizar calçados de proteção: fechados, confortáveis, com solado liso e antiderrapante;
- 6.** Usar as luvas de procedimentos durante e somente atividades laboratoriais e evitar tocar em objetos de uso comum;
- 7.** Trajar roupas de proteção durante as atividades laboratoriais, tais como: jalecos, aventais, macacões, entre outros. Essas vestimentas não devem ser usadas em outros ambientes fora do laboratório, como: escritório, biblioteca, salas de estar e refeitórios;
- 8.** Evitar o uso de qualquer tipo de acessório/adorno durante as atividades laboratoriais;
- 9.** Manter os artigos de uso pessoal fora das áreas designadas às atividades laboratoriais;
- 10.** Organizar os procedimentos operacionais padrões (POP) para o manuseio dos equipamentos e técnicas empregadas nos laboratórios;
- 11.** Garantir que a limpeza dos laboratórios (bancadas, pisos, equipamentos, instrumentos e demais superfícies) seja realizada regularmente antes e imediatamente após o término das atividades laboratoriais. Em caso de derramamentos, dependendo do tipo e quantidade de material biológico disseminado, pode-se empregar para a descontaminação do local álcool 70% ou solução de hipoclorito de sódio, preferencialmente, 10%, deixando agir por 30 minutos e removendo com papel absorvente em seguida;
- 12.** Assegurar que os resíduos biológicos sejam descontaminados antes de serem descartados;
- 13.** Manusear, transportar e armazenar materiais (biológicos, químicos e vidrarias) de forma segura

para evitar qualquer tipo de acidente. O manuseio de produtos químicos voláteis, metais, ácidos e bases fortes, entre outros, necessita ser realizado em capela de segurança química. As substâncias inflamáveis precisam ser manipuladas com extremo cuidado, evitando-se proximidade de equipamentos e fontes geradoras de calor;

- 14.** Usar os EPIs adequados durante o manuseio de produtos químicos;
- 15.** Identificar adequadamente todos os produtos químicos e frascos com soluções e reagentes, os quais devem conter a indicação do produto, condições de armazenamento, prazo de validade, toxicidade do produto e outros;
- 16.** Acondicionar os resíduos biológicos e químicos em recipientes adequados, em condições seguras e encaminhá-los ao serviço de descartes de resíduos dos laboratórios para receberem o seu destino final;
- 17.** Aplicar/fixar a sinalização adequada nos laboratórios, incluindo o símbolo internacional de "Risco Biológico" na entrada dos laboratórios;
- 18.** Instituir um programa de controle de roedores e vetores;
- 19.** Evitar que técnicos trabalhem sozinhos e jornadas de trabalho prolongadas;
- 20.** Providenciar treinamento e supervisão aos profissionais iniciantes;
- 21.** Disponibilizar kits de primeiros socorros e promover a capacitação dos usuários em segurança e emergência.

3 CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE PRODUTOS DE HPPC

3.1 MARCO REGULATÓRIO (RDC 481/99 E GENERALIDADES APLICÁVEIS)

Os produtos de HPPC sujeitos ao controle microbiológico foram divididos em 02 subgrupos (Tipo I e Tipo II), de acordo com a faixa etária e local de aplicação, conforme tabela a seguir:

Tabela 01: Parâmetros de controle microbiológico para produtos de HPPC - (RDC nº 481, 23 de setembro de 1999 da ANVISA)

	Área de Aplicação e Faixa Etária	Limites de Aceitabilidade
TIPO I	<ul style="list-style-type: none">• Produtos para uso infantil• Produtos para área dos olhos• Produtos que entram em contato com mucosas	<p>a) Contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos totais, não mais que 10^2 UFC/g ou mL.</p> <p>Limite Máximo de 5×10^2 UFC/g ou mL;</p> <p>b) Ausência de <i>Pseudomas aeruginosa</i> em 1g ou mL;</p> <p>c) Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> em 1g ou mL;</p> <p>d) Ausência de Coliformes Totais e fecais em 1g ou mL;</p> <p>e) Ausência de Clostrídios sulfito redutores em 1g.</p>
TIPO II	<ul style="list-style-type: none">• Demais produtos susceptíveis à contaminação microbiológica	<p>a) Contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos totais, não mais que 10^3 UFC/g ou mL.</p> <p>Limite Máximo de 5×10^3 UFC/g ou mL;</p> <p>b) Ausência de <i>Pseudomas aeruginosa</i> em 1g ou mL;</p> <p>c) Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> em 1g ou mL;</p> <p>d) Ausência de Coliformes Totais e fecais em 1g ou mL;</p> <p>e) Ausência de Clostrídios sulfito redutores em 1g.</p>

3.2 PRODUTOS E SUSCEPTIBILIDADE

Uma série de características do produto precisam ser avaliadas quando se realiza uma análise de risco microbiológico, para determinar se esse produto deve ser submetido às normas internacionais publicadas para produtos de HPPC ou outros métodos relevantes. Estas características incluem a composição do produto, as condições de produção, embalagem e uma combinação destes fatores.

Determinadas características físico-químicas contribuem para a não proliferação de microrganismos indesejáveis ao produto cosmético. Fatores subletais irão aumentar a hostilidade do ambiente e a fase de latência. Se o ambiente é suficientemente hostil, a fase lag (fase de adaptação metabólica) vai estender-se ao infinito e, portanto, causar a morte celular. A combinação de vários fatores letais irá causar a morte celular mais rápida. Os seguintes fatores devem ser considerados para determinar se os produtos de HPPC apresentar um ambiente hostil dos microrganismos.

3.2.1 a_w - Atividade da água

Água é um dos fatores mais importantes que controlam a taxa de crescimento de um microrganismo. Não é o teor de umidade total que determina o potencial para o crescimento, mas a água disponível na formulação. O metabolismo e reprodução de microrganismos exigem a presença de água numa forma disponível. A forma mais eficaz de medição de água na formulação do produto é a atividade da água a_w . A atividade de água é definida conforme a fórmula abaixo:

$$a_w = \frac{p}{p_0} = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

Onde:

- p é a pressão de vapor da solução;
- p_0 é a pressão de vapor da água pura;
- n_1 é o número de mols do soluto;
- n_2 é o número de mols de água.

3.2.2 pH

Determinados tipos de produtos, com valores de pH extremos (maior que 10 e abaixo de 3) não exigem testes microbiológicos, tanto teste de desafio (*Challenge test*) como teste do produto final. Em todos os outros valores de pH ($3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$) uma combinação de pH e outros fatores físico-químicos tem de ser avaliada para determinar o risco potencial. Dados para apoiar a conclusão de que o risco microbiológico é baixo precisa ser gerado, seja através de *desing* experimental ou histórico do produto.

3.2.3 Teor Alcoólico

Produtos que contenham teor de álcool acima de 20% em massa por volume não exigem testes microbiológicos (teste de desafio e teste do produto final) abaixo desse teor, outros fatores físico-químicos precisam ser avaliados para determinar o risco potencial. Para definir-se que o risco microbiológico é baixo são necessários dados, que podem ser obtidos tanto através de testes como histórico do produto.

3.3 MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas usadas em produtos de HPPC normalmente são inócuas para a saúde, com raras exceções, logo suas quantidades deverão ser estritamente controladas. O uso industrial de substâncias químicas está sujeito a normas de órgãos reguladores, no Brasil os produtos de HPPC precisam ser registrados na ANVISA, Nos Estados Unidos o controlador é o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão governamental cujas normas são frequentemente adotadas por outros países. Essas normas são baseadas em estudos de cada substância com respeito a sua toxicidade para o homem, animais e meio ambiente, a curto e longo prazo, determinando quais são as substâncias inócuas e definindo limites para sua utilização na produção de produtos de HPPC.

As matérias-primas são classificadas como excipientes ou princípios ativos. Excipiente é todo aquele ingrediente inerte adicionado a uma formulação que lhe confere consistência para que a formulação possa ser aplicada, manipulada e embalada apropriadamente. Os excipientes são essenciais na produção de produtos HPPC porque proporcionam diferentes veículos de aplicação, com distintos tamanhos, volumes e características. Existem mais de 8.000 excipientes aprovados pelo FDA para uso em produtos HPPC.

Os princípios ativos são substâncias que efetivamente atuam e promovem modificações sobre a região em que o cosmético será aplicado e cuja as quantidades precisam ser controladas em virtude dos limites aceitáveis de aplicação, da sua toxicidade, das consequências de dose excessivas, de possíveis efeitos colaterais e da possibilidade de sensibilização e reações alérgicas.

Pigmentos, soluções, corantes orgânicos e fragrâncias são grupos especiais de matérias-primas, pois apesar de serem inertes e não modificarem muito o local de aplicação, sua quantidade necessita ser muito bem controlada.

3.3.1 Água

A água é a matéria-prima de maior volume na fabricação de um produto de HPPC. Ela é utilizada no processo de fabricação como veículo ou como matéria-prima, além disso, a água é utilizada na limpeza e sanitização de equipamentos e instalações.

3.3.1.1 Parâmetros Microbiológicos

Conforme a RDC nº 48, 25 de outubro de 2013 da ANVISA, os sistemas de água devem ser monitorados segundo uma periodicidade que garanta que o sistema produza uma água de qualidade aceitável. Os pontos de coleta de água devem ser representativos abrangendo áreas críticas. A frequência deve ser determinada baseada nos dados da validação do sistema.

A sugestão de limite microbiológico em água de processo é: máximo de 100 UFC/ mL de contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais, ausência de *Pseudomonas aeruginosa* e Coliformes totais e fecais em 100 mL.

3.3.1.2 Água potável

Dentro de todas as matérias-primas, a água é a mais amplamente utilizada na formulação e fabricação de produtos de HPPC. Além de usada como solvente de componentes (corantes, aditivos, etc.) a água constitui parte significativa da maioria dos produtos de HPPC.

Além da incorporação no produto final, uma grande quantidade de água de qualidade superior (água potável e também água purificada) é utilizada em operações de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios, para garantir a qualidade do produto final.

A presença na água de impurezas como cálcio, magnésio, ferro e alumínio originam a lenta formação de resíduos invisíveis, frequentemente agravada pela precipitação dos componentes menos solúveis da composição de perfumes. Se houver a presença de compostos orgânicos fenólicos, tais como antioxidantes e estabilizadores de ultravioleta, podem-se ter alterações de cor devido à reação destes com traços de metais, formando compostos corantes (WILKINSON; MOORE, 1990).

No caso de emulsões a presença de grandes concentrações de íons inorgânicos, tais como magnésio e zinco, pode conduzir a separação de fases, por interferir no equilíbrio de cargas estáticas responsáveis pelo funcionamento adequado de certos tensoativos da formulação. A presença destes íons em cremes, loções e shampoos pode levar a alteração de viscosidade.

Outro aspecto importante é a presença de contaminantes microbiológicos. Se houver a proliferação de microrganismos no cosmético, o resultado será a inutilização do produto devido ao desenvolvimento de odores desagradáveis, colônias visíveis de bactérias, mofo ou fungos e, no caso de emulsões, a separação de fases. A tudo isso se soma o mais grave que é o risco potencial à saúde do consumidor. (WILKINSON; MOORE, 1990).

A portaria MS nº 2914 de 2011 do Ministério da Saúde estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade,

porém para o uso na indústria de produtos de HPPC, água com características específicas deve ser empregada em alguns processos.

3.3.1.3 Portaria MS nº 2914/11

Estabelece parâmetros físico-químicos, microbiológicos e radioativos da água para consumo humano.

Tabela 02: Parâmetros microbiológicos Água Potável

Microrganismos	Parâmetros
Contagem Heterotróficas	Até 500 UFC/mL
Coliformes Totais	Ausência em 100 mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausência em 100 mL

3.3.1.4 Processos de Purificação

O processo de purificação da água é baseado na eliminação de impurezas físico-químicas, biológicas e microbianas até se obterem níveis preestabelecidos em compêndios oficiais.

Os materiais que entram em contato com a água, incluindo a tubulação, válvulas, os lacres, os diafragmas e os instrumentos, necessitam ser selecionados para atender aos requisitos básicos, dentre os quais podem ser citados:

- **Compatibilidade:** todos os materiais utilizados necessitam ser compatíveis com a temperatura e as substâncias químicas utilizadas pelo sistema ou dentro dele;
- **Prevenção de vazamento:** nenhum dos materiais que entram em contato com a água pode apresentar vazamentos;
- **Resistência à corrosão:** para evitar falha do sistema e contaminação da água, os materiais selecionados necessitam ser apropriados e todos os vedantes e componentes devem ser compatíveis com a tubulação utilizada;
- **Acabamento interno liso:** devem ser utilizadas superfícies internas lisas que ajudem a evitar

asperezas e fissuras no sistema de água;

- **Soldagem:** os materiais selecionados para o sistema necessitam ser facilmente soldáveis, de forma controlada;
- **Desenho de flanges ou juntas:** quando são utilizados flanges ou juntas, eles devem ser projetados para atender a critérios higiênicos sanitários. Devem ser realizadas verificações para garantir que os lacres corretos sejam usados e que estejam encaixados e ajustados corretamente;
- **Documentação:** todas as informações referentes aos componentes do sistema como os procedimentos de limpeza, sanitização e manutenção devem ser plenamente documentados;
- O sistema deve permitir a realização da amostragem no ponto de uso bem como o de entrada e saída do sistema de tratamento da água. Recomenda-se realizar um controle microbiológico através de análises periódicas.

Essa água deve possuir os seguintes parâmetros:

Tabela 03: Parâmetros de qualidade para utilização de água purificada

Parâmetro	Critério de Qualidade
pH	5~7
Condutividade	0,6~4,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20°C
Contagem bacteriológica	<100 UFC/100mL
COT	<500 ppb

Para obtenção de água com esse padrão de qualidade os seguintes tratamentos são possíveis, partindo-se da água potável disponível:

- Sistemas de troca iônica;
- Sistemas de osmose reversa;
- Sistemas de destilação;

Troca iônica por passagem em leito de resinas

De todos esses métodos o que é mais utilizado é o de troca iônica devido ao seu menor custo de implantação e operação.

Nesse processo a água potável após passar por sistemas de filtração em leito de areia para retirar sólidos em suspensão e também em leito de carvão ativado, para remoção do cloro livre, como medida de proteção das resinas. Em seguida a água passa por leitos de resina, onde ocorre a remoção de cátions Ca^{++} , K^{++} , Na^+ , Mg^{++} , substituídos por cátion hidrogênio (H^+). Depois a água passa por leitos de resina aniônica, onde ocorre a substituição dos ânions SO_4^{-2} , NO_3^- , Cl^- , HCO_3^- , HSiO_3^- , por ânion hidroxila (OH^-) (CUNHA, 1991).

A regeneração das resinas catiônicas deve ser realizada com ácido sulfúrico ou clorídrico (mais empregado) e a regeneração das resinas aniônicas com solução de hidróxido de sódio.

Emprega-se atualmente, com frequência, uma combinação das resinas catiônicas e aniônicas em um mesmo leito, chamando então de sistema de leito misto. Esse arranjo é particularmente interessante para as águas brasileiras que em geral, possuem baixa salinidade se comparadas às águas de outros países. Isso torna mais econômico o processo devido ao menor número de componentes e equipamentos.

Osmose reversa

Outro processo de produção de água purificada utilizada a tecnologia de osmose reversa. Nesse processo a água potável após tratamento prévio passa sob pressão tangencialmente por um conjunto de elementos de membranas semipermeáveis, que permite que a água permeie através da membrana deixando na corrente original os íons e outras impurezas indesejáveis.

O desempenho de osmose reversa depende dos seguintes fatores (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001).

- **Temperatura:** a rejeição de sais diminui com o aumento de temperatura.
- **Pressão:** a rejeição aumenta com o aumento da pressão.
- **pH:** a rejeição é relativamente constante na faixa de pH de operação.
- **Concentração de sais:** a qualidade do permeado diminui com o aumento da concentração de sais na água de alimentação.
- **Rendimento:** a qualidade do permeado diminui com o aumento do rendimento da membrana.

O processo de osmose reversa permite diversas configurações, que envolvem a possibilidade de recirculação, o que aumenta a produção de água, e a utilização de duplo passe, melhorando a sua

eficiência do ponto de vista de separação de sais, porém diminuindo a sua vazão de produção.

As membranas atualmente utilizadas podem ser acondicionadas em sistemas modulares que podem ser multiplicados conforme necessidade.

A água potável que alimenta o sistema de osmose reversa necessita ser pré tratada para que esteja livre de impurezas e de cloro que podem danificar ou reduzir a vida útil das membranas. O sistema de pré tratamento bem como o próprio conjunto de módulos de membranas necessitam de um bom controle de limpeza e também de sanitização periódica (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001).

Destilação

O terceiro processo para purificação de água, a destilação, é o mais empregado na indústria cosmética para obtenção de água estéril em pequenas quantidades. Como meio de obtenção de grandes quantidades de água purificada a destilação apresenta custo elevado, em decorrência da energia envolvida. Além da energia consumida para o sistema de evaporação é necessário igualmente um sistema de refrigeração para condensar o vapor para fase líquida. Tudo isso faz com que seja um sistema não utilizado nas operações industriais, porém pode ser utilizado em laboratórios de microbiologia.

3.3.1.5 Validação

A evidência documentada requerida no processo de validação resulta na geração de uma série de documentos que espelha o grau de confiabilidade do sistema. O documento básico inicial é o protocolo de validação. Nele se inclui a definição clara do processo a validar, os objetivos da validação, o pessoal responsável, os procedimentos e métodos empregados, as análises físico-químicas e microbiológicas a serem realizadas, a periodicidade, a indicação dos pontos de amostras e os critérios de aceitação. Outros documentos são requeridos no processo de validação, visando comprovar a qualificação de pessoal envolvido: os materiais empregados, a aferição e calibração de instrumentos, procedimentos operacionais e registro das operações, todos relacionados e condensados num relatório final.

3.3.1.6 Uso racional e sustentável

Quando se fala em uso racional e sustentável da água, a atenção deve ser direcionada para a forma de utilização deste recurso. Neste caso, a redução do consumo é um dos objetivos principais que deve ser buscado com todo esforço, devendo ser consideradas as seguintes ações (MATSUMURA; MIETZWA, 2008):

- **eliminar perdas físicas:** identificar vazamentos em tubulações (válvulas, conexões, etc.).
- **implantar melhorias na operação:** colocação de hidrômetros para melhorar o controle

de consumo, substituição de equipamentos por outros mais econômicos, verificar a possibilidade de usar resfriamento a ar.

- **corrigir operações inadequadas:** com o controle de consumo verificar se purgas em torres de resfriamento ou camisas de aquecimento, por exemplo, estão dentro do que é esperado para esses processos e se está havendo desperdícios.
- evitar o uso de água de melhor qualidade para aplicações onde esta não é necessária.

É importante, então o conhecimento dos processos e equipamentos para que uma avaliação criteriosa e ações de “caça aos desperdícios” possam ser conduzidas com sucesso. Muitas vezes é necessária a busca de novas tecnologias que possibilitem a substituição de equipamentos por outros de melhor desempenho em termos de consumo de água ou mesmo a instalação de dispositivos para redução do consumo (MIERZWA; HESPANHOL, 2005).

A utilização de processos de produção e de sistemas de lavagem com baixo consumo de água deve ser estimulada desde a fase de projeto. Como por exemplo, água de determinados processos como lavagem de filtros e de decantadores pode ser recuperada e reutilizada em outros processos, desde que atendam aos parâmetros de qualidade para estes.

As ações devem também ter foco no pessoal operacional, na medida em que melhor capacitação leva à execução de tarefas com regularidade e dentro de padrões pré-estabelecidos para as mesmas. Assim, treinamentos e campanhas de conscientização contra o desperdício devem ser realizados regularmente (MIERZWA,2005).

3.3.2 Matérias-primas de origem animal/vegetal/mineral

Como sugestão de limite microbiológico em matérias-primas de origem sintética é de no máximo 500 UFC/g ou mL para microrganismos mesófilos aeróbios totais.

3.3.3 Matérias-primas de origem sintética

Como sugestão de limite microbiológico em matérias-primas de origem sintética é de no máximo 500 UFC/g ou mL para microrganismos mesófilos aeróbios totais. Ausência de patógenos em 1 g ou mL (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, coliformes totais e fecais, *Clostridium* sp (exclusivamente para pós).

3.4 MATÉRIAS-PRIMAS DE AÇÃO CONSERVANTE

São substâncias que são adicionadas como ingrediente aos produtos de HPPC com a finalidade de inibir o crescimento de microrganismos durante sua fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da

contaminação inadvertida durante o uso.

Outras substâncias utilizadas na fórmula dos produtos de HPPC podem ter propriedades antimicrobianas, podendo por esse fato, contribuir para a conservação desses produtos, como por exemplo, muitos óleos essenciais e alguns álcoois.

É desejável que um conservante apresente:

- Amplo espectro de ação;
- Estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura;
- Compatibilidade com ingredientes da fórmula;
- Compatibilidade com embalagem;
- Não interferência com características do produto;
- Não inocuidade ao consumidor e ao ambiente;
- Aprovação das agências reguladoras (RDC nº 29, 01 de junho de 2012 da ANVISA);

Tabela 04: Lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes

Nº ORD	Substância	Máxima Concentração Autorizada	Limitações	Condições de Uso e Advertências
1	Ácido benzóico (número CAS 65-85-0) e respectivo sal de sódio (número CAS 532-32-1) (*) (BENZOIC ACID, SODIUM BENZOATE)	a) 2,5% (ácido) Produtos que se enxáguem, exceto os produtos para higiene bucal b) 1,7% (ácido) Produtos de higiene bucal c) 0,5% (ácido)	Proibido em sistema pulverizáveis (como aerossóis e sprays) quando a concentração for maior que 0,5%.	
2	Sais de ácido benzoico não incluídos no número de ordem 1 e estéres de ácido benzóico	0,5% (expresso como ácido)		
3	Ácido propiônico e seus sais (PROPIONIC ACID & salts)	2,0% (expresso como ácido)		

Nº ORD	Substância	Máxima Concentração Autorizada	Limitações	Condições de Uso e Advertências
4	Ácido salicílico e seus sais (*) (SALICYLIC ACID & salts)	0,5% (expresso como ácido)	Proibido para produtos para crianças com menos de 3 anos de idade, com exceção dos shampoos.	Para produtos de uso adulto: "Não usar em crianças". Para produtos destinados ao público infantil: "Não usar em crianças menores de 3 anos de idade" (exceto para shampoos).
5	Ácido sórbico e seus sais (SORBIC ACID & salts)	0,6% (expresso como ácido)		
6	Sorbato de Trietanolamina (*)	0,6% (expresso como ácido)		
7	Bifenil -2-ol (o-fenilfenol) e seus sais (O-PHENYLPHENOL & salts)	0,2% (expresso como fenol)		
8	Piritionato de zinco (*) (número CAS 13463-41-7) (ZINC PYRITHIONE)	a) 1,0% produtos capilares b) 0,5% outros produtos	Somente em produtos enxaguáveis. Proibido em produtos de higiene bucal.	
9	Sulfitos e Bisulfitos inorgânicos (*) (AMMONIUM SULFITE & BISULFITE, etc.)	0,2% (expresso como SO ² livre)		
10	1,1,1- Tricloro- 2- metilpropanol- 2 – (clorobutanol) (CHLOROBUTANOL)	0,5%	Proibido em sistemas pulverizáveis (como aerossóis e sprays).	Contém clorobutanol.
11	Ácido 4- hidroxibenzóico, seus sais e ésteres (4- HIDROXYBENZOIC ACID, salts & esters: METHYLPARABEN, PROPILPARABEN, etc)	a) 0,4% (expresso como ácido individual) b) 0,8% (expresso como ácido) para misturas de sais e ésteres		
12	Ácido dehidroacético e seus sais (DEHYDROACETIC ACID & salts)	0,6% (expresso como ácido)	Proibido em sistemas pulverizáveis (como aerossóis e sprays).	
13	Ácido fórmico e seu sal sódico (FORMIC ACID & sodim salt)	0,5% (expresso como ácido)		
14	3,3'- Dibromo- 4,4'hexametileno- dioxidibenzamidina e seus sais (incluindo isotionato) (dibromohexamidina) (DIBROMOHEXAMIDINE & salts)	0,1%		

Nº ORD	Substância	Máxima Concentração Autorizada	Limitações	Condições de Uso e Advertências
15	Tiosalicilato de etilmercurio sódico (THIMEROSAL)	0,007% (de Hg). Se misturado com outros compostos mercuriais o total de Hg não pode ser maior que 0,007% no produto final	Somente para maquiagem e demaquilante para a área dos olhos.	Contém timerosal.
16	Fenilmercúrio e seus sais (incluindo borato) (PHENYLMERCURIC & salts) PHENYL MERCURIC BORATE (*)	0,007% (de Hg). Se misturado com outros compostos mercuriais o total de Hg não pode ser maior que 0,007% no produto final	Somente para maquiagem e demaquilante para a área dos olhos.	Contém compostos fenilmercuriais.
17	Ácido undecanóico- 10-eno, (undecilênico), seus sais, ésteres, aminas e sulfosuccinato (*) (UNDECYLENIC ACID & SALTS)	0,2 % (expresso como ácido)		
18	Amino- 5 bis (etil-2-hexil)-1,3 metil-5-perhidropirimidina (HEXETIDINE)	0,1%		
19	5- Bromo-5-nitro-1,3 dioxano (5-BROMO-5-NITRO-1,3-DIOXANE)	0,1%	Somente para produtos que se enxáguem. Evitar formação de nitrosaminas.	
20	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol) (2-BROMO-2-NITROPROPANE-1,3-DIOL)	0,1%	Evitar formação de nitrosaminas.	
21	3,4,4'- Triclorocarbanilida (*) (TRICHLOROCARBAN)	0,2%	Critério de pureza: 3,3',4,4'-Tetracloro-azobenzeno menor que 1ppm 3,3',4,4'-Tetracloro-azoxibenzeno menor que 1ppm	
22	p-cloro-metacresol (*) (p-CHLORO-m-CRESOL)	0,2%	Proibido em produtos destinados a entrar em contato com mucosas.	
23	p-cloro-metaxilenol (CHLOROXYLENOL)	0,5%		
24	Imidazolidinil ureia (IMIDAZOLIDINYL UREA)	0,6%		
25	Cloridrato de polihexametileno biguanida (POLYAMINOPROPYL BIGUANIDE)	0,3%		

Nº ORD	Substância	Máxima Concentração Autorizada	Limitações	Condições de Uso e Advertências
26	2-fenoxietanol (PHENOXYETHANOL)	1,0%		
27	6- Clorotimol	0,1%	Proibido em produtos infantis.	
28	Cloreto de 1-(3-cloroalil)-3,5,7- triazo-1-azoniadamantano (QUATERNIUM 15)	0,2%		
29	1-(4-clorofenoxi)-1-(1-imidazolil)-3,3-dimetil-2-butanona (CLIMBAZOLE)	0,5%		
30	1,3-Dimetilol-5,5-dimetilhidantoína (DMDM HYDANTOIN)	0,6%		
31	2-Feniletanol	0,5%		
32	Álcool benzílico (*) (BENZYL ALCOHOL)	1,0%		
33	1-Hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetilpentil)-2-piridona e seus sais de monoetanolamina (Octopirox) (*) (PIROCTONE OLAMINE)	a) 1,0% para produtos que se enxaguem b) 0,5% para produtos que não se enxaguem		
34	4-Isopropil-m-cresol (O-CYMEN-5-OL)	0,1%		
35	Mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona e 2-metil-4-isotiazolina-3-ona com cloreto de magnésio e nitrato de magnésio (3:1) (METHYLISOTHIAZOLINONE + METHYL CHLORO ISOTIAZOLINONE)	0,0015% (de uma mistura na proporção 3:1 de 5-cloro-2-methyl-isothiazol-3(2H)-one e 2-methylisothiazol-3(2H)-one)		
36	2-Benzil-4-Clorofenol (CHLOROPHENE)	0,2%		
37	2-Cloroacetamida (CHLOROACETAMIDE)	0,3%		Contém cloroacetamida.
38	Bis-(clorofenildiquanida)-1,6-hexano: acetato, gluconato e cloridrato (CHLORHEXIDINE DIACETATE, DIGLUCONATE DIHYDROCHLORIDE)	0,3% (expresso como cloroheixidina)		

Nº ORD	Substância	Máxima Concentração Autorizada	Limitações	Condições de Uso e Advertências
39	1-Fenoxi-2-propanol (*) (PHENOXYISO-PROPANOL)	1,0%	Somente para produtos que se enxáguem.	
40	4,4-Dimetil-1,3-oxazolidina (DIMETHYL OXAZOLIDINE)	0,1%	pH do produto acabado não deve ser menor do que 6.	
41	N-(hidroximetil)-N-(dihidroximetil-1,3-dioxo-2,5-imidazolidinil-4)-N'(hidroximetil) urea (DIAZOLIDINYL UREA)	0,5%		
42	Glutaraldeído (GLUTARAL)	0,1%	Proibido em sistemas pulverizáveis (como aerossóis e sprays).	Contém glutaraldeído (somente para concentrações superiores a 0,05% no produto acabado).
43	5-Etil-3,7-dioxo-1-azobicyclo(3.3.0)octano (7-ETHYLBICYCLO OXAZOLIDINE)	0,3%	Proibido em produtos para higiene bucal e que entram em contato com mucosa.	
44	6,6-dibromo-4,4-dicloro-2,2-metilenodifenol (BROMOCHLOROPHENE)	0,1%		
45	Álcool 2,4-Diclorobenzílico (DICHLOROBENZYL ALCOHOL)	0,15%		
46	Tricloro-2,4,4'hidróxi-2'difenileter (*) (TRICLOSAN)	0,3%		
47	Hexametilenotetramina (METHENAMINE)	0,15%		
48	Brometo e Cloreto de Alquil (C12-C22) Trimetilamônio (*)	0,1%		
49	1,6-Di-(4-amidinofenoxi)-n-hexano e seus sais (incluindo isotionato e p-hidroxibenzoato) (HEXAMIDINE & salts)	0,1%		
50	3-(p-clorofenoxi)-propano-1,2-diol (CHLORPHENESIN)	0,3%		

Nº ORD	Substância	Máxima Concentração Autorizada	Limitações	Condições de Uso e Advertências
51	Hidroximetil amino- acetato de sódio (SODIUM HYDROXYMETHYL GLYCINATE)	0,5%		
52	Cloreto de prata depositado em dióxido de titânio (SILVER CHLORIDE)	0,004% (calculado como cloreto de prata)	20% AgCl (p/p) em TiO ₂ . Proibido em produtos para crianças com menos de 3 anos de idade, em produtos para higiene bucal e em produtos para a área dos olhos e lábios.	
53	Cloreto, Brometo e Sacarinato de Aquil (C8-C18) dimetilbenzilamônio (*) (BENZALKONIUM BROMIDE, CHLORIDE, SACCHARINATE)	0,1% (calculado como cloreto de benzalcônio)		Evitar contato com os olhos.
54	Benzilhemiformal (BENZYLHEMIFORMAL)	0,15%	Somente para produtos que se enxáguem.	
55	3-Iodo-2- propinilbutilcarbamato (número CAS 55406-53-6) (IODOPROPINYL BUTYCARBAMATE)	a) 0,02% Produtos que se enxáguem b) 0,01% Produtos que não se enxáguem, exceto em desodorantes/ antitranspirantes c) 0,0075% desodorantes/ antitranspirantes	Não utilizar em produtos de higiene bucal e nos produtos para os lábios. a) Não utilizar em produtos destinados a crianças com idade inferior a 3 anos, com exceção dos produtos de banho/shower géis e shampoos. b) Não utilizar em loções e cremes corporais que se apliquem em grandes extensões corporais; - Não utilizar em produtos para crianças com idade inferior a 3 anos. c) Não utilizar em loções e cremes corporais que se apliquem em grandes extensões corporais; - Não usar em produtos para crianças.	a) Para produtos de uso adulto: "Não usar em crianças". Para produtos destinados ao público infantil: "Não usar em crianças menores de 3 anos de idade". (essa advertência não se aplica aos produtos de banho/shower géis e shampoos) b) Para produtos de uso adulto: "Não usar em crianças". Para produtos destinados ao público infantil: "Não usar em crianças menores de 3 anos de idade". c) Não usar em crianças.
56	Cloreto de Diisobutil Fenoxietoxietil-dimetil- benzilamônio (BENZETHONIUM CHLORIDE)	0,1%	Proibido em produtos sem enxágue para higiene bucal.	

Nº ORD	Substância	Máxima Concentração Autorizada	Limitações	Condições de Uso e Advertências
57	2-metil-4-isotiazolina-3-ona (METHYLISOTHIAZOLINONE)	0,01%		

Nota: Os conservantes com símbolo (*) também podem ser usados para outros fins específicos devendo ser respeitadas as condições e os limites de concentrações estabelecidos em outras listas quando houver.

Tabela 05: Espectro de ação dos conservantes

Agente conservante	Bactéria Gram positiva	Bactéria Gram negativa	Leveduras	Bolores
Ácido benzoico e sais	+++	++	+	+
Ácido sórbico	++	++	+++	++
Álcool benzílico	+++	+	+	+
Bronopol	++	+++	+	+
Cetrimida	+++	++*	++	+
Cresol	++	+	+	+
Cloreto benzalcônio	+++	++*	++	+
Clorexidina	+++	+++*	++	+
Clorobutanol	+++	+++	++	+
Clorocresol	+++	++	+	+
Etanol	+++	+++	++	++
Fenol	++	+	+	+
Fenoxietanol	++	+++	+	+
Parabenos	++	+*	++	++

Legenda: +++ ativo; ++ moderadamente ativo; + fracamente ativo * pouco ativo contra *Pseudomonas* sp

Fonte: Guide to microbiological in pharmaceuticals.

Tabela 06: Matérias-primas: classificação de risco e frequência de análise (ORTH)

Classificação ---- Grau Relativo de Risco	Características / Exemplos	Frequência de amostragem e análise
0 ----- Sem Risco	<p>0 UFC/ g</p> <p>Não permitem crescimento. pHs extremos, apresentam atividade microbicida.</p> <p>Ex.: ácidos, álcoois, álcalis</p>	Sem necessidade de teste
1 ---- Risco Mínimo ou Leve	<p>Nível baixo de contagem, mas não permitem o crescimento. Geralmente < 100 UFC/g. Fonte pobre de nutrientes, atividade hídrica reduzida, atividade antimicrobiana.</p> <p>Ex.: lipídeos anidros, óleos minerais, petrolatum, ésteres e ácido esteárico, essências e preservativos</p>	Testar uma vez para os registros
2 ----- Baixo Risco < 1.000 UFC/g	<p>Risco baixo de contaminação, geralmente < 1000 UFC/g. Em presença de água podem apresentar crescimento microbiano.</p> <p>Ex.: glicerina, propilenoglicol e sorbitol à 83%</p> <p>Podem conter baixo nível de microrganismos e podem permitir o crescimento se diluídos em água.</p>	Uma vez ao ano
3 ---- Risco Moderado < 10.000 UFC/g e ausência de patógenos	<p>Risco moderado de contaminação. Podem permitir o crescimento microbiano se for usado um sistema preservante adequado.</p> <p>Representa a maioria das matérias-primas: estabilizantes de espuma, proteínas, géis, espessantes, colágeno em pó, goma xantana, amido, extratos de plantas em pó, lauril sulfato de amônio a 28%, concentrado de aloe, DEA, géis, aminoácidos, gomas.</p>	A cada lote
4 ----- Risco Alto	<p>Tem a potencialidade de permitir o crescimento.</p> <p>Ex.: água desmineralizada.</p>	A cada dia de uso

Tabela 07: Matérias-primas: classificação de risco (CTFA)

Classificação ---- Grau Relativo de Risco	Características / Exemplos
A ----- Hostis	Não permitem o crescimento microbiano e podem inibi-lo.
B ----- Inertes	Podem atuar como portador mas não permitem a proliferação.
C ----- De Suporte	Servem como substrato nutricional e permitem o crescimento.
D ----- Preservados	Foram adicionadas substâncias microbianas para inibir o crescimento.

Tabela 08: Matérias-primas: classificação de risco (BASTARDO)

Classificação ---- Grau Relativo de Risco	Características / Exemplos
3 ----- Hostis	Não permitem o crescimento. Ex: álcoois, glicerina, propilenoglicol e ceras.
2 ----- Susceptíveis	Susceptíveis, mas os microrganismos não podem se multiplicar. Origem mineral: talco, caolin e dióxido de titânio.
1 ----- 1000 UFC/g	Materiais naturais e de origem sintética.

3.5 EMBALAGEM

O processo de fabricação das embalagens trabalha com altas temperaturas, principalmente os plásticos, com os sistemas de sopro e injeção.

A preocupação, no entanto, vem na sequência da fabricação, isto é, no processo de gravação, decoração, pintura, montagem, acondicionamento - principalmente nas embalagens que o produto a ser acondicionado for rico em nutrientes.

Diferente dos produtos acabados, nos quais existem normas e parâmetros definidos pela ANVISA para microbiologia, as embalagens ainda não os têm. Porém, o fato de não ter não significa que as indústrias de produtos de HPPC não devam fazer análises microbiológicas nas embalagens.

4 GESTÃO DA QUALIDADE

O Laboratório de Microbiologia terceirista deve possuir habilitação em vigilância local de acordo com a RDC N° 11 de 16 de Fevereiro de 2012- Dispõe sobre o funcionamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos à Vigilância Sanitária e dá outras providências.

O Laboratório de Microbiologia pode possuir Acreditação pelo INMETRO de acordo com ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005- Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração e Habilitação REBLAS. A Habilitação é estabelecida pela RDC n° 12, de 16 de fevereiro de 2012- Dispõe sobre a Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS).

Para um sistema de gestão da qualidade em laboratório de microbiologia, deve-se incluir além de uma lista de itens específicos o bom julgamento e uma constante atenção aos detalhes.

Para o controle de qualidade deve-se estabelecer o padrão mínimo e delinear as diversas etapas que devem ser seguidas para o controle diário e vigilância de todas as etapas do sistema.

As diretrizes para o sistema de gestão da qualidade devem constar em um manual, no qual estejam detalhadas práticas tais como procedimentos para monitorar o funcionamento dos equipamentos, o controle da reatividade dos meios e reagentes, os prazos de validade, os resultados de todos os testes, etc.

Devem ser elaborados formulários adequados para coletar dados, de modo que qualquer anormalidade possa ser facilmente detectada. O encarregado também deve revisar todos os registros de controle e verificar que sejam anotadas todas as incidências fora do controle e as respectivas ações corretivas tomadas.

Os laboratórios devem também dispor de uma lista de inspeção para realizar avaliações pontuais dos controles de qualidade – um requerimento para credenciamento de laboratórios e/ou auditoria e fiscalização sanitária.

Para melhoria na qualidade dentro do laboratório recomenda-se a elaboração de POP's, ou seja, procedimentos que descrevem detalhadamente cada atividade realizada no laboratório, desde a coleta até a emissão do resultado final, incluindo utilização de equipamentos, procedimentos técnicos e inclusive cuidados de biossegurança e condutas a serem adotadas em acidentes.

Os POP's têm como objetivo padronizar todas as ações para que diferentes técnicos possam compreender e executar, da mesma maneira, uma determinada tarefa, garantindo assim qualidade.

Esses POP's devem estar escritos de forma clara e completa possibilitando a compreensão e adesão de todos. Os POP's devem estar disponíveis em local de acesso e conhecido de todos os profissionais que atuam no ambiente laboratorial, revisados e atualizados periodicamente e devem ser assinados pelo responsável do laboratório.

A política da qualidade deve estar definida no manual da qualidade e ser assinada pelo executivo-chefe, onde são tomadas as decisões sobre as políticas e os recursos do laboratório.

A política da qualidade deve incluir:

- a) O comprometimento do laboratório com as boas práticas profissionais e com a qualidade dos seus ensaios no atendimento aos seus clientes;
- b) A declaração do laboratório com respeito ao nível de serviço fornecido;
- c) Os objetivos a serem alcançados com a implementação do sistema da qualidade;
- d) Uma declaração de que todo o pessoal envolvido com as atividades de ensaio está familiarizado com a documentação da qualidade e que implementa permanentemente suas políticas e procedimentos;
- e) O comprometimento do laboratório com atendimento aos requisitos dos regulamentos da habilitação na vigilância sanitária local- RDC N° 11 de 2012 e NBR ISO/IEC 17025.

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE DOS EQUIPAMENTOS

Em todos os laboratórios de microbiologia deve ser estabelecido um programa de manutenção preventiva e calibração para assegurar o funcionamento apropriado de todos os equipamentos elétricos ou mecânicos. Os equipamentos devem ser controlados em intervalos de tempo pré-estabelecidos.

Os colaboradores do laboratório devem realizar todos os controles e registrar conforme instruídos em impressos ou manual de manutenção; isto permite a detecção imediata de desvios e portanto a adoção de medidas corretivas apropriadas antes que comprometam os resultados.

As temperaturas dos equipamentos devem ser medidas diariamente com termômetros calibrados. Qualquer leitura que resulte em valores fora dos limites de tolerância definidos pelos controles de qualidade, deve-se determinar a causa e corrigir o problema.

4.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEIO DE CULTURA, REAGENTES E KITS COMERCIAIS

Embora é aceito por auditores, inspetores de laboratório os registros de qualidade documentados pelos fabricantes de meios de cultura, recomenda-se um controle de qualidade periódico desses produtos pelo laboratório.

Os microrganismos empregados para o controle de qualidade devem ser mantidos no laboratório por meio de subcultivos de isolados recuperados como parte do trabalho de rotina ou microrganismo de referência como os da ATCC.

Cada lote de meios deve ser controlada com os quesitos mais exigentes para o crescimento ou para a produção de atividade bioquímica. A disponibilidade de cepas do laboratório pode ser necessária para suplementar aquelas comercialmente disponíveis.

Cada tubo de cultura, placa de meio e reagente deve ter uma etiqueta que identifique claramente o conteúdo e as datas de preparo e vencimento. Cada lote de tubos e placas deve ser também controlada quanto à esterilidade, principalmente aqueles nos quais são adicionados suplementos após a esterilização.

As provas de esterilidade devem ser feitas visualmente e por meio de subcultivos. Determinados meios seletivos, por exemplo, podem suprimir o crescimento visível de bactérias, mas as células viáveis podem aparecer nos subcultivos. Os meios preparados devem ser visualmente avaliados para sinais de deterioração como descoloração, turvação, mudança de cor e desidratação.

Os kits comerciais devem ser examinados a cada entrega e a cada lote, conforme as recomendações do fabricante. Os componentes de um kit não devem ser utilizados com um kit de lote diferente, a não ser quando especificado pelo fabricante.

A frequência das provas de controle de qualidade dos produtos comerciais utilizados no laboratório deve ser determinada pelo responsável imediato do laboratório, conforme as instruções dos respectivos fabricantes ou referências em literatura.

4.3 CONTROLE DE QUALIDADE DE COLABORADORES

O controle de qualidade dos colaboradores requer um programa de educação permanente efetivo. O treinamento deve ser prático e ser uma atividade regular. Os colaboradores envolvidos com as atividades do laboratório devem ser estimulados a participar com frequência em cursos, seminários e similares, tanto localmente quanto ao nível nacional.

Os resultados dos procedimentos devem ser conferidos pelo responsável designado quanto à exatidão, reprodutibilidade e concordância com os padrões de controle de qualidade.

Todos os colaboradores envolvidos com atividades rotineiras do laboratório de microbiologia, devem ter acesso ao programa de ensaios de proficiência.

Reuniões regulares para informar os colaboradores do laboratório quanto às mudanças e sugestões de melhorias nos procedimentos laboratoriais são recomendáveis.

4.4 GARANTIA DA QUALIDADE

O laboratório de microbiologia deve assegurar a confiabilidade dos serviços laboratoriais prestados, por meio de, no mínimo:

- a) controle interno da qualidade;
- b) controle externo da qualidade (ensaios de proficiência).

4.4.1 Ensaio de Proficiência

O desempenho dos exames de laboratório de microbiologia é realizado através de ensaios de proficiência. Este programa consiste na avaliação de amostras por evento. Há um número estabelecido de eventos anuais de testes em cada área de atividade. As amostras de proficiência devem ser analisadas pelos colaboradores que habitualmente realizam as análises em questão, de acordo com os procedimentos de rotina. O laboratório que não atender os requisitos dos ensaios de proficiência deve documentar a fonte do problema, revisar o programa em vigor e tomar medidas corretivas.

4.4.2 Conceitos Qualificação e Validação

A Qualificação é conjunto de ações realizadas para atestar e documentar que quaisquer instalações, sistemas e equipamentos estão propriamente instalados e/ou funcionam corretamente e levam aos resultados esperados. A qualificação é frequentemente uma parte da validação, mas as etapas individuais de qualificação não constituem, sozinhas, uma validação de processo.

A validação constitui evidência documentada que provê com alto grau de segurança, que um produto ou processo específico produzirá consistentemente, atendendo suas especificações pré-estabelecidas e atributos de qualidade.

O laboratório deve validar os métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidas, ampliações e modificações de métodos normalizados, com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido.

O laboratório deve registrar os resultados obtidos e o procedimento utilizado para a validação.

A técnica usada para a determinação do desempenho de um método deve incluir:

- a) Calibração com o uso de padrões e / ou materiais de referência;
- b) Comparações com resultados obtidos por outros métodos;

- c) Comparações interlaboratoriais
- d) Avaliação sistemática dos fatores que influenciam o resultado;
- e) Avaliação da incerteza dos resultados com base no conhecimento científico dos princípios teóricos do método e na experiência prática.

A faixa e a exatidão dos valores que podem ser obtidos por meio de métodos validados devem ser pertinentes às necessidades dos clientes, como:

- a) Incerteza dos resultados;
- b) Limites de detecção;
- c) Seletividade do método;
- d) Linearidade;
- e) Limite de repetitividade e/ ou reprodutibilidade;
- f) Robustez contra influências externas e/ ou sensibilidade cruzada contra interferência da matriz da amostra/ objeto de ensaio, conforme avaliadas para o uso pretendido.

4.4.3 Incerteza de Medição

Um laboratório de ensaio deve ter procedimento para estimar a incerteza de medição de todas as calibrações e tipos de calibrações quando realizar suas próprias calibrações.

Os laboratórios de ensaio devem ter procedimentos para cálculo das incertezas de medição para os métodos de ensaio. Em casos que o método de ensaio impeça o cálculo rigoroso metrologicamente e estatisticamente válido da incerteza de medição, o laboratório deve identificar os componentes de incerteza e estimar sua contribuição.

4.4.4 Auditorias Internas

O laboratório deve realizar auditorias internas de suas atividades de acordo com um cronograma e procedimento previamente estabelecidos para verificar se seus processos continuam a atender os requisitos do sistema da qualidade, da Norma ISO/ IEC 17025 e dos requisitos de habilitação da REBLAS.

O gerente da qualidade é responsável pelo planejamento e organização das auditorias. Estas devem ser realizadas por pessoal treinado e qualificado e, se possível, independente das atividades a serem auditadas.

As auditorias internas devem ser programadas de tal forma que cada aspecto do sistema da qualidade seja examinado, pelo menos, uma vez por ano.

Os programas de auditorias internas devem cobrir todas as atividades do laboratório, inclusive a realização de ensaios.

Quando a auditoria constatar dúvidas sobre a efetividade das operações ou à correção ou validade dos resultados de ensaios, o laboratório deve tomar ações corretivas em tempo hábil e notificar, por escrito, ao cliente, se for demonstrado que os resultados foram afetados.

Devem ser registradas a área de atividade auditada, as constatações da auditoria e as ações corretivas dela decorrentes.

As atividades de acompanhamento da auditoria devem verificar e registrar a implementação e a eficácia das ações corretivas tomadas.

4.4.5 Controle de Registros

O laboratório deve estabelecer e manter procedimentos para identificar, coletar, indexar, acessar, arquivar, armazenar, manter e dispor os registros técnicos e da qualidade de forma segura e com confidencialidade.

Os registros devem ser legíveis, armazenados e preservados, facilmente recuperáveis, em instalações adequadas para prevenir dano, deterioração ou perda.

O laboratório deve definir o tempo de retenção dos registros.

O sistema de registro deve ser referenciado de forma coordenada, de maneira que permita uma correlação apropriada entre os diferentes elementos de um registro.

O laboratório deve manter as observações originais, cálculos e dados derivados, registros de manutenção, verificação e calibração de instrumentos/ equipamentos, registros do pessoal técnico e gerencial, cópia dos relatórios de ensaios e qualquer outro registro de relevância para o laboratório.

Os registros devem incluir a identificação dos responsáveis pela amostragem, pela realização de cada ensaio e pela verificação dos resultados.

Quando ocorrem erros nos registros, cada erro deve ser riscado, não devendo ser apagado, nem tornado ilegível, nem eliminado. O valor correto deve ser escrito ao lado. Todas as alterações devem ser assinadas ou rubricadas pela pessoa que fizer a correção.

A conversão dos resultados das medições para o Sistema Internacional de Unidades (SI) deve ser realizada somente após a anotação ter sido feita na unidade na qual o instrumento foi calibrado.

Todos os registros impressos por computador ou calculadoras, inclusive os gráficos, devem ser datados, rubricados e anexados aos registros das medições.

4.4.6 Relatório de Ensaio

O relatório deve ser legível, sem rasuras, escrito em língua portuguesa, datado e assinado por profissional de nível superior legalmente habilitado.

O relatório deve conter no mínimo os seguintes itens:

- a) identificação do laboratório;
- b) endereço do laboratório;
- c) identificação do Responsável Técnico (RT);
- d) n° de registro do RT no respectivo conselho de classe profissional;
- e) nome, endereço e registro de identificação do cliente no laboratório;
- f) data da coleta da amostra;
- g) data de emissão do relatório;
- h) nome do produto e método analítico;
- i) resultado e unidade de medição;
- j) valores de referência, limitações técnicas da metodologia e dados para interpretação;
- k) observações pertinentes.

5 LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

5.1 BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

Os Princípios das Boas Práticas de Laboratório devem ser estabelecidos a fim de garantir a qualidade do serviço prestado pelo laboratório microbiológico.

5.1.1 Pessoal

Para execução das responsabilidades atribuídas ao laboratório analítico microbiológico, o pessoal deve ter treinamento básico em microbiologia e experiência pratica suficiente nas técnicas aplicadas e em relação aos microrganismos estudados.

O responsável pela emissão dos resultados e laudos analíticos deve possuir competência (habilitação) para interpretar com confiança os resultados obtidos.

5.1.2 Instalações Prediais

Instalações de ensaio englobam o espaço operacional do laboratório microbiológico. Deve possuir pelo menos: um espaço para recebimento e processamento de amostras; um espaço para preparo dos consumíveis (p.ex.: meios de cultura); um espaço para realização das análises; e um espaço para descontaminação de material e descarte de amostras. É recomendável que o layout do laboratório não permita o cruzamento das áreas a fim de evitar contaminação cruzada.

Imagem 01: Realização da Análise



Fonte: Avisa

Outras instalações auxiliares podem ou não estar incluídas no planejamento do laboratório ao redor das instalações de ensaio. Incluem: espaço de navegação (p.ex. corredores, entradas e saídas, escadas); área administrativa; vestuários; arquivos; entre outros.

Dependendo da natureza dos ensaios realizados pelo laboratório, será necessário estabelecer restrições de acesso às diferentes áreas do laboratório. Quando aplicável, informar todo o pessoal a respeito de tais restrições e colocar sinalização apropriada nas imediações.

5.1.2.1 Fluxo das atividades

Quando as amostras chegam ao laboratório, devem ser devidamente recebidas e verificadas quanto à procedência. Amostras com irregularidades devem ser avaliadas se podem ou não ser analisadas.

De qualquer forma, o estado da amostra deve ser registrado e as amostras recebidas devem ser identificadas corretamente, de acordo com procedimento do laboratório. Registrar, minimamente: data e hora do recebimento; estado da amostra; dados da coleta (p.ex. data, local, assepsia).

Qualquer amostra que não for analisada de prontidão deve ser armazenada em condições que desfavoreçam qualquer variação na população microbiana. Tais condições devem ser registradas e controladas.

Realizar a subamostragem de acordo com métodos acreditados e de forma que seja homogênea em sua distribuição, considerando a proliferação desigual de microrganismos.

Realizar as análises de acordo com os procedimentos operacionais padrões instituídos no laboratório.

Após a análise deve ser feita a retenção e descarte das amostras. As amostras devem ser retidas, no mínimo, até a obtenção dos resultados e se necessário reter a amostra durante o período estabelecido pelo laboratório.

5.1.2.2 Materiais e Tipos

Os materiais utilizados são reagentes com qualidade apropriada, microrganismos-controle positivos e negativos rastreáveis, meios de culturas nacionais ou internacionais reconhecidas, todos armazenados sob condições apropriadas e validades controladas. Pode-se citar como alguns dos materiais do Laboratório de Microbiologia:

- **Água deionizada:** água pura isenta de íons. Deve ser preparada para uso imediato apenas, diminuindo assim a possibilidade de contaminação.
- **Meio de cultura:** podem ser encontrados como sólidos liofilizados prontos para preparo ou como meios prontos para uso.
- **Cepas de referência:** são cepas de microrganismos utilizados como padrões de referência na validação de meios e kits comerciais.

Imagem 02: Preparo de Meios de Cultura



Fonte: Avisa

- Tubos e Frascos de Plásticos Estéreis
- Placas de Petri de vidro ou plástico descartável (mais comum entre 85 a 100 mm de diâmetro)
- Pipetas de vidro ou plástico descartável (1 mL, 2 mL ou 10 mL)

5.1.2.3 Armazenagem

Todas as matérias-primas, consumíveis, meios de cultura prontos para uso (conforme descrito pelo fabricante), materiais de referência e devem ser armazenados hermeticamente para garantir sua qualidade no momento do uso (p.ex. abrigo da luz, da umidade, da temperatura).

Amostras devem ser analisadas o mais rápido possível, após a coleta. Quando isso não é possível ou quando estão destinadas a ser analisadas posteriormente, devem ser transportadas e armazenadas em condições que garantam a integridade e exatidão do resultado analítico.

5.1.2.4 Higienização (limpeza) e Sanitização

O laboratório deve ter um procedimento de limpeza regular e documentado, onde deve estar descrito a frequência e o tipo de sanitizante utilizado. Um procedimento de verificação também deve ser utilizado para avaliar a eficácia da limpeza e sanitização realizadas no laboratório. Este sistema de limpeza engloba todas as instalações e equipamentos do laboratório. Atentar-se a detalhes como a possibilidade de contaminação cruzada durante a sanitização e procedimentos específicos para o caso de derramamentos. Todo o EPI e roupas especiais devem ser removidos antes da saída do laboratório.

Não é permitido fumar, beber ou comer na área de teste, assim como também não é permitido colocar alimentos para consumo pessoal nos refrigeradores do laboratório.

5.1.3 Equipamentos

Todos os equipamentos devem ser devidamente instalados, qualificados e conservados de acordo com as normas estabelecidas no laboratório. Deve-se documentar toda limpeza, calibração e manutenção dos equipamentos, bem como monitoramento do seu uso.

5.1.3.1. Tipos

Laboratórios microbiológicos devem estar equipados minimamente com:

- **Autoclave:** utilizado para esterilização de materiais e consumíveis por aquecimento via úmida. Deve ser mantido em boas condições de conservação e limpeza e, quando possível, autoclavar materiais de naturezas diferentes separadamente.
- **Balanças:** utilizar balanças analíticas e ou semi-analíticas (com verificação).

- **Banho-maria:** Aplicável para incubação de meios de cultura inoculados e testes temperatura-dependente, assim como para aquecer meios de cultura do tipo ágar à sua forma líquida.
- **Contador de colônias:** utilizado para contagem de colônias em placas de cultura.
- **Estufa de incubação:** utilizada com o propósito único de incubar os meios inoculados de forma controlada. Deve estar equipada minimamente de termostato, termômetro e *timer*, todos funcionais, devidamente calibrados e documentados com dados rastreáveis.
- **Estufa de secagem:** utilizado com o propósito de secagem de materiais. Deve estar equipada minimamente de termostato e termômetro, todos funcionais e devidamente calibrados.
- **Fluxo laminar:** cabines fechadas com passagem de corrente de ar nas entradas, bloqueando fisicamente a passagem de microrganismos. Utilizado com o propósito de proteger a amostra de contaminação externa e de proteger o analista do material contido dentro da cabine.
- **Freezer:** quando não especificado, deve manter a temperatura interna a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Geladeira:** quando não especificado, deve manter a temperatura interna a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **pHmetro:** potenciômetro utilizado para medir potencial hidrogeniônico (pH) de meios aquosos e sólidos. Deve ser capaz de medir valores com erro associado à primeira casa decimal ($\pm 0,1$) e detecção de variações mínimas no pH.
- **Destilador:** pode ser simples, de múltiplos efeitos e os de compressão de vapor.
- **Microscópio:** é um aparelho utilizado para visualizar estruturas com dimensões invisíveis a olho nu ($0,1\text{ mm}$).
- **Micropipeta:** várias capacidades de $0,1$ a 10 mL , utilizado para pipetagem de soluções líquidas.

5.1.3.2 Qualificação/Calibração/Aferição

A calibração e qualificação devem ser realizadas em todos os equipamentos que influenciam diretamente no resultado dos ensaios. A frequência das calibrações deve ser estipulada pelos responsáveis do laboratório, mas deve ser minimamente suficiente para garantir as condições adequadas do uso dos equipamentos. Podem ser utilizadas evidências no histórico do equipamento ou recomendações do fornecedor no momento de decidir a frequência e necessidade de calibração. Todas as calibrações devem ser devidamente registradas e documentadas.

5.1.3.3 Manutenção Preventiva e Corretiva

A manutenção de todos os equipamentos deve ser realizada periodicamente, de forma proporcional aos fatores de desgaste dos mesmos (p.ex. frequência de uso), que é denominado manutenção preventiva. Quando há falha no equipamento que impeça sua utilização no cotidiano do laboratório, deve ser realizada a manutenção corretiva. Todas as manutenções, independente da natureza, devem ser devidamente registradas/documentadas.

5.2 CEPAS

5.2.1 Identificação de Microrganismos

Desde a descoberta dos microrganismos há alguns séculos, vêm se buscando novas maneiras de identificar as bactérias. Neste item serão abordados alguns métodos que auxiliam na identificação de microrganismos.

5.2.1.1 Coloração de Gram

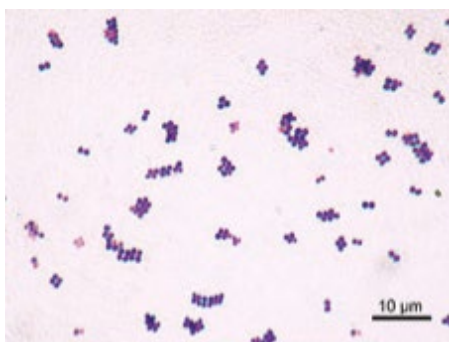
O método de coloração de Gram permite diferenciar bactérias com diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos.

O método consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com o Corante Primário (cristal violeta) seguido de tratamento com um fixador, o lugol. Tanto bactérias *Gram-positivas* quanto *Gram-negativas* absorvem de maneira idêntica o corante primário e o fixador, adquirindo uma coloração violeta devido à formação de um complexo cristal violeta-iodo, insolúvel, em seus citoplasmas.

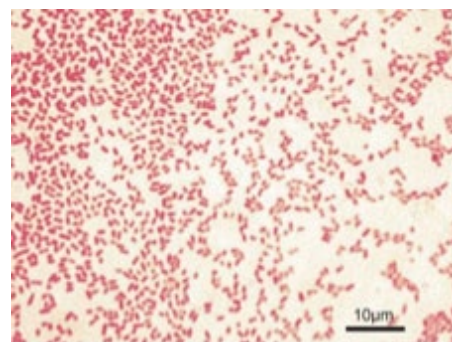
Segue-se o tratamento com um solvente orgânico, o etanol-acetona (1:1 v:v). O solvente dissolve a porção lipídica das membranas externas das bactérias *Gram-negativas* e o complexo cristal violeta-iodo é removido, descolorando as células. Por outro lado, o solvente desidrata as espessas paredes celulares das bactérias *Gram-positivas* e provoca a contração dos poros do peptidoglicano, tornando-as impermeáveis ao complexo; o corante primário é retido e as células permanecem coradas. Em seguida, a amostra é tratada com um corante secundário, a fucsina básica.

Quando se observa no microscópio as bactérias que adquirem a coloração azul violeta são chamadas de *Gram-positivas* e aquelas que adquirem a coloração vermelho são chamadas de *Gram-negativas*.

Imagem 03: Microscopia óptica de bactérias *Gram-positivas* e *Gram-negativas*



Bactérias *Gram-positivas*



Bactérias *Gram-negativas*

Fonte: Avisa

5.2.1.2 Coloração de Wirtz-conklin

A parede dos esporos constitui uma barreira eficaz contra a entrada e saída de materiais do esporo, mas por sua impermeabilidade, geralmente é refringente e de difícil coloração. A exposição prolongada ao corante verde malaquita, associado ao aquecimento, permite a penetração do corante e a coloração do esporo por um verde intenso. Como contraste (contracorante), utiliza-se a safranina, que cora outras estruturas em vermelho, facilitando a diferenciação dos esporos.

5.2.1.3 Kits de Identificação

Estes kits consistem na realização de provas bioquímicas que auxiliam a identificação de bactérias.

5.2.2 Manutenção de cepas

Neste item serão abordados métodos aplicados à manutenção das cepas utilizadas em testes microbiológicos e como assegurar sua qualidade desde o recebimento, armazenamento, reconstituição, crescimento, estocagem e controle de pureza para serem utilizadas nos métodos microbiológicos.

Culturas de referência

As culturas de referência consistem em microrganismos classificados por gênero e espécie, catalogados e descritos de acordo com suas características e origem (ISO 11133-1:2000).

Devem ser adquiridos de Centro de Referência como: ATCC (*American Type Culture Collection*), NCTC (*National Collection of Type Cultures*), INCQS (*Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde*), NBRC (*NITE Biological Resource Center*), NCIMB (*National Collection of Industrial Bacteria*), NCPF (*National Collection of Pathogenic Fungi*), IMI (*International Mycological Institute*), UKNCC (*United Kingdom National Culture Collection*), CIP (*Collection de l'Institut Pasteur*) e NCYC (*National Collection of Yeast Cultures*).

Para a reconstituição das culturas de referência é recomendado seguir as instruções do fornecedor, que determina meios de cultura e tempos de incubação ideais.

Preparo do microrganismo a partir do liofilizado (cultura de referência):

Em fluxo laminar ou diante de bico de *Bunsen*, pipetar solução salina estéril para reidratar o liofilizado. Em seguida, transferir o conteúdo para um tubo de ensaio contendo meio de cultura recomendado pelo fornecedor. Esta primeira passagem (repique) refere-se a 1ª Geração. É definida como uma geração, cada vez que o microrganismo é transferido para um novo meio de cultura.

Do remanescente do frasco reconstituído (aproximadamente 10 µl), transferir com auxílio de um loop descartável ou alça de platina uma alíquota para meio ágar e/ou líquido indicado. Incubar em estufa por tempo e temperatura determinados pelo fornecedor. Após período de incubação realizar coloração de Gram e testes confirmatórios (exemplo: coagulase, oxidase, catalase, kits comerciais, etc) a fim de assegurar a pureza da cultura obtida.

Após período de incubação da 1ª Geração e seu crescimento satisfatório, repique novamente em agar inclinado ou placa para obter a 2ª Geração.

O microrganismo preparado pode ser utilizado nos testes microbiológicos a partir da 3ª, 4ª e 5ª gerações. Com exceção de fungos filamentosos como, por exemplo, *Aspergillus brasiliensis*, que podem ser utilizados a partir da 1ª Geração para a preparação de suspensão de esporos.

Após a 5ª Geração o microrganismo não poderá mais ser utilizado devendo ser descartado conforme procedimento de descarte de resíduos com risco microbiológico.

Culturas estoque

As culturas estoque são consideradas as preparadas conforme indicação do fornecedor a partir de uma cultura referência (ISO 11133-1:2000).

O repique deve ser realizado em meio de cultura adequado e mantido sob-refrigeração (2 a 8° C), devidamente identificada com nome do microrganismo, número de identificação (exemplo:ATCC 6538), geração a que se refere (2ª G) , lote, data de preparação e validade

Exemplo:

Staphylococcus aureus

ATCC 6538 2ª G

Lote 12345678-9

Data 01/01/ 2013

Validade 1 mês

Mensalmente, a cultura estoque mantida em tubo ou placa deve ser renovada, por repique em meio de cultura adequado. Realizar controle das culturas repicadas mensalmente, conduzindo testes confirmatórios de acordo com a característica de cada microrganismo (exemplo coloração de Gram, coagulase, oxidase, catalase, kits comerciais, etc). Todos os dados devem ser registrados, permitindo a sua rastreabilidade.

Cultura de trabalho

As culturas de trabalho são obtidas a partir de uma cultura estoque para serem utilizadas em testes microbiológicas quando aplicáveis (ISO 11133-1:2000).

O repique deve ser realizado em meio de cultura adequado e mantido em estufa incubadora por tempo e temperatura determinados pelo fornecedor conforme exemplo abaixo:

Tabela 09: Repique de cepas

Microorganismo	Temperatura de Incubação	Tempo de Incubação	Meio de Cultura
Bactérias	30 - 35°C	21 ± 3 horas	TSA *
Leveduras	20 - 25°C	48 ± 4 horas	SDA **
Fungos filamentosos	20 - 25°C	6 - 10 dias	SDA **

Legenda: TSA* = meio de cultura Trypticase Soya Agar; SDA ** = meio de cultura Saboraud Dextrose Agar

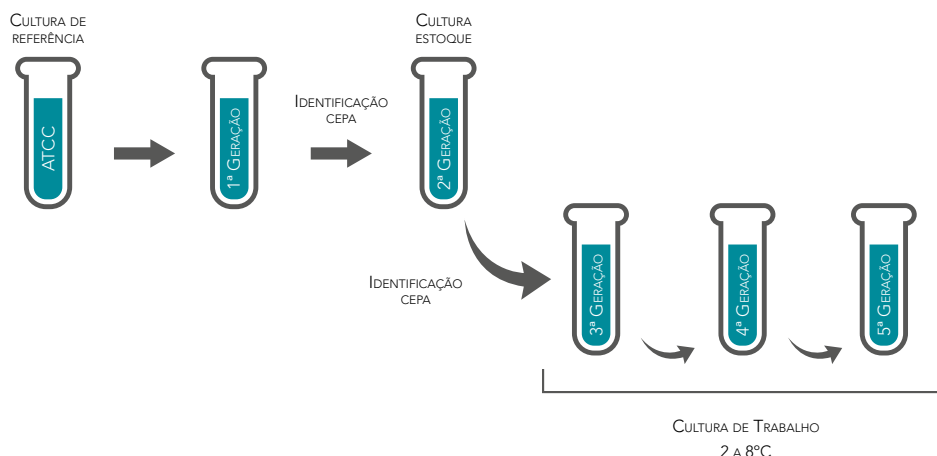
Após período de incubação as culturas podem ser utilizadas para condução de testes microbiológicos (teste desafio de conservante, teste de fertilidade, validação de método de testes microbiológico, etc.).

Em casos específicos ou quando definido pela empresa pode-se utilizar nos testes microbiológicos, além das culturas de trabalho, que partiram de uma cultura de referência, culturas de microrganismos isolados de produtos ou ambiente (Farmacopeia Brasileira 5ª edição – 2010).

É recomendado anotar cada repique em ficha ou caderno a fim de controlar as gerações obtidas e garantir a rastreabilidade do processo.

O descarte da cultura de trabalho é feita após o uso conforme procedimento de descarte de resíduos com risco microbiológico de cada laboratório não sendo necessário o registro na ficha ou caderno.

Figura 01: Repique de Cepas de Referência



Criogenização de cepas

De acordo com USP 37-NF 32 capítulo 1117 pode-se realizar a criogenização das culturas mantendo congelada a temperatura de até $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir desta técnica as células são mantidas em seu estado viável por um período de tempo indefinido. Estas culturas criogenizadas podem ser usadas como cultura de trabalho. É importante ressaltar que uma vez retirado do Ultrafreezer, o cryovial (tubo), não pode ser novamente congelado.

Preparação de Cryovials

Após crescimento da cultura de 1ª Geração, lavar os tubos ou placas com solução salina (bactérias e leveduras) ou solução salina acrescida de 0,05% de Tween 80 para fungos filamentosos, exemplo *Aspergillus brasiliensis*.

Para obter a 2ª Geração, repicar a suspensão acima com loop descartável em tubo inclinado, placas ou garrafa de Roux e incubar conforme tabela abaixo:

Tabela 10: Repique de Cepas

Microrganismo	Temperatura de Incubação	Tempo de Incubação	Meio de Cultura
Bactéria	30 - 35°C	21 ± 3 horas	TSA
Leveduras	20 - 25°C	48 ± 4 horas	SDA
<i>A. brasiliensis</i>	20 - 25°C	6 - 10 dias	SDA

Legenda: TSA* = meio de cultura Trypticase Soya Agar; SDA ** = meio de cultura Saboraud Dextrose Agar

Após período de incubação determinado, lavar os repiques com meio de cultura TSB acrescido de 15% glicerol (solução crioprotetora) que evitará o rompimento das células durante o processo de congelamento.

Transferir no mesmo dia da preparação, aproximadamente de 1 a 2 ml (não mais que 2/3 do volume do tubo) da suspensão para cryovials. Identificar cada cryovial com nome do microrganismo, número de ATCC, data da preparação e data de expiração.

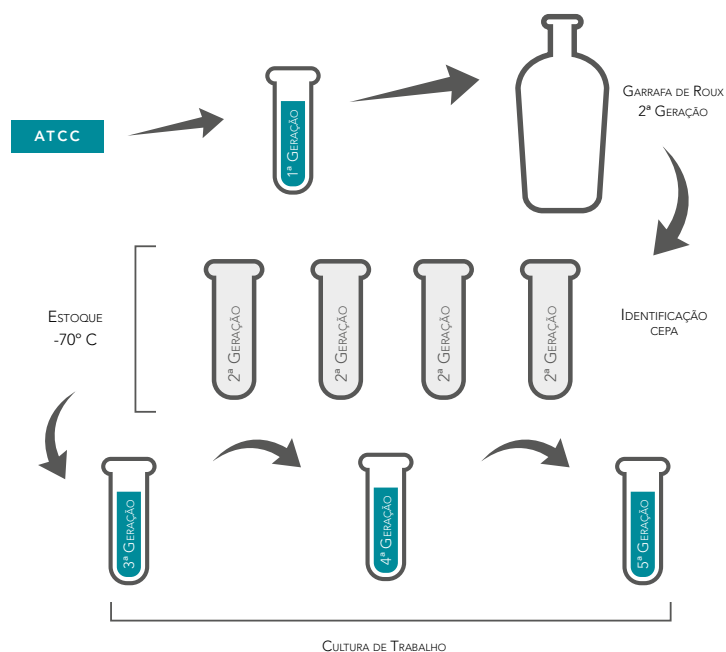
Realizar preparado em quarentena até que os testes estejam concluídos. Se a pureza controle de pureza e identificação da cultura de um dos cryovials preparados, e manter o restante da cultura for confirmada (>90%), estocar em Ultrafreezer a temperatura de -70°C. Caso a pureza da cultura não seja satisfatória (<90%), todos os cryovials devem ser descartados conforme procedimento de descarte de resíduos com risco microbiológico de cada laboratório.

Descongelamento do Cryovial

Retirar o Cryovial do Ultrafreezer e colocá-lo em incubadora a 30-35°C aproximadamente de 30 a 60 minutos ou até que descongele o conteúdo. Não é permitido congelar novamente uma vez descongelado o cryovial.

Para a obtenção das 3ª, 4ª gerações proceder da mesma maneira citada acima, com exceção da 5ª geração que só poderá ser usada nos testes microbiológicos e não poderá utilizada no preparo de uma nova geração sendo então descartada após seu uso conforme procedimento de descarte de resíduos com risco microbiológico de cada laboratório.

Figura 02: Descongelamento de Cryovial



Existem disponíveis no mercado formas alternativas de culturas prontas para uso.

No entanto, estas culturas são fornecidas geralmente a partir de 3ª geração. Deve-se manter o mesmo requisito quanto aos controles de pureza e geração assim como aplicado às cepas obtidas de centro de referência.

5.2.3 Controle de geração

Conforme descrito na USP 37-NF32 capítulo 1117, o número de repiques não deve ultrapassar a 5ª geração para evitar subcultura excessiva o que pode levar a uma alteração fenotípica ou mutação, podendo assim interferir diretamente nos resultados obtidos em testes microbiológicos.

Para melhor controle dos repiques, recomenda-se documentar a data de abertura da cultura de referência, lote, meio de cultura, geração, data de expiração e analista responsável.

Figura 03: Modelo de registro de repique de cepas de referência

MICROORGANISMO:		ATCC:				
LOTE:		VALIDADE:				
RECONSTITUIÇÃO		CRIOGENIZAÇÃO				
Data:		Data:			Validade:	
Meio de cultura/Lote:		Meio de cultura/Lote:				
Geração:		Quantidade:		Geração:		Quantidade:
Responsável:		Responsável:				

Data Repique	Meio/Lote	Tubos Repicados				Geração de Trabalho	Responsável
		1ªG	2ªG	3ªG	4ªG		

5.2.4. Validade

A data de validade de cada cepa liofilizada ou pronta para uso é determinada pelo fornecedor e deve-se seguir a recomendação contida em seu Certificado de Análise.

Para culturas estoque a data de validade é de um mês e para culturas de trabalho a data de validade consiste em uma semana. Ambas devem ser mantidas refrigeradas de 2 a 8° C.

Para culturas criogenizadas, a data de validade torna-se indeterminada.

Para cada uma dessas apresentações de cultura, observar suas características morfológicas, pureza e identificação através de testes confirmatórios adequados (coloração de Gram, coagulase, oxidase, catalase, kits comerciais, etc). Caso alguma contaminação seja observada, a cultura deve ser descartada conforme procedimento de descarte de resíduos com risco microbiológico de cada laboratório. Todos os dados devem ser registrados, permitindo a sua rastreabilidade.

6 CONTROLE E PREPARO DE MATERIAIS PARA ANÁLISE

6.1 PREPARO DE MATERIAIS E DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

6.1.1 Meios de cultura e soluções

Meios de cultura consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural. Tendo em vista a ampla diversidade metabólica dos microrganismos, existem vários tipos de meios de cultura para satisfazerem as variadas exigências nutricionais. Além dos nutrientes é preciso fornecer condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos, tais como pH, pressão osmótica, umidade, temperatura, atmosfera (aeróbia, microaeróbia ou anaeróbia), dentre outras.

Os meios de cultura podem ser classificados quanto a sua:

- A) Composição
- B) Consistência
- C) Intenção de uso
- D) Método de preparo

A) COMPOSIÇÃO

- a. Quimicamente definido – constituintes definidos quimicamente. Exemplo: grau de pureza.
- b. Quimicamente incompleto – composição química não completamente definida.

B) CONSISTÊNCIA

- a. Meio líquido – consiste em uma solução aquosa de um ou mais constituintes. São comumente conhecidos como “caldos”.
- b. Meio sólido ou semi-sólido – contém materiais solidificantes, como agar-agar ou gelatina, em diferentes concentrações.

C) INTENÇÃO DE USO

- a. Meio de transporte – preserva e mantém a viabilidade dos microrganismos no período entre a coleta da amostra e o processamento no laboratório. Exemplo: Meio Stuart.

- b. Meio de preservação – preserva e mantém a viabilidade dos microrganismos por um período de tempo prolongado e permite a recuperação após este período. Exemplo: Meio Cary Blair.
- c. Meio de recuperação – possibilita a recuperação dos microrganismos estressados ou danificados e recupera sua capacidade de crescimento sem, necessariamente, promover sua multiplicação. Exemplo: Água Peptonada Tamponada.
- d. Meio de enriquecimento – meio predominantemente líquido na qual, devido a sua composição, proporciona condições favoráveis à multiplicação dos microrganismos. Exemplo: Caldo Lactosado.
- e. Meio de enriquecimento seletivo – meio de enriquecimento na qual favorece a multiplicação de microrganismos específicos, ao mesmo tempo, que inibe parcialmente ou totalmente o crescimento de outros microrganismos. Exemplo: Caldo Tetrionato.
- f. Meio de enriquecimento não-seletivo – meio de enriquecimento na qual favorece o crescimento da maioria dos microrganismos. Exemplo: Caldo Infusão de Cérebro e Coração.
- g. Meio de isolamento – meio sólido ou semi-sólido na qual favorece o crescimento de microrganismos. Exemplo: Agar Caseína-Soja.
- h. Meio de isolamento seletivo – meio de isolamento na qual favorece o crescimento de microrganismos específicos, ao mesmo tempo, que inibe outros microrganismos. Exemplo: Agar Baird-Parker.
- i. Meio de isolamento não seletivo – meio de isolamento na qual não inibe os microrganismos seletivamente. Exemplo: Agar Nutriente.
- j. Meio diferencial – permite testar uma ou mais características fisiológicas/bioquímicas dos microrganismos para sua identificação. Exemplo: Agar Eosina Azul de Metileno.
- k. Meio de identificação – produz uma reação de identificação específica na qual não requer nenhum teste adicional de confirmação. Exemplo: Agar TSI.
- l. Meio de múltiplas finalidades – certos meios que podem atender diversas categorias. Exemplo: Agar Sangue.

Tabela 11: Finalidade dos Meios de Cultura

MEIOS DE CULTURA	
Tipo	Finalidade
Quimicamente Definido	Crescimento de quimiotróficos e autotróficos e análises microbiológicas.
Complexo	Crescimento da maioria dos orgânicos quimio-heterotróficos.
Redutor	Crescimento de anaeróbios obrigatórios.
Seletivo	Impedir o crescimento de microrganismos não desejados e favorecer o crescimento do organismo de interesse.
Diferencial	Diferenciar colônias do organismo de interesse dos outros organismos.
Enriquecimento	Semelhante ao seletivo, mas com a característica importante de aumentar o número de bactéria de interesse tornando-a detectável.

D) MÉTODO DE PREPARO

- a. Meio pronto para uso – é fornecido em recipientes no formato pronto para uso.
- b. Meio desidratado comercialmente disponível – meio no formato seco na qual não está pronto para uso imediato. Exemplo pó, grânulos. A re-hidratação formará um meio completo pronto para uso ou um meio incompleto que necessita de componentes adicionados na hora do uso.
- c. Meio formulado no laboratório.

6.1.1.1 Pesagem de meios de cultura

O preparo correto do meio de cultura é uma das etapas fundamentais no ensaio microbiológico. Respeite as Boas Práticas de Laboratório e as instruções do fabricante para manusear meios desidratados e outros componentes. Documente todos os dados relevantes, como peso, volume, pH, etc.

A água utilizada deve ser isenta de substâncias inibidoras ou que influenciem o crescimento dos microrganismos.

A esterilização dos meios de cultura e reagentes pode ser feita por calor úmido (autoclave) ou filtração. Certos meios não precisam de esterilização por autoclave, mas podem ser usados após fervura. O controle da eficácia da esterilização é essencial. Após esterilização, todos os meios devem ser monitorados, em particular com respeito ao pH, coloração, esterilidade e consistência.

6.1.1.2 pH

A maioria das bactérias cresce melhor dentro de variações pequenas de pH sempre perto da neutralidade, entre pH 6,5 e 7,5. Poucas bactérias são capazes de crescer em pH ácido como pH 4,0. No entanto, algumas bactérias denominadas acidófilas apresentam alto grau de tolerância à acidez.

Os fungos filamentosos e as leveduras podem crescer em variações de pH maiores que as bactérias, porém, os valores ótimos de pH para fungos são geralmente inferiores, entre 5 e 6.

As bactérias cultivadas em laboratório com frequência produzem ácidos que podem acabar interferindo no seu próprio crescimento. Para neutralizar esses ácidos e para a manutenção do pH normalmente são incluídos tampões químicos nos meios de cultura. Portanto, os pHs dos meios de cultura variam de acordo com o microrganismos a ser cultivado.

6.1.1.3 Tipos de esterilização

Como se trata de um trabalho de muita precisão, a esterilização de meios de cultura é fundamental dentro de todo o processo. O principal objetivo é remover totalmente a capacidade reprodutiva de todos microrganismos indesejáveis para uma determinada análise, deixando o meio de cultura propício somente para o objeto de estudo.

A esterilização de um meio de cultura pode ser realizada aplicando-se calor úmido ou calor seco, irradiação a partir de raios gama ou raios-X, ou utilizando-se de determinados compostos químicos em conjunto com soluções vaporizadas ou por filtração. No caso de esterilização por calor úmido, o processo envolve a desnaturação e coagulação de proteínas e enzimas, assim como a fusão lipídica da membrana celular. Por calor seco, a esterilização ocorre por oxidação quando o meio de cultura é exposto a altas temperaturas.

6.1.1.4 Validade

A validade dos meios de cultura variam de acordo com a composição e o fabricante, portanto é importante seguir a recomendação descrita no rótulo.

Para os meios de cultura estéreis, parcialmente completos, nas quais componentes finais são adicionados imediatamente antes do uso, devem ser mantidos sob refrigeração por até 3 meses ou a temperatura ambiente por até 1 mês, para prevenir que sua composição seja modificada. Contudo, recomenda-se que o meio que tenha suplementos seletivos sensíveis adicionados, seja usado no dia do preparo. Meios sólidos contendo substâncias quimicamente reativas e/ou sensíveis não devem ser armazenados em grandes quantidades para fusão.

Antes do uso ou do aquecimento adicional, recomenda-se que o meio de cultura atinja a temperatura ambiente.

6.1.1.5 Promoção de crescimento / esterilidade

O teste de promoção de crescimento tem o objetivo de verificar se o lote de meio de cultura está apto para utilização:

Esterilidade: verifica se o lote do meio de cultura está estéril,

Promoção de crescimento: verifica a capacidade que o meio de cultura tem em promover o crescimento microbiano.

Esterilidade – uma quantidade adequada de cada lote deve ser testada para contaminação microbiana, através da incubação sob condições apropriadas, antes do uso ou em paralelo com o meio inoculado. Meios seletivos podem apresentar alguns problemas, devido à inibição de vários microrganismos. A contaminação pode não estar evidente visualmente, em forma de turbidez ou formação de colônia. Este problema pode ser superado através da transferência de uma porção do meio seletivo líquido para um meio não seletivo ou fazendo um swab da superfície da placa e incubando o swab em um meio não seletivo. Limites para a porcentagem de placas ou tubos ou frascos com meio líquido contaminados, devem ser estabelecidos para cada meio, ou especificados pelo fabricante.

Organismos teste – Um conjunto de organismos teste deve conter microrganismos com características estáveis, representativas de sua espécie e que sejam confiáveis para demonstrar o desempenho de um meio preparado no laboratório. Os organismos teste devem compreender as cepas que estejam facilmente disponíveis nas coleções de cultura de referência, porém cepas bem caracterizadas, isoladas no laboratório também podem ser incluídas.

Os organismos teste para cada meio pode incluir:

- cepas positivas robustas com características típicas;
- cepas positivas que crescem fracamente (de uma natureza mais sensível);
- cepas não reativas bioquimicamente;
- cepas inibidas completamente.

Para os meios que não contêm indicadores ou agentes seletivos, o uso de uma cepa teste positiva simples, é adequado. Para os meios que contêm indicadores ou agentes seletivos, devem ser utilizadas cepas que demonstrem a função do indicador e seletividade. Para os meios complexos, como os adicionados de suplemento, cada lote deve ser verificado com as cepas que apresentem as características listadas acima.

Produtividade – meios de cultura líquidos, semi-sólidos e sólidos devem ser inoculados com inóculos apropriados da cultura de trabalho dos organismos teste, utilizando um dispositivo adequado. Para métodos quantitativos a produtividade é a relação entre a contagem total de colônias no meio de cultura teste e contagem total de colônias no meio de cultura de referência.

Seletividade – Para a avaliação da seletividade em métodos quantitativos, utilizando dispositivos adequados e organismos teste definidos, um meio de cultura seletivo e um meio de referência são inoculados com inóculos apropriados dos organismos teste. Seletividade é a diferença entre a maior diluição, apresentando crescimento acima de 10 colônias, no meio de referência e a maior diluição, apresentando crescimento comparável, no meio teste.

Cuidado especial deve ser dado à seleção das amostras e organismos a serem avaliados nestes testes. Se organismos teste são utilizados na avaliação de meios não seletivos, os organismos escolhidos devem ser tão fastidiosos quanto àqueles para a qual o meio será utilizado rotineiramente. Recomenda-se que mais de um organismo teste seja utilizado para avaliar um determinado meio.

Para a avaliação de meios seletivos/diferenciais, devem ser escolhidos organismos que testem as características seletivas/diferenciais e de produtividade do meio. Meios líquidos podem ser avaliados utilizando organismos que devem crescer no meio e àqueles que devem ser reprimidos. Seguindo com uma incubação adequada, as concentrações devem ser determinadas para cada organismo teste. Um meio aceitável deve apresentar altas concentrações do organismo esperado e baixas concentrações do organismo reprimido. O desempenho de um novo lote deve ser similar ao lote controle. A avaliação de um meio sólido é realizada de uma maneira parecida.

Microrganismos do grupo para qual o meio é designado devem ser recuperados, quantitativamente, quase comparado ao meio não seletivo. Organismos que devem ser reprimidos pelo meio, não podem se desenvolver ou devem ser fortemente reduzidos, ao se comparar com a enumeração do meio não seletivo.

6.1.1.6 Armazenagem

De forma geral, os meios pontos devem ser armazenados à temperatura entre 2 a 8°C (geladeira). O efeito nocivo comumente associado ao armazenamento é a desidratação. Esta não será problema em meios líquidos e sim nos meios em placas, principalmente em laboratórios pequenos onde certos meios são usados ocasionalmente. Estes meios em placas devem ser conservados em sacos plásticos, selados, para minimizar a perda de umidade, e estocados em posição invertida. Todos os meios devem ser levados à temperatura ambiente antes do seu uso. Meios como ágar padrão, batata e outros, podem ser guardados em volumes para serem adicionados em placa (15 ml). No momento da análise serão fundidos, resfriados e adicionados na placa contendo a amostra.

Os meios de cultura em pó devem ser armazenados de acordo com as recomendações do fabricante.

6.1.2 Amostras para análise microbiológica

O laboratório deve verificar as condições dos produtos no recebimento e verificar a quantidade e estado (vazamento e etc.).

Os produtos recebidos pelo laboratório devem ser registrados em documentos que permitam que o andamento da análise possa ser monitorado através de relatórios ou dados brutos.

As informações que devem ser registradas são:

- nome do produto,
- data de recebimento,
- dados da amostragem (lote, data de fabricação e validade),
- origem e pedido do solicitante,
- tipo de análise.

Estocar os produtos a serem analisados à temperatura ambiente. Não incubar ou refrigerar os produtos antes ou depois das análises.

6.1.2.1 Assepsia

Para evitar contaminação dos produtos, manusear de forma a evitar risco de contaminação. Para isto, devem-se seguir técnicas de assepsia, como por exemplo:

- Sanitizar embalagem e a tampa para ser aberta adequadamente,
- utilizar instrumento estéril para abrir a embalagem,
- utilizar instrumento estéril para retirar a amostra do produto.

6.1.2.2 Pesagem

A preparação inicial e de amostras diluídas, deve ser realizado em um intervalo entre o fim do preparo e o momento que o inóculo entra em contato com o meio de cultura não deve exceder 45 min.

Registrar o volume ou massa que foi pesado da amostra.

6.1.2.3 Definição número de amostras

Transferir a amostra do produto para um recipiente adequado e realizar a diluição de acordo com o procedimento estabelecido.

Registrar o fator de diluição.

6.2 INATIVAÇÃO DE SISTEMAS ANTIMICROBIANOS

Os procedimentos para inativação do sistema preservante devem ser validados, pois a amostra diluída não pode inibir a multiplicação dos microrganismos, eventualmente presentes.

A inativação do sistema preservante é realizada através da transferência da concentração aproximada de 10^2 de microrganismos viáveis por 0,5 mL de diluente neutralizante para a placa de petri contendo 1 mL da diluição 1:10 do produto (em duplicata). Adicionar 15 mL do meio de cultura adequado, esterilizado e resfriado até cerca de 46°C.

O crescimento parcial ou o não crescimento do microrganismo invalida o teste. Os microrganismos sugeridos para a realização do ensaio para comprovar a inativação do sistema preservante estão listados abaixo:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Candida albicans*
- *Aspergillus brasiliensis*

A concentração inibitória mínima é a concentração mínima de preservante capaz de inibir o crescimento de microrganismo.

Tabela 12: Principais Conservantes utilizados e seus inativantes.

Conservante	Inativante
Parabenos	3% p/v polissorbato 80
Formaldeído	0,1% p/v histidina
Isotiazolinonas	12% p/v sulfitos
Dibromoglutaronitrila	12% p/v sulfitos
Imidazolidinil uréia/Diazolidinil uréia/dm hidantoína	0,5% histidina
Piritionato de zinco	3% p/v polissorbato 80 0,5% p/v cistidina/histeina
Ipbc	3% p/v polissorbato 80 0,5% p/v cistidina/histeina
Fenoxietanol	2% p/v polissorbato 80 0,3% p/v lecitina de soja
Outros fenóis	3% p/v polissorbato 80
Sais quartenários de amônia e tensoativos anfóteros	0,3% p/v polissorbato 80 e 0,3 p/v lecitina de soja

Fonte: Associação Brasileira de Microbiologia, 2008

7 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Neste capítulo serão abordados métodos de análises microbiológicas em produtos acabados e matérias-primas utilizados em produtos de HPPC.

7.1 PLAQUEAMENTO

Existem 2 tipos de plaqueamento: plaqueamento em profundidade e plaqueamento por semeadura em superfície.

O plaqueamento por profundidade consiste em adicionar a amostra diluída, distribuir o meio de cultura fundido em placa de Petri esterilizada até que se obtenha uma camada de no mínimo 3 mm a 4 mm (por exemplo, para placa de 90 mm de diâmetro, 15 mL a 20 mL de ágar são normalmente requeridos) homogeneizar rapidamente fazendo círculos com a placa. Aguardar o resfriamento e solidificação do ágar, colocando as placas de Petri em uma superfície horizontal e temperatura ambiente.

O plaqueamento por semeadura em superfície consiste em distribuir o meio de cultura fundido em placa de Petri esterilizada até que se obtenha uma camada de no mínimo 3 mm a 4 mm (por exemplo, para placa de 90 mm de diâmetro, 15 mL a 20 mL de ágar são normalmente requeridos). Aguardar o resfriamento e solidificação do ágar, adicionar a amostra diluída e semeia-se com o auxílio de um "loop" ou alça de *Drigalsky* proporcionando completa absorção da amostra no Agar.

7.2 CONTAGEM DE MESÓFILOS AERÓBIOS TOTAIS

Método de plaqueamento em profundidade.

Para a contagem total de microrganismos, usualmente, a preparação inicial é a primeira diluição contada. Se necessário, diluições seriadas adicionais (por exemplo, diluição 1:10 podem ser aplicadas a partir da preparação inicial. Adicionar 1mL da preparação inicial e/ou diluição da amostra preparada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Verter 15 mL a 20 mL de Agar fundido (TSA - bactéria e SDA – fungos) mantido em banho-maria por não mais que 48°C. Misturar a preparação inicial e/ou diluição da amostra diluída com o meio homogeneizado cuidadosamente por meio de movimentos rotativos ou inclinação de forma suficiente para dispersão. Aguardar a solidificação do meio de cultura sobre superfície horizontal em temperatura ambiente.

Método plaqueamento por semeadura em superfície

Adicionar de 15 mL a 20 mL de Agar fundido mantido (TSA- bactéria e SDA – fungos) em banho-maria por

não mais que 48°C em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Resfriar e solidificar. Semear na superfície do meio de cultura um volume determinado, não menos que 0,1 mL da preparação inicial e/ou diluição da amostra preparada.

7.2.1 Tempo e Temperatura Ótimas de Incubação

A menos que haja outra indicação, inverter a placa inoculada e colocá-la em incubadora regulada a 32,5 °C ± 2,5°C por 72 h ± 6h.

7.2.2 Leituras / cálculos

Após a incubação, contar as colônias em placa de Petri contendo de 30 a 300 colônias. O resultado do número de colônias obtido (média aritmética das duplicatas das diluições analisadas) deve ser multiplicado pela diluição da respectiva placa, expressando os resultados em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro. Se não houver nenhum crescimento nas placas inoculadas, o resultado será expresso em menor que 10, multiplicado pela recíproca da menor diluição inoculada e validada.

7.3 PESQUISA DE PATÓGENOS E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Microrganismos patogênicos são aqueles capazes de causar doenças. A resolução 481/99 da ANVISA estabelece quais parâmetros microbiológicos devem ser controlados em produtos de higiene pessoal perfumaria e cosméticos. Para os microrganismos patogênicos recomenda-se a detecção de coliformes totais e fecais (*Escherichia coli*), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e Clostrídios Sulfito redutores (exclusivamente para talcos), sendo o critério de aceitação de ausência/g ou mL destes patógenos no produto.

7.3.1 Coliformes Totais e Fecais (*Escherichia coli*);

Para o preparo da amostra utilizar materiais esterilizados, equipamentos e técnicas assépticas. A preparação inicial deverá ser realizada com agente solubilizante adequado, o tempo transcorrido entre o momento da inoculação até que entre em contato com o caldo de enriquecimento e o fim do preparo não deve exceder 45 minutos. O enriquecimento é preparado a partir de uma amostra de no mínimo 1g ou 1 mL adequadamente homogeneizado do produto a ser analisado, dispersado em no mínimo 9 mL de caldo de enriquecimento.

Incubar a preparação inicial em caldo a 32,5 °C ± 2,5°C por no mínimo 20h (máximo 72h).

Estriar uma alíquota do caldo de enriquecimento incubado utilizando alça estéril sobre a superfície de meio Agar MacConkey, de modo a obter colônias isoladas.

Inverter as placas de Petri e incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 24h (máximo 48h).

Observar a presença de colônias vermelho-tijolo.

Imagem 04: *Escherichia coli* em Agar MacConkey



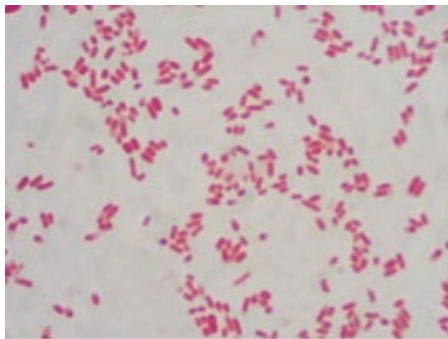
Dar sequência aos testes para colônias suspeitas isoladas no Agar MacConkey. A presença de *Escherichia coli* pode ser confirmada por outros testes adequados, cultura e testes bioquímicos.

Coloração de Gram

Observar presença de bastonetes Gram-negativos (bacilos)

Fonte: AVISA

Imagem 05: *Escherichia coli* – Coloração de Gram



Crescimento em meio Agar Levine eosina azul de metileno (Ágar EMB)

Inocular a superfície do Agar Levine eosina - azul de metileno com colônias suspeitas isoladas em Agar MacConkey, a fim de que as colônias se desenvolvam. Inverter as placas e incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 24h (máximo 48h).

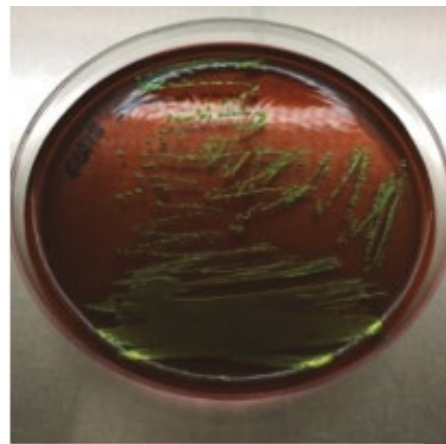
Observar a característica das colônias como brilho metálico sobre a luz refletida e aparência preto-azulado sobre a luz transmitida.

Fonte: AVISA

Imagem 06: *Escherichia coli* em Agar Levine

Se a identificação das colônias confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Presença de *Escherichia coli* na amostra".

Se não houver crescimento após o enriquecimento e/ou a identificação das colônias não confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Ausência de *Escherichia coli* na amostra".



Fonte: AVISA

7.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Para o preparo da amostra utilizar materiais esterilizados, equipamentos e técnicas assépticas. A preparação inicial deverá ser realizada com agente solubilizante adequado, o tempo transcorrido entre o momento da inoculação até que entre em contato com o caldo de enriquecimento e o fim do preparo não deve exceder 45 minutos. O enriquecimento é preparado a partir de uma amostra de no mínimo 1g ou 1 mL adequadamente homogeneizado do produto a ser analisado, dispersado em no mínimo 9 mL de caldo de enriquecimento.

Incubar a preparação inicial em caldo a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 20h (máximo 72h).

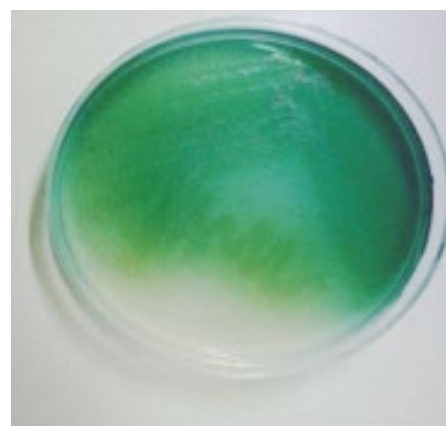
Estriar uma alíquota do caldo de enriquecimento incubado utilizando alça estéril sobre a superfície de meio Agar Cetrimide, de modo a obter colônias isoladas.

Inverter as placas de Petri e incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 24h (máximo 48h).

Observar a presença de colônias pigmento amarelo - verde (piocianina), com fluorescência sob luz UV.

Imagem 07: *Pseudomonas aeruginosa* em Agar Cetrimide

Dar sequência aos testes para colônias suspeitas isoladas no Agar Cetrimide. A presença de *Pseudomonas aeruginosa* pode ser confirmada por outros testes adequados, cultura e testes bioquímicos.



Fonte: AVISA

Coloração de Gram

Observar presença de bastonetes Gram-negativos.

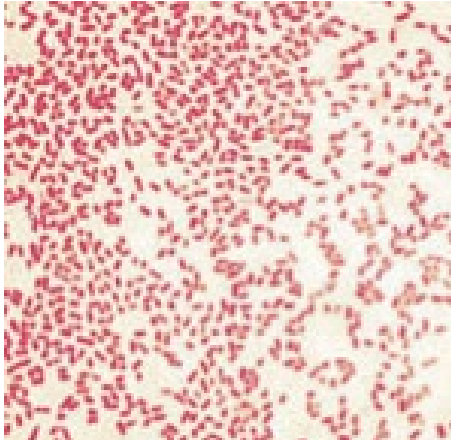


Imagem 08: *Pseudomonas aeruginosa* – Coloração de Gram

Teste de oxidase

Observar teste positivo para oxidase

Cultura no meio Agar *Pseudomonas* para detecção de piocianina

Inocular a superfície do meio Agar para detecção de piocianina com colônias suspeitas isoladas em *Agar Cetrimide*, a fim de que as colônias se desenvolvam. Inverter as placas e incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e observar o crescimento bacteriano após 24h, 48h e 72h. *Pseudomonas aeruginosa* formam colônias rodeadas por zona azul a verde devido à formação de piocianina ou uma zona vermelha a marrom escura devido à produção de piorrubina.

Fonte: AVISA

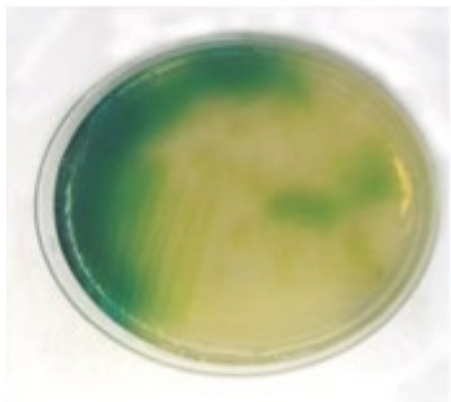


Imagem 09: *Pseudomonas aeruginosa* em *Pseudomonas Agar P*

Se a identificação das colônias confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Presença de *Pseudomonas aeruginosa* na amostra".

Se não houver crescimento após o enriquecimento e/ou a identificação das colônias não confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Ausência de *Pseudomonas aeruginosa* na amostra".

Fonte: AVISA

7.3.3 *Staphylococcus aureus*

Para o preparo da amostra utilizar materiais esterilizados, equipamentos e técnicas assépticas. A preparação inicial deverá ser realizada com agente solubilizante adequado, o tempo transcorrido entre o momento da inoculação até que entre em contato com o caldo de enriquecimento e o fim do preparo não deve exceder 45 minutos. O enriquecimento é preparado a partir de uma amostra de no mínimo 1g ou 1 mL adequadamente homogeneizado do produto a ser analisado, dispersado em no mínimo 9 mL de caldo de enriquecimento.

Incubar a preparação inicial em caldo a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 20h (máximo 72h).

Estriar uma alíquota do caldo de enriquecimento incubado utilizando alça estéril sobre a superfície de meio *Agar Baird Parker*, de modo a obter colônias isoladas.

Inverter as placas de Petri e incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 24h (máximo 48h).

Observar a presença de colônias pretas, brilhantes, circundadas por zonas claras.

Dar sequência aos testes para colônias suspeitas isoladas no *Agar Baird Parker*. A presença de *Staphylococcus aureus* pode ser confirmada por outros testes adequados e testes bioquímicos.

Coloração de Gram

Observar presença de cocos em cachos *Gram-positivos*.

Teste de Catalase

Observar teste positivo para catalase.

Teste de Coagulase

Observar resultado positivo para coagulase.

Se a identificação das colônias confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Presença de *Staphylococcus aureus* na amostra".

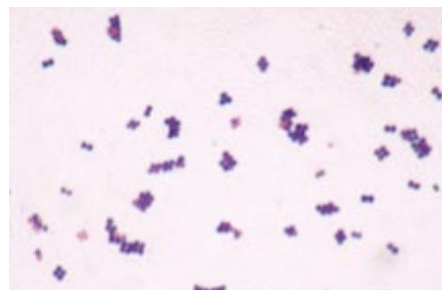
Se não houver crescimento após o enriquecimento e/ou a identificação das colônias não confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Ausência de *Staphylococcus aureus* na amostra".

7.3.4 Clostrídios sulfito redutores

Para o preparo da amostra utilizar materiais esterilizados, equipamentos e técnicas assépticas. A preparação inicial deverá ser realizada com agente solubilizante adequado, o tempo transcorrido entre o momento da inoculação até que entre em contato com o caldo de enriquecimento e o fim do preparo não deve exceder 45 minutos.

Separar duas parcelas de amostras iguais (10mL/ g) e aquecer apenas uma porção da amostra em banho-maria a 80°C durante 10 minutos resfriar rapidamente, para eliminação de organismos não esporulados e formas vegetativas.

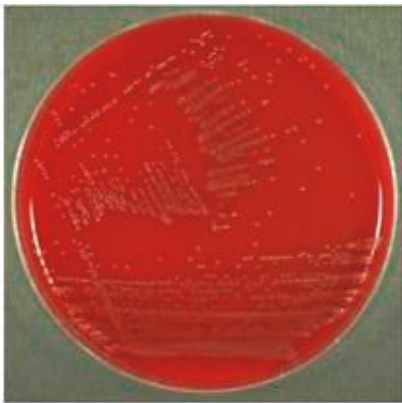
Imagem 10: *Staphylococcus aureus* - Coloração de Gram



Fonte: AVISA

Misturar cada parte das porções e transferir 10ml/g para um recipiente contendo 90 mL do meio *Reinforced Medium for Clostridia* para diluição. Incubar a amostra diluída em uma jarra de anaerobiose a 30-35 °C por 48 h. Após incubação utilizando uma alça estéril, estriar uma alíquota do meio *Reinforced Medium for Clostridia* de enriquecimento incubado sobre a superfície da placa de Petri já preparada com meio *Columbia Agar* de modo a obter colônias isoladas.

Imagem 11: *Clostridium* sp em Agar Columbia



Fonte: AVISA

Incubar as placas de Petri em posição invertida em jarra de anaerobiose a 30-35°C por 48 a 72 horas.

Se a identificação das colônias confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Presença de Clostrídios sulfito redutores na amostra".

Se não houver crescimento após o enriquecimento e/ou a identificação das colônias não confirmar a presença dessa espécie, expressar o resultado como: "Ausência de Clostrídios sulfito redutores na amostra".

7.4 TESTE DE DESAFIO DA EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE (CHALLENGE TEST)

O teste de eficácia do sistema conservante, também conhecido como Teste de Desafio Microbiológico, ou "*Challenge Test*", tem como objetivo final determinar a resistência de um produto ou material à contaminação microbiana, refletindo diretamente a eficácia do sistema conservante.

Através deste teste é possível verificar se a dosagem de conservante está adequada ao produto final, e se o produto está apto a resistir às intempéries na qual será submetida, durante o período de validade do produto.

Resumidamente, uma quantidade do material teste (produto) é inoculada com uma determinada população de microrganismo padrão. O produto contaminado com o microrganismo-teste é incubado em condições de temperatura adequadas para o desenvolvimento do microrganismo utilizado. Em diferentes tempos de incubação, uma alíquota do produto contaminado é retirada e a contagem microbiana é realizada.

A eficácia do sistema conservante escolhido para um produto em desenvolvimento não pode ser previsto com base somente na sua composição. Portanto, a formulação deve ser testada através de um desafio

microbiológico. O método utilizado não só deve ser validado, mas é necessário levar em consideração o tipo do produto e a sua utilização. Recentemente, os testes simulando o uso dos produtos de HPPC (*in-use tests*) estão adquirindo importância.

Um ponto muito importante sobre os testes de desafio microbiológicos é que, até o presente momento, não há consenso num método harmonizado, de forma global. A norma ISO 11930:2012 “*Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*”, é específica para produtos de HPPC, encontra-se em fase de discussão final, e é possível que venha a se tornar uma norma harmonizada para este setor.

Diferentes métodos oficiais e normativos apresentam pequenas variações de procedimento, que serão apresentadas a seguir.

Um levantamento realizado por Anon (1990) indicou que nos EUA, 78% utilizavam a metodologia CTFA modificada. As modificações mais frequentes envolvem o uso de microrganismos adicionais, desafios múltiplos, aumento da concentração de microrganismos inoculados e critérios mais rigorosos de aprovação. Somente 3% utilizavam o método conforme publicado. A metodologia USP estava adotada por 19% das empresas, e a norma ASTM não havia sido adotada por nenhuma empresa.

A metodologia USP 37, está orientada conforme as 4 categorias dos produtos compendiais, sendo a que mais aproxima da aplicação cosmética e em domissanitários é a Categoria 2.

- **Categoria 1:** Injetáveis e parenterais, incluindo medicamentos estéreis, nasais e oftálmicas.
- **Categoria 2:** Produtos de uso tópico, em base aquosa, produtos não estéreis e emulsões, incluindo as de aplicação em mucosas.
- **Categoria 3:** Produtos orais, exceto antiácidos, preparados com bases ou veículos aquosos.
- **Categoria 4:** Antiácidos preparados com base aquosa.

7.4.1 Nível de Inóculo

O inóculo para o *Challenge Test* é constituído de uma suspensão, em solução salina ou água estéril, das células microbianas, preparada a partir de uma cultura ativa, de 24 – 48h em superfície de Ágar (tubo inclinado ou placas de Petri), do meio recomendado para cada microrganismo. A suspensão é ajustada para uma contagem de 10^8 ufc.mL⁻¹ para as bactérias (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, etc.) e 10^7 ufc.mL⁻¹, para os fungos (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, etc.), usando técnicas como a densidade óptica (DO₆₂₀ 0,15 a 0,46 para suspensões celulares a 10^8 ufc.mL⁻¹), por turbidimetria, ou por comparação visual com os tubos padrões de *McFarland*.

Em qualquer teste, a suspensão de inóculo é quantificada através de diluição e plaqueamento para determinar a quantidade inoculada, na ocasião de cada inoculação realizada.

O motivo pela qual se utiliza culturas crescidas sobre o Ágar, ao invés de caldo é para evitar o arraste de meio de cultura para os tubos teste, que pode interferir diretamente sobre os conservantes e antimicrobianos presentes na amostra em teste, inclusive na forma de neutralizantes.

7.4.2 Microrganismos a serem inoculados

Os microrganismos-teste adotados para os testes de desafio seguem a linha dos microrganismos originais determinados na Farmacopéia USP. Como os microrganismos farmacopéicos foram selecionados primeiramente para teste de medicamentos, os microrganismos se restringiram a três bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e a dois fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*). Outras metodologias, como os do CTFA e ASTM, ampliaram o escopo de microrganismos, abrindo opções, para incluir os isolados *in house*, quer seja os de monitoramento ambiental ou deteriorantes/contaminantes de processo, pois estas duas metodologias foram elaboradas especificamente para cosméticos a base água.

Tabela 13: Microrganismos-teste adotados nas várias referências e compêndios.

Microrganismo	USP 37	FB 5	EP 7	ISO 11930	ASTM E640-06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	X	X	X	X	X
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	X	X		X	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739					X
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	X	X	X	X	X
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028					X
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416					X
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	X	X	X	X	X
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	X	X	X	X	X
<i>Eupenicillium levitum</i> ATCC 10464					X
Microrganismos <i>in-house</i> ou deteriorantes					opcional

USP37: United States Pharmacopeial Convention, Ed. 37
 FB 5: Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição
 EP 7: European Pharmacopeia, 7th Edition

Tabela 14: Microrganismos-teste adotados pelo CTFA, com os critérios de seleção dos microrganismos-teste

CTFA M-3: Cosméticos base água e CTFA M-4: Cosméticos para área dos olhos		
Tipo de Microrganismo	Cepas	Quais Usar
Isolados <i>in-house</i>	Opcional – use cepas apropriadas	Um ou mais
Cocos Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ao menos um
Bacilos Gram-fermentativos	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterococcus cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Enterococcus georgoviae</i>	Ao menos dois
Bacilos Gram-não fermentativos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , e outro adicional
Leveduras	<i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i>	Ao menos um
Fungos	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium luteum</i>	Ao menos um
Bacilos esporulados	<i>Bacillus subtilis</i>	Opcional

ISO 11930: International Standards Organization
 ASTM E640-06 (reapproved 2012): Standard Test Method for Preservatives in Water-Containing Cosmetics.
 ASTM International, USA
 CTFA: Cosmetics, Toiletry and Fragrance Association

A seleção dos microrganismos utilizados para o teste de desafio microbiológico é determinada com base em riscos e frequência que participam do processo de deterioração.

Um fator importante a ser considerado é que tanto o CTFA quanto o ASTM preconizam desafio com inóculos mistos de bactérias, e de leveduras + fungos. A metodologia USP preconiza o uso de inóculos individuais, ou seja, cada microrganismo é testado separadamente.

7.4.3 Volume de microrganismo por amostra

A quantidade de inóculo depende da metodologia adotada. As quantidades variam de 20, 25, 50 e 100g ou mL, além daqueles que fazem o uso da embalagem final fechada. A determinação da quantidade está principalmente relacionada às limitações da embalagem fechada. Quando possível, opta-se por

quantidades de 50 ou 100g ou mL, pois evita-se o ressecamento e a preservação das características do produto durante a incubação de 28 dias.

Em todos os métodos, o inóculo é de 1%, que proporciona uma diluição de 1/100 do inóculo preparado. Ou seja, se o inóculo foi preparado na população de 10^8 UFC/mL ou g, a quantidade de microrganismos inicial do *Challenge* será de 1/100 da população do inóculo, 10^6 UFC/mL ou g. Portanto a maioria dos métodos preconizam que o inóculo seja diluído adequadamente, e semeado por plaqueamento para a obtenção da quantidade exata de microrganismo inoculado em cada teste, que é a população inicial.

Os níveis de contaminação inicial nos produtos, são aqueles que atinjam, pelo menos:

- 1×10^6 UFC de bactérias por grama de produto
- 1×10^5 UFC de leveduras por grama do produto
- 1×10^5 UFC de esporos de fungos por grama do produto

7.4.4 Homogeneização e armazenagem das amostras inoculadas

A homogeneização dos frascos deve ser de forma a fornecer uma distribuição uniforme dos microrganismos nas amostras. Portanto, embora descrito como “homogeneizar bem”, esta etapa deve ser feita manualmente, utilizando espátulas que melhor se adequem, de forma a atingir a amostra em todos os cantos do frasco, assegurando uma boa homogeneização.

7.4.5 Validação do neutralizante utilizado no teste

A validação do neutralizante é de suma importância no teste de desafio do sistema conservante *Challenge Test*, pois se não for adequadamente neutralizado, o conservante continua agindo durante o período de análise microbiológica, levando a contagens errôneas ou mesmo ausência de crescimento nas placas de Petri, causando falsos resultados de eficácia antimicrobiana.

Resumidamente, a validação do neutralizante é realizada em tubos de ensaio, colocando-se a mesma alíquota do microrganismo diluído em contato na solução neutralizante assim como no neutralizante acrescido do produto teste.

Estas duas condições testadas não devem resultar em diferença significativa de contagem entre si, imediatamente após contato (T_0) ou mesmo após decorrido um intervalo de tempo, geralmente de 10 a 15 minutos (T). Embora estas duas condições sejam as mais usadas para a validação da neutralização, recomenda-se a inclusão de um tubo com diluente universal (Controle do Inoculo), e um tubo com o produto contendo o antimicrobiano (Controle).

Alíquotas são retiradas em dois momentos (no início e após um tempo de contato definido pelo método), diluídas e semeadas em placas para contagem, segundo o protocolo estabelecido. A confirmação da ausência de declínio significativo na contagem entre o inoculo diluído no neutralizante e aquele diluído em diluente universal indica que a neutralização foi eficiente, e não afeta o inoculo.

Se as placas de controle do inoculo apresentarem crescimento normal e não for observado crescimento nas placas das diluições mais baixas, esta é uma clara indicação de que o neutralizante não é adequado, e outro deve ser selecionado.

A descrição passo-a-passo se encontra descrita na norma EN 1040 (ref.) e ASTM E-1054 (ref.)

7.4.6 Temperatura e tempo de incubação

Tabela 15: Condições para Preparo do Inóculo

	USP 37	CTFA	ASTM 640-06
Bactérias	32,5 ± 2,5°C 18 a 24h	30 a 37°C 18 a 48h	35 ± 2°C 24 a 48h
Leveduras	22,5 ± 2,5°C 44 a 52h	25 a 35°C 24 a 48h	25 ± 2°C 48 a 72h
Fungos filamentosos	22,5 ± 2,5°C 6 a 10 dias	20 a 30°C 7 a 28 dias	25 ± 2°C 5 a 7 dias

Tabela 16: Condições dos parâmetros para a análise microbiológica do teste

	USP 37	CTFA	ASTM 640-06
Bactérias	22,5 ± 2,5°C	30 a 37°C 24 a 48h	35 ± 2°C 48 a 72h
Leveduras	22,5 ± 2,5°C	25 a 35°C 48 a 72h	Opcional
Fungos filamentosos	22,5 ± 2,5°C	20 a 30°C 3 a 7 dias	Opcional
Fungos (leveduras + fungos filamentosos)	-	-	25 ± 2°C 3 a 5 dias

7.4.7 Períodos de teste

Os tempos de contato adotados para a análise são:

- USP 37: 7, 14 e 28 dias
- CTFA: 0, 1-3, 7, 14, 21 e 28 dias. Se for introduzida a reinoculação, a contagem semanal é retomada por pelo menos 21 dias.
- ASTM: 0, 7, 14, 21 e 28 dias, sendo o 21º dia considerado opcional, e mais contagens intermediárias podem ser adicionadas.

7.4.8 Critério de aceitação (Log de redução por categoria de produtos)

Os critérios de comprovação da eficácia de preservantes (*Challenge Test*) segundo a USP depende da categoria do produto, conforme citados no item 6.5.

Tabela 17: Critérios de comprovação da eficácia do sistema conservante para 3 diferentes normas.

Método	Grupo de Produtos	Critério
USP	Bactérias	<p>Produtos de Categoria 1: Não menos que 1 Log de redução em 7 dias, não menos que 3 Log de redução em 14 dias e sem aumento na contagem em 28 dias.</p> <p>Produtos de Categoria 2: Não menos que 2 Log de redução em 14 dias, e sem aumento na contagem de 28 dias.</p> <p>Produtos de Categoria 3: Não menos que 1 Log de redução em 14 dias, e sem aumento na contagem de 28 dias.</p> <p>Produtos de Categoria 4: Sem aumento na contagem inicial após 14 e 28 dias.</p>
	Leveduras e <i>Fungos filamentosos</i>	Sem aumento nos dias 7, 14 e 28
CTFA	Bactérias	99,9% de redução (3 Log) de bactérias em 7 dias, para cada desafio, com redução ou não-crescimento posterior, pelo tempo do teste.
	Leveduras e <i>Fungos filamentosos</i>	90% de redução em 7 dias, para cada desafio, com não crescimento posterior.
ASTM	Bactérias e Leveduras	Redução de 99,9% (3 Log) em 7 dias, para cada desafio, com não crescimento posterior.
	Fungos	Pelo menos 90% de redução (1 Log) em 7 dias, para cada desafio, sem crescimento posterior ao longo do teste.

7.4.9 Leituras / Cálculos

As leituras das contagens são realizadas conforme metodologia de recuperação recomendada. Geralmente as contagens são feitas em duplicata por diluição, computando como resultado a média aritmética das contagens obtidas em 2 placas, multiplicada pela respectiva diluição.

A redução logarítmica da população microbiana é expressa como:

$$RD = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_x$$

Onde RD = Redução Decimal, ou Redução Logarítmica, N_0 é a contagem inicial e N_x é a contagem do tempo x de contato.

Avaliação do resultado: número positivo indica a redução decimal obtida, e um número negativo indica crescimento microbiano. Os resultados devem ser analisados conforme os critérios de aceitação apresentado no item 6.5.8.

7.5 HALO DE INIBIÇÃO

A técnica do halo de inibição é uma forma relativamente simples de medir a existência ou não de atividade antimicrobiana. É importante salientar que este método não diferencia atividade microbicida da microbiostática, uma vez que a leitura é realizada pelo tamanho do raio ou diâmetro do halo, resultante da ausência de crescimento microbiano.

O método farmacopéico é utilizado para o doseamento de antibióticos, utilizando as cepas específicas para cada antibiótico.

As metodologias para o doseamento de antibióticos encontram-se descritas em detalhes nas Normas aprovadas do NCCLS/CLSI, Método M2-A8 (disco-difusão) e Método M7-A6 (macro e micro-diluição em caldo), traduzidos, editados e disponibilizados na íntegra pela ANVISA (NCCLS 2003-a e 2003b). Em 01/01/2005, NCCLS (*National Committee on Clinical Laboratory Standards*) mudou oficialmente o seu nome para CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). A ANVISA adquiriu os direitos autorais, na Língua Portuguesa, do manual do CLSI e suas atualizações, por cinco anos. Esse manual de padronização do instituto norte-americano é dividido em cinco módulos e mensura a sensibilidade de agentes (bactérias e microrganismos em geral) a diversos antimicrobianos.

7.5.1 Seleção do meio de cultura e microrganismo a ser utilizado

A seleção dos microrganismos-teste e os meios de cultura podem ser obtidos nos compêndios (USP, FB,

BP, etc), assim como nas normas NCCLS/CLSI.

Porém, no caso de produtos de HPPC, os microrganismos mais relevantes à aplicação e ao *claim* desejado devem ser selecionados.

7.5.2 Difusão em Ágar

O método de difusão em ágar consiste na medida do halo de inibição formado, onde o microrganismo-teste é o “visualizador” desta inibição. Em princípio, o antimicrobiano se difunde através da superfície do meio de cultura contendo ágar, inibindo ou mesmo matando os microrganismos presentes na área.

Desenvolvido primeiramente para a aplicação clínica, na dosagem e seleção de antibióticos, conforme citado anteriormente, o método é simples, e permite introduzir variações, para adaptá-los a diferentes situações.

Neste capítulo estaremos focando a aplicação não-clínica, ou seja, produtos de HPPC, com conservantes e ação antimicrobiana.

A difusão em ágar é realizada de duas formas distintas: com orifício em Ágar ou técnica dos poços - Figura 04 ou com discos de papel - Figuras 05 e 06.

Figura 04: Método de halo por disco difusão



Figura 05: Método de halo por orifícios de ágar

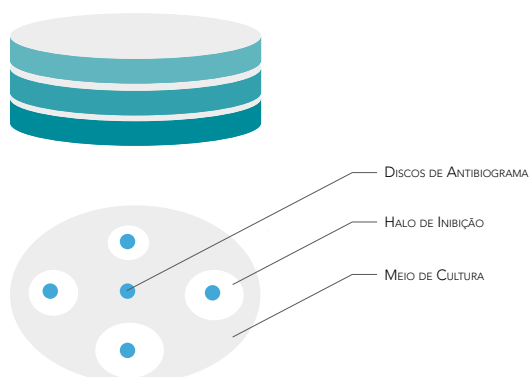
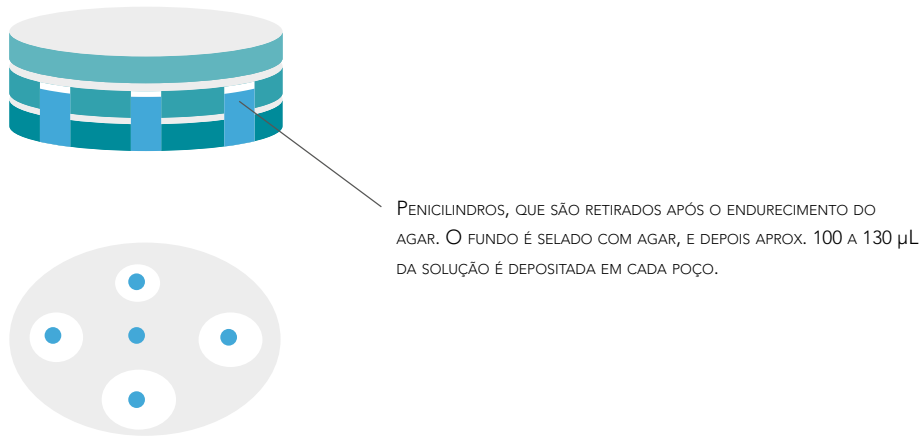


Figura 06: Vista do topo - método de halo por orifícios de ágar



Para outras aplicações, em especial na área cosmética, o teste é realizado utilizando-se um suporte, como o papel de filtro cortado em círculos, de 40 a 50 mm de diâmetro, esterilizados. Sobre este suporte, o produto é aplicado, mantendo-se a quantidade aplicada nos Branco e Controle. Neste caso, somente um suporte é utilizado em cada placa.

7.5.3 Leitura

A formação do halo de inibição, ausência/presença de crescimento microbiano sobre o corpo de prova, e as medidas do halo são anotadas.

No caso de antibióticos, a medida é realizada pelo diâmetro do halo, ou seja, de toda a zona inibitória.

No caso em que o tamanho do disco é diferente, as regras do método NCCLS devem ser ajustadas.

Ou seja, não há como mensurar quantitativamente a concentração do conservante.

7.5.4 Critério de aceitação

Considerar que no teste com produtos de HPPC, o tamanho do halo não é muito relevante. Mas a formação clara de um halo de inibição indica presença de atividade antimicrobiana, que pode ser somente microbiostático, mas também microbicida.

O tamanho do halo formado tem relação direta com a migração do agente antimicrobiano através da superfície de Ágar. Mantendo uma variável, e rigorosamente os demais parâmetros do ensaio, é possível correlacionar a variável, como a concentração do antimicrobiano.

7.6 REDUÇÃO LOGARÍTIMICA

A Redução Logarítmica é o termo utilizado para descrever a metodologia quantitativa de redução na contagem microbiana resultante de atividade antimicrobiana. O método é também conhecido como *Time Kill*, *Decimal Reduction*, *Método Reducional*, Cálculo do Valor D, etc.

O método consiste basicamente em preparar uma suspensão de microrganismos (inóculo), e inocular a solução antimicrobiana a ser testada. No momento do contato inicial deve ser acionado o cronômetro, e há tempos especificados para cada finalidade, alíquotas são retiradas e prontamente neutralizadas em solução/meio previamente definidos. Após a neutralização, a suspensão resultante é diluída e semeada em meio apropriado, para contagem dos sobreviventes N.

Em paralelo, são realizadas contagens do inóculo, para cálculo do N_0 (população inicial presumida).

7.7 ATIVIDADE ANTISSEPTICA

O *claim* "antisséptico" é utilizado para produtos que devem matar os microrganismos sobre a pele e mucosa, até níveis considerados seguros, num intervalo de tempo adequado. Nesta classe de produtos se enquadram os sabonetes degermantes, antissépticos, produtos a base de álcool utilizado para antisepsia, produtos higienizantes de uso doméstico e hospitalar, produtos de higiene pessoal, enxaguatório bucal, entre outros.

O ensaio é realizado para avaliar a redução da população microbiana proporcionada pelo produto teste quando entra em contato com as bactérias. Vários microrganismos podem ser testados, dependendo da finalidade do produto teste, no entanto, os microrganismos comumente testados são: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo estes representantes das bactérias *Gram positivas* e *Gram negativas* respectivamente.

Estes microrganismos também são os indicados na norma CEN 1040, para a avaliação básica de um produto antimicrobiano.

Em se tratando de microbiota da pele, o *Staphylococcus epidermidis* é prevalente sobre *Staphylococcus aureus*. Porém, o *S. aureus* é um microrganismo-teste mais robusto que o *S. epidermidis*. A *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo com maior resistência à erradicação que as demais bactérias *Gram-negativas* comumente adotadas como organismo teste: *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*.

Outros microrganismos podem e devem ser testados, de acordo com o tipo de produto, sua abrangência e rigor requeridos. Isto é, não podemos dizer que o produto seja "esporicida" se bactérias esporuladas não foram testadas. Microrganismos específicos da mucosa bucal, como o *Streptococcus pyogenes*,

podem ser incluídos nas avaliações de enxaguatórios bucais, assim como *Candida albicans*, para reforçar a atividade fungicida.

7.7.1 Preparação dos microrganismos-teste

A partir da cultura estoque preparada, os microrganismos-teste são repicados sobre a superfície de Ágar TSA e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Este repique é denominado R1.

A partir do crescimento obtido na R1, os microrganismos-teste novamente são novamente transferidos para uma nova superfície de Ágar TSA e são incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Este repique é denominado R2.

As culturas geradas no R2 são utilizadas para os testes, incluindo os controles de toxicidade do neutralizante, resistência às condições ambientais e eficácia da neutralização. A suspensão é preparada de forma a conter 10^4 a 10^5 UFC/mL. Uma vez confirmado o neutralizante conforme descrito acima, um novo R2 é preparado para o teste.

Para a determinação da atividade antimicrobiana, utiliza-se uma suspensão de cada microrganismo-teste na concentração de 10^8 a 10^9 UFC/mL, para o caso de bactérias, e de 10^6 a 10^8 para o caso de leveduras e fungos filamentosos.

7.7.2 Toxicidade e Eficácia do Neutralizante

O controle da existência de qualquer atividade tóxica do neutralizante sobre o microrganismo-teste é necessário para garantir que o neutralizante usado no ensaio não afeta a viabilidade dos microrganismos sobreviventes do *Time Kill*. Da mesma forma, a eficácia do neutralizante deve ser observada. Nos testes de *Time Kill*, é imprescindível que o antimicrobiano cesse a sua ação exatamente no tempo desejado. Somente desta forma é possível mensurar a curva de morte, que é a essência do *Time Kill*.

7.7.2.1 Avaliação da toxicidade do Neutralizante

A toxicidade do neutralizante a ser utilizado no teste é avaliada através de uma verificação específica. O inóculo de cada microrganismo é adicionado ao neutralizante nas mesmas condições usadas no teste da amostra, substituindo-se a quantidade de amostra por água. Tradicionalmente, como os testes são realizados em tubos contendo 10 mL de solução, a proporção utilizada é a seguinte:

- Num tubo de ensaio contendo 8 mL de caldo neutralizante e 1mL de água estéril, adiciona-se 1mL da suspensão de inóculo contendo 10^4 a 10^5 UFC/mL (população inicial equivalente a 10^3 a 10^4 UFC/mL);

- Em outro tubo de ensaio, 9 mL de água estéril recebe 1mL do inóculo, como o Controle;
- Estas misturas são homogeneizadas e mantidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos;
- Após a incubação, 0,1mL de cada mistura é diluída em 9,9mL de caldo neutralizante e homogeneizadas (população presumida de 10 a 100 UFC/mL);
- 1 mL do conteúdo de cada tubo é plaqueado, em duplicata, pela técnica de *pour plate* em Ágar TSA;
- As placas são incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas;
- Após incubação as quantidades de UFC obtidas são enumeradas.

A ausência de toxicidade do neutralizante é confirmada se a média das contagens obtidas nas placas de neutralizantes for igual à média das contagens do tubo Controle, ou seja, $(\text{Log}_{10}\pm 0,5)$.

7.7.2.2 Eficácia da Neutralização

A capacidade do caldo neutralizante usado no ensaio para inativar os efeitos do agente antimicrobiano presente na amostra é verificada da seguinte maneira:

- Em 4,9 mL do produto teste é adicionado 0,1 mL de água estéril;
- Esta mistura é homogeneizada e incubada em banho-maria a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos;
- Após a incubação, é retirada uma alíquota de 0,1mL e colocado em um tubo contendo 9,8 mL de caldo neutralizante;
- O tubo é homogeneizado e mantido a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos;
- Após a incubação, é adicionado 0,1 mL do inóculo contendo 10^4 a 10^5 UFC/mL;
- Caso esta verificação for realizada ao mesmo tempo com o teste de toxicidade do neutralizante, o Controle poderá ser o mesmo para ambos os testes. Caso contrário, adicionar o tubo Controle;
- O tubo é homogeneizado e mantido a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos;

- Após o tempo de contato, é transferida uma alíquota de 0,1 mL em 9,9 mL de água estéril;
- 1 mL do conteúdo do tubo foi plaqueado, em duplicata, por *pour plate*, com Ágar TSA;
- As placas são incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas;
- Após incubação as quantidades de UFC obtidas são enumeradas.

A eficácia da neutralização é confirmada se a média das contagens obtidas nas placas de neutralizantes forem iguais à média das contagens do tubo Controle, ou seja, $(\text{Log}_{10} \pm 0,5)$.

7.7.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana da amostra

Resumidamente, as etapas de teste realizadas com as amostras são:

- 49 mL da amostra foram inoculadas com 1 mL da suspensão padrão de microrganismos-teste, contendo 10^8 a 10^9 UFC/mL, que caracteriza uma suspensão densa de microrganismos. No caso de fungos filamentosos e leveduras, a contagem é de 10^6 a 10^7 UFC/mL;
- A mesma quantidade de inóculo deve ser transferida para 49 mL de água estéril, sendo este o controle do inóculo. A contagem desta amostra fornece a população inicial do teste;
- As amostras inoculadas são mantidas à temperatura controlada de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a inoculação, homogeneizar vigorosamente e retirar imediatamente uma alíquota de 0,1 mL da amostra inoculada, transferindo-a para um tubo contendo 8,8 mL de caldo neutralizante + 1,1 mL de água. Esta é a amostra denominada de “coleta no tempo imediato”, (TI);
- Ao atingir cada tempo de contato pré-determinado, sendo eles 1, 2, 3 e 5 minutos, são coletadas as amostras referentes a cada um dos tempos de contato, procedendo-se de forma similar. Diferentes tempos são utilizados, dependendo dos objetivos do teste;
- Ao final da coleta do último tempo, os tubos são incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 minutos;
- Após este período cada uma das amostras são submetidas à diluição decimal, e plaqueadas por *pour plate* em ágar TSA;
- As placas são incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas;

- Após incubação, placas contendo até 300 colônias são selecionadas e quantificadas em UFC/mL da amostra original.

7.7.4 Análise de Resultados

O resultado do teste é expresso através da redução decimal da população microbiana ocorrida ao longo do tempo de contato do inóculo com a amostra. A Redução Decimal da população microbiana é calculada através da seguinte fórmula:

$$\mathbf{RD = \log N_0/N_T} \qquad \mathbf{Equação 01}$$

Onde: RD é a redução decimal; N_0 é a contagem inicial do inóculo; e N_T a contagem obtida no tempo de contato T com a amostra.

Uma vez obtida a RD, é possível e calculada a porcentagem de redução obtida pelo contato do microrganismo com a amostra através de Equação 2.

$$\mathbf{PR= (1-1/10^{RD})\times 100} \qquad \mathbf{Equação 2}$$

Onde: PR é a porcentagem de redução da população microbiana; e RD é a redução decimal obtida calculada pela Equação 2.

Para fins científicos, considera-se a Redução Decimal como o parâmetro correto para designar a redução de população microbiana. Porém, ainda frequentemente encontramos dados expressos em % de redução, pois estes são mais compreensíveis para a população em geral. Desta forma, usa-se o seguinte critério para a conversão:

RD = 1 equivale a 90% de redução

RD = 2 equivale a 99% de redução

RD = 3 equivale a 99,9% de redução

RD = 4 equivale a 99,99% de redução

RD = 5 equivale a 99,999% de redução, e assim sucessivamente.

8 CONTROLE MICROBIOLÓGICO NO AMBIENTE INDUSTRIAL

8.1 CLASSIFICAÇÃO DE RISCO/ SUCEPTIBILIDADE A CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MATERIAIS E ÁREAS.

Monitoramento ambiental ou Controle microbiano ambiental (CMA) é a contagem de microrganismos presentes na área onde está sendo fabricado ou envasado o produto. Consiste na avaliação da contaminação presente no ambiente de fabricação, envase e análise dos produtos, assim como dos procedimentos de limpeza e de sanitização utilizados através da determinação da quantidade, tipo e origem dos microrganismos encontrados, possibilitando a detecção de possíveis focos de contaminação e a adoção de medidas corretivas.

É responsabilidade do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico proceder a análise ambiental, pessoal e de equipamentos dos setores envolvidos na produção e envase de produtos de HPPC. A periodicidade é determinada pelo profissional responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológica ficando também, a critério deste profissional, a prévia comunicação da análise ao Setor de Produção ou a realização de análises surpresas.

8.1.1 Definição dos pontos (alto / médio e baixo risco)

Nível de risco alto ou alto risco (NRA):

Amostras coletadas de pontos do ambiente que entram em contato direto com os produtos ou matérias-primas.

- Exemplos: mãos de operadores, bico de enchimento das máquinas, recipientes de envase, pesagem, etc.

Nível de risco médio ou médio risco (NRM):

Amostras coletadas de pontos próximos aos produtos ou matérias-primas, consideradas como de média probabilidade de contaminação.

- Exemplos: partes externas das máquinas, ambientes, superfícies, etc.

Nível de risco baixo ou baixo risco (NRB):

Amostras coletadas de pontos distantes dos produtos ou matérias-primas, oferecendo baixa probabilidade de contaminação.

- Exemplos: paredes, portas, pisos, etc.

8.1.2 Frequência de testes

A frequência do monitoramento ambiental e os limites microbianos ambientais são determinados de acordo com a avaliação de risco e um programa de monitoramento ambiental estabelecido. Cabe a cada empresa especificar a frequência e os limites deste monitoramento.

Tabela 18: Sugestão de Limites Microbianos Ambientais

Nível	Local	Limite
NRA	Parte interna de máquinas	10-50 UFC / 25 cm ²
	Mão de operador	50-100 UFC / 25 cm ²
NRM	Parte externa de máquinas e bancadas	100 UFC / 25 cm ²
	Ambiente	100 UFC / placa
NRB	Portas e paredes	100 UFC / 25 cm ²
	Pisos	300-500 UFC / 25 cm ²

Índices praticados por algumas empresas de HPPC (não se tem referência destes índices em literatura)

8.1.3 Análise dos dados

O cálculo do percentual de eficiência de limpeza e sanitização das áreas fabris são baseados na relação entre o número de pontos satisfatórios e o número total de pontos amostrados, expressos em porcentagem.

$$\% \text{ EFICIÊNCIA} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de pontos satisfatórios} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de pontos amostrados}}$$

Esta unidade (% Eficiência) é usada para expressar de forma simples o desempenho da área. Para uma área fabril ter bom desempenho, o percentual mínimo de eficiência deverá ser de 80% para cada nível de risco.

8.2 AMOSTRAGEM (TÉCNICA/TIPO)

A qualidade é construída em um produto quando o processo, as instalações e os equipamentos utilizados são desenhados de forma a minimizar ou eliminar os riscos potenciais de contaminação.

O monitoramento microbiológico, independentemente do grau de sofisticação, não é capaz de identificar e quantificar todos os contaminantes microbianos presentes em ambientes controlados. No entanto, o monitoramento de rotina deve fornecer informações suficientes para determinar que o ambiente controlado está operando dentro de um estado de controle adequado.

No plano de amostragem devem ser incluídos os locais onde produto é exposto e os momentos em que há atividades de manipulação do produto por operadores. Também devem ser considerados pontos próximos aos locais em que produtos são expostos e onde são manipulados materiais ou superfícies que entrarão posteriormente em contato com o produto. Deve também ser feita uma análise de risco de forma a provar a correta escolha dos locais e a frequência de monitoramento. De maneira geral, os meios de cultura utilizados para o monitoramento ambiental são o TSA para bactéria e SDA para fungos.

As placas de contato (RODAC) para superfícies de áreas produtivas, de equipamentos, e de mãos de operadores são usadas para detectar contaminação por microrganismos nas imediações da área de trabalho. A amostragem de operadores torna-se ainda mais relevante quando operações manuais são realizadas, e nestes casos, testes adicionais para detecção de contaminações em outras superfícies dos uniformes podem ser necessários.

Placas de contato devem ser utilizadas para detectar microrganismos em superfícies que podem levar à contaminação do produto. Portanto, deve ser concebido um sistema de amostragem com base em uma avaliação de risco, considerando o tipo de atividade realizada, para monitorar superfícies relevantes onde microrganismos contaminantes podem ser encontrados. Estas superfícies podem incluir superfícies de trabalho, de equipamentos, de paredes e de tetos de sistemas de fluxo unidirecional de ar. Amostras coletadas em superfícies ainda molhadas com soluções sanitizantes não devem ser consideradas válidas.

Swabs ou outros materiais adsorventes umedecidos com água estéril ou outros diluentes podem ser utilizados para amostrar superfícies irregulares ou de acesso difícil, tais como equipamento, agulhas de enchimento, tubulações e cantos. Eles são também úteis para a amostragem de grandes áreas depois de procedimentos de limpeza ou de desinfecção. A recuperação dos microrganismos a partir de esfregaços deve ser validada, incluindo o método de amostragem escolhido, a adequação do líquido molhante do swab, e a transferência de microrganismos para o meio de crescimento. Os estudos de validação devem comprovar uma recuperação superior a 50% de cada uma das cepas de microrganismos utilizados. Ressalta-se que não há limites regulamentares estabelecidos para amostras de swab. Os líquidos utilizados para recuperação dos microrganismos devem conter neutralizantes de desinfetantes, quando necessário.

8.2.1 Amostragem de ambientes: ar (estático e dinâmico)

O monitoramento de rotina estático (em áreas sem operações) é recomendado para garantir que os níveis de limpeza são mantidos quando a área não estiver em uso por curtos períodos de tempo ou para verificar a eficácia de procedimentos limpeza antes das operações. Placas de sedimentação podem detectar bactérias e fungos que se sedimentam na coluna de ar acima da placa. Embora a sensibilidade da técnica dependa do tamanho da placa, da velocidade de deposição de microrganismos, e das propriedades de promoção do crescimento da placa escolhida, as placas de sedimentação são o único método que proporciona o monitoramento contínuo de microrganismos em uma área produtiva. Placas de sedimentação devem ser alocadas em áreas de alto risco de contaminação do produto. Elas devem ser colocadas o mais próximo possível do local onde as atividades são executadas, mas sem causar obstrução de atividades ou contaminação pelas próprias placas. O tempo de exposição de placas individuais deve ser determinado de acordo com dados obtidos em estudos de validação.

Sugestão de análise microbiológica de ar em ambientes produtivos:

A amostragem do ar consiste na exposição de placas de Petri, contendo meio de cultura adequado e esterilizado em diferentes pontos da área de teste, por um período de 30 minutos. Utilizar as placas de Petri previamente preparadas com meio TSA para bactéria e SDA para fungos. Selecionar os pontos a serem amostrados. Rotular as placas com local e data. Abrir as placas expositivas (1 placa de TSA e 1 de SDA) no local selecionado. Efetuar exposição durante 30 minutos. Para tempos de exposição superior ou inferior a 30 minutos efetuar a correção conforme a fórmula:

$$\text{UFC/placa} = \frac{\text{Número total de colônias na placa} \times 30}{\text{Tempo de exposição em minutos}}$$

8.2.2 Superfícies e Equipamentos (rodac/ swab)

Amostra de superfícies planas e Equipamentos (Rodac)

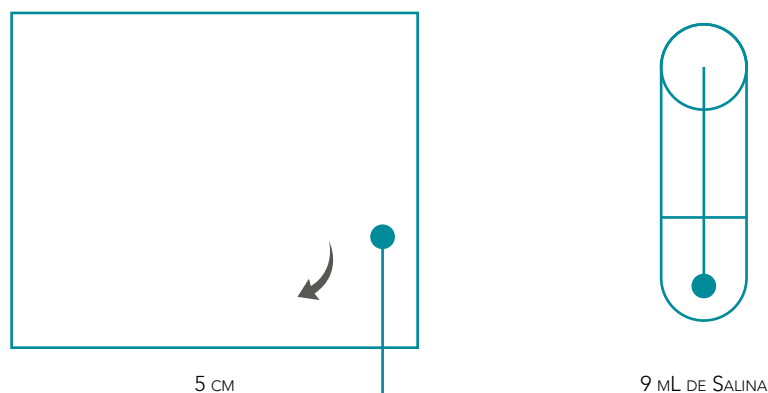
Utilizar placas Rodac de TSA e SDA. Selecionar os locais a serem amostrados. Rotular as placas Rodac especificando qual local está sendo analisado. Retirar a tampa da placa. Pressionar a superfície do ágar na área relacionada para o teste por cerca de 10 segundos. Não deixar a placa deslizar, pois poderá favorecer o aparecimento de espalhamento de colônias dificultando a contagem. Evitar pressionar com força, pois poderá acarretar deformações no ágar. Recolocar a tampa na placa. Limpar o local analisado com algodão embebido em solução sanitizante.

Amostra de superfícies não-planas e Equipamentos (Swab)

Utilizar tubos contendo solução salina estéril. Selecionar as superfícies a serem amostradas. Rotular os tubos especificando qual superfície será analisada. Introduzir um swab estéril no tubo contendo solução salina estéril e umedecê-lo.

Friccionar a mecha de algodão em dois sentidos, girando-a em uma superfície de 5 X 5 cm ou 25 cm². Friccionar com movimentos de 90 graus em relação a original, conforme o esquema abaixo. Introduzir o swab estéril no tubo de ensaio de solução salina. Homogeneizar vigorosamente com um agitador de tubos tipo vortex e deixar em repouso por 15 minutos. Retirar alíquotas de 1 mL e transferir para placas de Petri estéreis previamente identificadas. Nas placas destinadas ao crescimento de fungos: adicionar 15 mL de ágar base SDA, previamente fundido, a temperatura próxima a 45 °C. Nas placas destinadas ao crescimento de bactérias: adicionar 15 mL de TSA, previamente fundido, a temperatura próxima a 45 °C. Homogeneizar, fazendo um "8" ou um "S" com as placas, sobre a bancada, e em seguida deixar as placas em repouso até completa solidificação do ágar. Armazenar o tubo contendo o swab e a salina em balde apropriado para descontaminação.

Figura 07: Tubo contendo o Swab e a salina em balde apropriado para descontaminação.



8.2.3 Pessoal (swab/rodac)

Utilizar placas Rodac de TSA e SDA. Selecionar os colaboradores cujas mãos serão analisadas. Rotular as placas Rodac com nome, data, e atividade exercida pela pessoa, especificando qual mão será analisada (direita ou esquerda). Informar ao funcionário a realização do teste. Este deve abrir as mãos, deixando a palma voltada para cima. A mão deverá ficar parada. Retirar a tampa da placa. Pressionar a superfície do ágar na palma da mão do operador, e em seguida na ponta de cada um dos dedos. Cuidado para não

deixar a placa deslizar, pois poderá favorecer o aparecimento de espalhamento de colônias dificultando a contagem. Evitar pressionar com força, pois poderá acarretar deformações no ágar. Recolocar a tampa na placa. O funcionário deverá lavar as mãos e sanitizá-la após a realização do teste.

8.2.4 Matérias-primas-retenção (referências regulatórias)

De acordo com a RDC 48 de 2013 as amostras de produtos acabados devem ser retidas nas embalagens originais. Se for necessário, em virtude da capacidade das apresentações de venda, poderá ser retido produto fracionado em embalagem equivalente ao material de comercialização, a fim de facilitar o armazenamento e a realização dos ensaios. Em todos os casos as amostras devem ser armazenadas nas condições especificadas, em quantidade suficiente para permitir, no mínimo, duas análises completas. Nos casos de produtos sujeitos à contaminação microbiológica, deve-se manter ao menos uma amostra na sua embalagem original.

As amostras de retenção devem possuir rótulo contendo identificação, lote e data de validade.

As amostras de matérias-primas, quando aplicável, devem ser retidas até o vencimento do seu prazo de validade. As amostras de produtos acabados devem ser retidas por 1 (um) ano após o vencimento do seu prazo de validade.

Recomenda-se que as amostras sejam armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, salvo exceções que deverão ser armazenadas de acordo com especificações próprias.

O acesso às amostras de retenção deve ser restrito aos funcionários autorizados.

Sugestão de rotulagem para retenção de matéria-prima:

NOME DA EMPRESA	
AMOSTRA DE RETENÇÃO	Nº _____
Produto: _____	
Lote: _____	Validade: _____
Fornecedor: _____	
Amostragem: ____/____/____	Responsável: _____

Sugestão de rotulagem para retenção de produto acabado:

NOME DA EMPRESA	
AMOSTRA DE RETENÇÃO	Nº _____
Produto: _____	
Lote: _____	Origem de Produção: _____
Validade do Produto: _____	
Armazenar até: ____/____/____	Responsável: _____

8.2.5 Outros insumos de processo (panos, escovas, esponjas)

Insumos de processo como esponjas, escovas e panos de limpeza ganham destaque, uma vez que podem transferir quantidades significativas de microrganismos para superfícies dos equipamentos e utensílios utilizados na fabricação de produtos de HPPC.

As esponjas normalmente ficam armazenadas em temperatura ambiente, dentro de recipientes contendo água, restos de produtos de HPPC e resíduos de detergente, os quais podem favorecer a multiplicação de microrganismos.

Por esses motivos, cuidados especiais necessitam ser tomados, a fim de diminuir a contaminação microbiológica destes insumos e alguns métodos de desinfecção, como fervura por 5 minutos ou imersão em hipoclorito de sódio a 200 ppm por 10 minutos, têm sido recomendados, a fim de encontrar ações eficazes, acessíveis e, ao mesmo tempo, fáceis de serem aplicadas nas rotinas de trabalho.

O método de detecção microbiana consiste em adicionar os insumos em água salina peptonada esterilizada a 0,1% com 0,1ml de tiosulfato de sódio 10% para neutralizar os resíduos de detergente (na base de 0,1ml/cm² de superfície externa do insumo). Posteriormente, comprimir manualmente com o auxílio de uma bagueta estéril para a retirada do líquido remanescente, o qual se constituiu na amostra a ser analisada. Proceder a contagem e identificação de patógenos conforme método tradicional.

9 LIMPEZA E SANITIZAÇÃO

Assegurar a qualidade microbiológica de fabricação através de programas eficazes de limpeza e sanitização é essencial para assegurar as boas práticas de fabricação, e do produto final.

Os procedimentos para a limpeza e sanitização necessitam estar claramente descritos e validados, pois eles são complementares, isto é, o sucesso do controle microbiológico depende da sinergia dos dois processos. A escolha do melhor método para cada uma destas etapas depende de cada instalação, produtos, matérias-primas e o processo de fabricação em si.

Etapa 1: Limpeza

É realizada de forma física, de modo a remover a sujidade, resíduos e grande parte da contaminação, através do uso de água, detergente, e outros agentes de limpeza. O objetivo principal desta etapa é promover a remoção de maior parte da sujeira, constituído basicamente de resíduos e dejetos, que possa estar ancorada e abrigando os microrganismos. A remoção desta camada deixa a superfície exposta para a ação dos desinfetantes. Em superfícies de tanques, reatores e reservatórios que podem ser alcançadas, o uso de jateamento por pressão é recomendada, por remover melhor as crostas e resíduos além de economizar a água de uso e dispensar a fase de escovamento.

Etapa 2: Enxágue

Geralmente realizada com água purificada, está aos poucos sendo substituída por água aquecida ou vapor, já integrando a etapa de sanitização. É importante ressaltar que a qualidade da água nesta etapa é de extrema importância.

Etapa 3: Sanitização e desinfecção

A sanitização é realizada após a limpeza e enxágue, e tem como objetivo assegurar a redução da contaminação até níveis seguros. O grau de redução é definido pelo tipo de produto em fabricação.

9.1 DEFINIÇÃO CRITICIDADE (PIOR CASO POR AGRUPAMENTO DE PRODUTO / EQUIPAMENTO / UTENSÍLIOS / PISO)

A estratégia para a prevenção da contaminação microbiana na área industrial e nos produtos deve-se fazer uma investigação para determinar os principais vetores de microrganismos e pontos críticos do processo. É necessário verificar quais são os pontos vulneráveis dentro de todo o processo, definir ações corretivas e preventivas. É necessário incluir fornecedores de insumos e serviços, melhorias do layout da fábrica,

treinamento de todos os colaboradores, dando importância para técnicas de higiene e condução para as operações críticas.

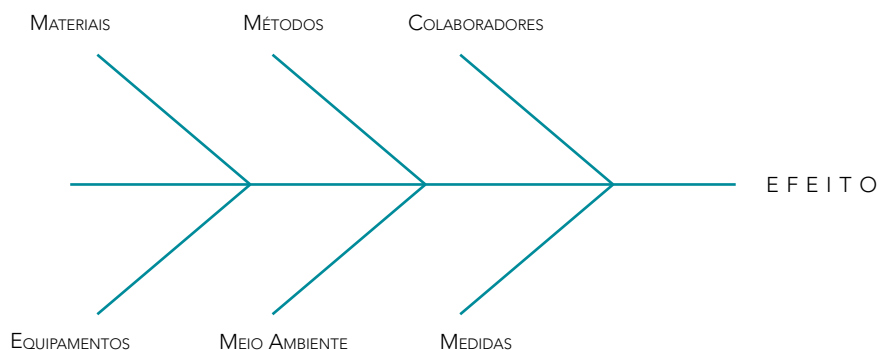
A análise de risco refere-se à probabilidade da ocorrência de determinada falha no processo e sua severidade, identificando potenciais perigos ou pontos críticos de falhas no processo.

Os pontos críticos relacionados a cada etapa do processo devem ser identificados utilizando as informações do produto, processo de fabricação e experiência da equipe.

Os riscos devem ser eliminados ou reduzidos a níveis aceitáveis para a segurança do produto. Para cada risco, a equipe deve listar os fatores responsáveis desde seu início até o agravamento e determinar as medidas preventivas a serem implementadas.

A identificação das causas de risco na qualidade de um produto tem como ferramenta o diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa) e Pareto.

Figura 08: Diagrama de Ishikawa



- **Método:** toda a causa envolvendo o método que estava sendo executado o trabalho;
- **Material:** toda causa que envolve o material que estava sendo utilizado no trabalho;
- **Mão-de-obra:** toda causa que envolve uma atitude do colaborador (ex: procedimento inadequado, pressa, imprudência, ato inseguro, etc.)
- **Máquina:** toda causa envolvendo a máquina que estava sendo operada;

- **Medida:** toda causa que envolve os instrumentos de medida, sua calibração, a efetividade de indicadores em mostrar as variações de resultado, se o acompanhamento está sendo realizado, se ocorre na frequência necessária, etc.
- **Meio ambiente:** toda causa que envolve o meio ambiente em si (poluição, calor, poeira, etc.) e, o ambiente de trabalho (layout, falta de espaço, dimensionamento inadequado dos equipamentos, etc.).

Após a identificação dos riscos, é possível priorizá-los por meio da avaliação da probabilidade, da severidade e do potencial de sua detecção, empregando a análise de modo e efeito de falha (*Failure Mode and Effects Analysis (FMEA)*). O resultado conduz ao maior entendimento do processo e desenvolvimento de estratégias de controle eficaz do risco.

A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (*Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)*) baseia-se em um sistema de segurança alimentar porém muitas indústrias de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos utilizam esta ferramenta pois consiste em analisar as diversas etapas de produção de um produto, verificando os perigos à saúde dos consumidores.

O primeiro passo é fundamental para o delineamento das ações a serem tomadas. Trata-se da coleta e análise de dados gerados pela auditoria da qualidade e pelas análises do controle microbiológico. Isto permite gerar uma ampla discussão sobre as possíveis causas dos resultados encontrados fora das especificações. Além disto, facilita à determinação do grau de atendimento das boas práticas. Os dados obtidos, sempre que possível, devem ser apresentados na forma de gráficos e tabelas para a visualização de possíveis tendências. Ou seja, em uma análise microbiológica da água purificada, durante trinta dias, é possível visualizar as tendências do sistema em relação a sua operacionalidade e a necessidade de manutenção durante este período.

Um outro exemplo é a determinação da carga microbiana contaminante de um ambiente, onde haja exposição dos insumos ou produtos ao ar. Os microrganismos, mesmo sendo retirados do ambiente diariamente, tornarão a contaminá-lo. Portanto, um ponto crítico importante é a qualificação do sistema de filtração do ar insuflado para o interior destes ambientes. A validação dos métodos de limpeza e sanitização, utilizados nas superfícies das áreas, dos equipamentos e utensílios, além do treinamento rigoroso do pessoal operacional, é da mesma forma exigível. O passo seguinte é a elaboração de um programa de controle dos pontos críticos de contaminação microbiana. Este programa deve contemplar o pessoal, produtos químicos de limpeza e desinfecção, local de trabalho, procedimentos operacionais, procedimento de amostragem e análise e demais fatores que influenciam na qualidade do produto final. Toda a informação obtida até aqui, servirá como base para os estudos de validação de limpeza e de processo. Estes estudos são uma exigência das boas práticas de fabricação e manipulação adotadas em todos os países, tendo por objetivo a comprovação documentada de que um processo ou método conduza de forma consistente e produtivo aos resultados esperados.

Tabela 19: Fatores de risco potencial e preventivos

Fator de Risco	Fator Preventivo
Pessoal de Produção	Procedimentos operacionais, Treinamentos, CQ
Matéria-Prima	Qualificação de fornecedores, Conservação, CQ
Embalagem primária	Qualificação de fornecedores, Conservação, CQ
Água de processo	Produção, Armazenagem, Distribuição, CQ, Validação do sistema
Ar comprimido	Produção, Distribuição, CQ, Validação do sistema
Ar Ambiente	Trocas com o ambiente, Filtração, CQ, Validação do sistema
Equipamentos	Qualificação dos desenhos e materiais sanitários, QI, QO
Utensílios de produção	Desenhos e materiais sanitários
Utensílios de limpeza	Desenhos e materiais sanitários
Produtos de Limpeza	Produção, Aplicação, CQ, Validação dos métodos associados.

9.2 QUALIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS

9.2.1 Agentes de limpeza, sanitizantes e sua concentração

Agentes de limpeza são produtos químicos puros ou mistos (formulações) que têm a finalidade de remover as sujeiras e resíduos, antes da etapa de desinfecção. Os produtos químicos consistem de tensoativos, ácidos, bases, solventes, agentes de oxidação, entre outros.

Tabela 20: Principais produtos utilizados para a limpeza dos equipamentos de processamento e enchimento

Tipo de Agente	pH ativo	Limpeza Sobre	Exemplos
Água	ND	Sujeiras solúveis em água	<ul style="list-style-type: none"> • Água potável • Água desmineralizada • PW, WFI
Ácidos minerais moderados	0,2 a 5,5	<p>Limpeza pesada, a remoção de sais e incrustações</p> <p>Remoção de complexos metálicos, como os resultados de corrosão</p>	<p>Ácidos fortes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido clorídrico • Ácido sulfúrico • Ácido fosfórico <p>Ácidos fracos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido acético • Ácido cítrico
Agentes neutros	5,5 a 8,5	Material oleoso, sujeira particulada	Tensoativos neutros, incluindo os adjuvantes (álcool, glicóis, etc)
Agentes Alcalinos	8,5 a 12,5	Remoção de óleo, gordura, graxa, precipitados, filmes e biofilmes	<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de amônio • Fosfato de sódio • Carbonato de sódio
Alcalinos corrosivos	12,5 a 14	Remoção de gorduras, graxas e óleos pesados. Biofilmes de Bactérias <i>Gram negativas</i> , como o <i>Pseudomonas</i> sp (Alginatos)	<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de sódio • Hidróxido de potássio • Silicato de sódio

Tabela 21: Principais saneantes utilizados e suas características

Saneante	Ativos Antimicrobianos	Características de Uso
Clorados	Hipocloritos de Sódio, Cálcio	Excelente atividade microbicida. Melhor atividade em pH levemente ácido. A reatividade dos clorados é alta, apresentando elevada corrosividade, se não for adequadamente aplicadas. Soluções diluídas necessitam ser aplicadas imediatamente, pois o cloro é volátil.
Clorados	Cloroisocianuratos de Sódio, Cálcio	Cloroisocianuratos, também chamados de cloros orgânicos, possuem maior tempo de meia vida em solução. A estabilidade é um dos parâmetros mais importantes, pois permite trabalhar com baixas dosagens.
Peróxidos de hidrogênio	Soluções estabilizadas de peróxidos, geralmente com 35% de ativo	A estabilidade é reduzida na presença de luz. Há risco de explosão. Necessita de local adequado para armazenamento.
Peróxi-ácidos	Ácidos Peracéticos e Peroxiacéticos	Reação gera como subprodutos o ácido acético e água, que devem ser removidos por enxágue. Corrosividade moderada, principalmente com metais mais moles, como alumínio, ferro, cobre e aços galvanizados. Explosão pode ocorrer, dependendo da concentração e condições de armazenamento.
Alcoóis	Álcool isopropílico e etílico	Atividade antimicrobiana de média intensidade, apresenta a vantagem dos alcoóis serem voláteis e não apresentar resíduos.
Fenólicos	Fenóis e derivados clorados	Resíduos gerados necessitam ser removidos, e não é recomendado para a parte interior de reatores e envasadoras. Muito utilizado no passado, o uso foi reduzido por ser organoclorados, com elevada toxicidade e de difícil tratamento nos efluentes.
Tensoativos catiônicos	Compostos de quaternário de amônio	A principal característica do ativo é a sua elevada capacidade tensoativa, aliada à não corrosividade. O quaternário de amônio é susceptível à contaminação por bactérias do grupo das <i>Pseudomonas</i> , portanto o seu controle é imprescindível. O procedimento de remoção deve ser validado.

Tabela 22: Métodos físicos de sanitização utilizando água

Agente	Características
Linhas de Vapor	Excelente para remoção de resíduos, aliados à propriedade antimicrobiana. Como há resfriamento ao longo da tubulação, o controle da caldeira e do tempo de expurgo do vapor devem ser avaliados por procedimento validado. A linha deve ser resistente e adequada para receber o vapor.
Água quente (aprox. 80°C)	A perda de temperatura ao longo de seu escoamento através da linha deve ser avaliada. O método não se adequa à remoção de esporos e bactérias esporuladas. Pode causar condensamento de água, que se torna foco de contaminação.

Tabela 23: Classificação geral de antissépticos, desinfetantes e esporicidas

Grupo de Ativo	Classificação	Exemplos
Aldeídos	Esporicida	2% Glutaraldeído*
Alcoóis	Desinfetante de uso geral, antisséptico, agente antiviral	70% Álcool Isopropílico, 70% Álcool Etílico
Clorados	Esporicida	0.5% Hipoclorito de Sódio
Fenólicos	Desinfetante de uso geral	500 µg por g Clorocresol, 500 µg per g Cloroxilenol
Ozônio	Esporicida	8% Gas, em peso
Peróxido de hidrogênio	Esterilizante da fase vapor, esporicida na fase líquida, antisséptico	4 µg por g vapor de H ₂ O ₂ , 10%–25% solução, 3% em solução antisséptica
Biguanidas substituídas	Agente antisséptico	0.5% Gluconato de Clorhexidina
Ácido Peracético	Desinfetante de alto nível. Esporicida	0.2% Ácido Peracético
Óxido de Etileno	Esterilizante da Fase Vapor	600 µg por g Óxido de Etileno
Compostos de quaternário de amônio	Desinfetante de uso geral, antisséptico	200 µg por g Cloreto de Benzalconio
β - Propionolactona	Esporicida	100 µg por g β -Propionolactone

*Há restrições quanto ao uso do Glutaraldeído, pela ANVISA, como esterilizante de materiais críticos (Clínicos e Cirúrgicos), principalmente pela resistência apresentada às espécies resistentes de Micobactéria de crescimento rápido.

9.2.2 Frequência e tempo de contato

É de praxe a limpeza e sanitização serem realizadas entre lotes, produtos, e se for o caso, ao final do expediente. Uma limpeza e sanitização é recomendável no início de cada expediente.

Ambos os parâmetros: frequência e tempo de contato devem ser previamente analisados e validados, pois não há um protocolo definido, e cada instalação é única.

Recomenda-se o uso de análises de risco, como o HACCP, para detectar os pontos críticos do processo e como monitorá-los. O histórico e manutenção dos níveis de contaminação dentro dos parâmetros estabelecidos necessitam indicar a frequência e tempo necessários.

9.3 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE LIMPEZA E SANITIZAÇÃO

A validação de limpeza consiste em realizar um processo de limpeza que garanta a higienização (Limpeza e sanitização) do equipamento.

É importante estabelecer que não existe um único caminho para executar um processo de validação de limpeza, e que o ponto comum a ser buscado é a existência de critérios, parâmetros e metodologias que sejam cientificamente justificáveis e que demonstrem claramente que o procedimento de limpeza produz resultados que estão de acordo com as especificações pré-estabelecidas.

Para iniciar o estudo de validação de limpeza, inicia-se com a avaliação do próprio procedimento de limpeza e assim devemos verificar itens importantes para que se inicie a validação:

- a. Existência de procedimentos de limpeza escritos, aprovados e com seus respectivos registros de treinamento anexados. Somente os funcionários treinados podem executar o processo de limpeza.
- b. O procedimento deve detalhar os pontos críticos do equipamento e a maneira como cada ponto deste deve ser limpo.
- c. No caso de limpeza manual, é ideal que o procedimento detalhe os tempos, quantidade de solvente utilizado, tipo de solventes, tipo de detergente e os métodos empregados na limpeza, ou seja, quantas vezes uma determinada área deve ser esfregada, por quanto tempo e em que sentido. Isso é vital para que seja evitada a ocorrência de subjetivismos entre os operadores.
- d. O material utilizado na limpeza deve ser padronizado, o procedimento deve detalhar ou fazer referência à metodologia de preparação do detergente, estabelecendo sua concentração de uso. A concentração de uso do detergente e sua marca são imutáveis após a validação do

procedimento de limpeza, qualquer alteração nesses itens deve ser precedida de avaliação através do controle de mudança, antes que o procedimento seja aplicado na rotina.

- e. O procedimento deve definir por quanto tempo o equipamento pode permanecer sujo, antes que a limpeza seja executada, pois a efetividade de um procedimento de limpeza é inversamente proporcional ao tempo que o mesmo permanece sujo, pois aumenta consideravelmente sua dificuldade de limpeza. O tempo deve ser definido e o estudo de validação deverá sempre ser conduzido nesse prazo limite para assegurar que o procedimento é eficaz em seu pior caso.
- f. O procedimento deve definir por quanto tempo o equipamento pode permanecer limpo sem que uma nova limpeza tenha que ser executada.
- g. As validações deverão ser realizadas de acordo com o tipo de produto a ser limpo.

10 RESÍDUOS / DESCARTES DE MATERIAIS

10.1 PROCEDIMENTOS PARA DESCARTE DE MATERIAIS COM RISCO BIOLÓGICO

O descarte correto dos materiais contaminados não pode afetar diretamente a qualidade dos ensaios. Devem existir procedimentos para minimizar a possibilidade de contaminação dos materiais ou do ambiente de ensaio.

Contudo, esta é uma questão de boas práticas de laboratório e deve obedecer aos regulamentos ambientais ou de saúde e segurança.

Após o uso (cultura de microrganismos ou material em contato com microrganismos), o aparelho ou materiais e os seus conteúdos devem ser tratados para a destruição de microrganismos, antes da limpeza ou descarte qualquer que seja o microrganismo envolvido.

De acordo com a natureza dos materiais, desinfecção, esterilização ou a incineração de material descartável pode ser utilizado.

10.2 DESCONTAMINAÇÃO

Esterilização por calor seco - A esterilização por este processo deve ser a forno durante pelo menos 1h, a 170°C a 180°C. Pode-se utilizar qualquer outra combinação de tempo e temperatura, se eles forem validados. Os indicadores podem ser utilizados, a fim de garantir que foi conseguida a esterilização.

Esterilização por calor úmido - A esterilização por este processo deve ser de no mínimo 121°C por pelo menos 15 minutos, numa autoclave. Os indicadores podem ser utilizados, a fim de garantir que foi conseguida a esterilização.

Esterilização por filtração - esterilização por filtração pode ser realizada sob vácuo ou em condições pressurizadas. Use membranas estéreis e elementos de filtros com poros de diâmetro de 0,22 µg (alguns casos podem ser utilizados o de 0,45 µg). Esterilizar os diferentes componentes do aparelho de filtração, montado ou não, na autoclave durante 15 minutos a 121°C. A montagem asséptica deve ser efetuada numa câmara de microbiológica após a autoclavagem.

A incineração é um tratamento aplicando o processo de combustão controlada, em altas temperaturas, permitindo com isso a redução do volume e massa dos resíduos. Os resíduos são transformados em gases, calor e materiais inertes.

O laboratório de Microbiologia deve possuir um CADRI (Certificado de Movimentação de Resíduos de Interesse Ambiental) é um documento emitido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) que aprova o encaminhamento de resíduos de interesse ambiental a locais de reprocessamento, armazenamento, tratamento ou disposição final.

Os tipos de resíduos que exigem o CADRI encontram-se divididos em duas classes:

Resíduos Classe I - Perigosos - Apresentam risco à saúde pública ou ao ambiente, com características como inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade.

Resíduos Classe II A – Não Inertes - Podem ter propriedades como: biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água. Não se enquadram nas classificações de resíduos classe I - Perigosos ou de resíduos classe II B – Inertes.

10.3 IDENTIFICAÇÕES DAS ÁREAS COM RISCO MICROBIOLÓGICO

Classes Risco Biológico

Os agentes de risco biológicos humanos e animais são divididos em classes, de acordo com critérios de patogenicidade. Ver secção 2.2

10.4 DERRAMAMENTO DE MATERIAIS CONTAMINADOS

No caso de derrame de material infeccioso ou potencialmente infeccioso, utilizar o seguinte processo de limpeza:

1. Utilizar luvas e vestuário protetor, incluindo, se necessário, proteção para a face e os olhos.
 - Se necessário, isolar a área com identificação visual.
2. Para não deixar espalhar, cobrir o derrame com toalhas de papel e solução desinfetante. Deixar agir por no mínimo 15 minutos.
 - Colocar o material em saco autoclavável inclusive todo o material utilizado na limpeza e os EPI's descartáveis.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Encerrando esta nossa pequena viagem pela microbiologia do presente Guia: “Controle Microbiológico na Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos”, foram abordados os aspectos atuais da microbiologia, de forma prática e simples, com pinceladas do conhecimento e experiência dos autores, e fica ainda uma questão por ser desvendada: E agora? Para onde seguimos?

As técnicas microbiológicas evoluíram desde a época de Robert Koch, em 1884, que foi o pioneiro no cultivo de microrganismos. De lá para cá, a microbiologia tratada é ainda baseada no cultivo, contagem, isolamento e identificação. Esta forma de análise ainda está muito presente nos métodos atuais, normas e leis, nossos principais alicerces para definir metodologias e parâmetros microbiológicos a serem adotados ou seguidos.

Por outro lado, é inquestionável o avanço da ciência, especialmente na informatização e melhoramento dos equipamentos.

Até pouco tempo atrás, nem as placas de Petri eram descartáveis. Hoje, por questões de riscos à saúde, e principalmente para fazer melhor uso da mão-de-obra, as placas descartáveis vieram para ficar, e junto com elas, tubos, pipetas, alças, etc. As placas também se miniaturizaram e formas diferentes de pensar a microbiologia vêm surgindo muito rapidamente.

Métodos microbiológicos rápidos ou facilitados, totalmente automatizados ou semi-automatizados estão a cada dia mais próximos, factíveis e, financeiramente mais acessíveis fazendo uso do crescimento microbiano, ou de sua presença, análise genômica, resposta química ou físico-química, para citar alguns.

Acreditamos que nos próximos anos, os métodos microbiológicos já estejam modificados, de forma a atingir os maiores anseios dos cientistas e do próprio corpo técnico: repostas rápidas, confiáveis e eficazes sempre visando a segurança do consumidor.

12 GLOSSÁRIO

Ágar: Hidrocolóide extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas. Consistem de agarose e agarpectina e são usados como meio de cultura para o crescimento microbiológico (Bactérias e fungos).

Água desmineralizada: Água que tem todos os sais minerais removidos por um sistema de resinas de troca iônicas.

Amostragem: É a técnica para obter uma amostra (parte) de um lote de um produto.

Antisséptico: Substâncias e produtos destinados a higienização, desinfecção, ações com finalidade de destruir e inibir a multiplicação e proliferação de microrganismos patogênicos. Usualmente está associado com substâncias aplicadas na superfície da pele e mucosas.

Atividade da água: É a relação do vapor de pressão de um produto comparado ao vapor de pressão da água pura. Esta relação é utilizada para avaliar a susceptibilidade de uma matéria-prima ou produto à contaminação microbiológica.

Calibração: Conjunto de operações que estabelecem, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento (calibrador) ou sistema de medição e os valores representados por uma medida materializada ou um material de referência, ou os correspondentes das grandezas estabelecidas por padrões.

Cepa: Microrganismo puro, que dá origem a microrganismos similares.

Colônia: Crescimento visível, macroscópico, de microrganismo em meio de cultura sólido. Relacionado a Unidade Formadoras de Colônias (UFC).

Concentração Inibitória Mínima: Menor concentração de um ativo necessário para inibir o crescimento de um determinado microrganismo.

Conservante: Agente químico que previne o crescimento microbiológico.

Esporos: Microrganismos em estado dormente, adaptados a sobreviver em condições ambientais adversas.

Esterilização: Eliminação e destruição da vida microbiológica destes materiais. Para ser esterilizada é necessário que seja submetida ao calor durante um determinado tempo, destruindo todas as bactérias, seus esporos e fungos. Existem várias técnicas de esterilização, que apresentam vantagens e desvantagens; contudo, a técnica usada mais regularmente é a autoclavagem.

Gram-negativa: Bactéria que retém a cor vermelha depois de usar o procedimento de Coloração de Gram.

Gram-positiva: Bactéria que retém a cor violeta depois de usar o procedimento de Coloração de Gram.

Meio de Cultura: Nutriente contendo ágar líquido ou sólido que permite o crescimento de microrganismos.

Qualificação: Conjunto de ações realizadas para estabelecer evidências documentadas confiáveis de que um processo qualquer, é executado em conformidade com especificações pré-determinadas e com os requisitos da Qualidade.

Rastreabilidade: É um processo que permite a identificação e reprodução de todas as etapas da fabricação de um produto, apresentando todos os documentos referentes aos processos de fabricação, limpeza e análises estarem registrados, documentados e arquivados.

Swab: Zaragatoa para coletar microrganismos em uma superfície (bancadas e equipamentos) e transferi-los para uma placa onde será feita a análise microbiológica.

Validação: Ação conduzida para estabelecer e demonstrar que um processo, procedimento, instrumento, aparato ou equipamento/material conduz necessária e efetivamente ao objetivo requerido.

13 BIBLIOGRAFIA

- 01 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT **NBR ISO 21148:2008**. Cosméticos – Microbiologia - Instruções Gerais para Pesquisa Microbiológica. Primeira Edição: 14.01.2008. ABNT: Rio de Janeiro, RJ. 21 páginas.
- 02 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT **NBR ISO 21149:2008** - Cosméticos Microbiologia - Contagem e Detecção de Bactérias Mesófilas Aeróbicas. Primeira Edição: 30.06.2008. ABNT: Rio de Janeiro, RJ. 24 páginas.
- 03 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO 21150:2008** - Cosméticos Microbiologia- Detecção de *Esherichia coli*. Primeira Edição: 30.06.2008. ABNT: Rio de Janeiro, RJ. 15 páginas.
- 04 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT **NBR ISO 22717:2008** - Cosméticos Microbiologia - Detecção de *Pseudomonas aeruginosa*. Primeira Edição: 30.06.2008. ABNT: Rio de Janeiro, RJ. 13 páginas.
- 05 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT **NBR ISO 22718:2008** - Cosméticos Microbiologia - Detecção de *Staphylococcus aureus*. Primeira Edição: 30.06.2008. ABNT: Rio de Janeiro, RJ. 15 páginas.
- 06 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT **NBR ISO/IEC 17025:2005** – Requisitos Gerais para a Competência de laboratórios de ensaio e Calibração. Segunda Edição: 30.09.2005. ABNT: Rio de Janeiro, RJ. 31 páginas.
- 07 - ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Practices for Evaluating Inactivators of Antimicrobial Agents used in Disinfectant, Sanitizer, Antiseptic, or Preserved Products**. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 1998.
- 08 - BAIRD, R.M.; DEYNER, S.P. **Guide to Microbiological Control in. Pharmaceutical**. p. 251-291 New York: Ellis Horwood, 1990.
- 09 - BARATA, A. F. E. **Cosméticos: Arte e Ciência**. 1º ed. Lisboa: Lidel, 2002, 312 p. ISBN 9727571948.
- 10 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**, volume 1, 5º ed. Brasília, 2010.
- 11 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica**. 1º Edição, Brasília, 2013.

- 12 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Habilitação de Laboratórios Analíticos em Saúde Segundo os Requisitos da ISO/IEC17025 – Procedimentos Operacionais da REBLAS – Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública.** 2º ed. Brasília, 2002.
- 13 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N° 29, 01 de junho de 2012.** Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Brasília, 2012.
- 14 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N° 48, 25 de outubro de 2013.** Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, e dá outras providências. Brasília, 2013.
- 15 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N° 481, 23 de setembro de 1999.** Estabelece os Parâmetros de Controle Microbiológico para os Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfume. Brasília, 1999.
- 16 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N° 11, 16 de fevereiro de 2012.** Dispõe sobre o funcionamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos a Vigilância Sanitária e dá outras providências. Brasília, 2012.
- 17 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N° 12, 16 de fevereiro de 2012.** Dispõe sobre a Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS), 2012
- 18 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N° 176, de 21 de setembro de 2006.** Aprova o Regulamento Técnico “Contratação de terceirização para produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, 2006.
- 19 - BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica.** Módulo II. Brasília, 2004.
- 20 - BRASIL. **Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia.** Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde, Departamento de Vigilância Sanitária Epidemiológica. Editora MS, 3º Edição, Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- 21 - BRASIL. **Leis, Decretos, etc. Lei N° 12.305, 02 de agosto de 2010. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- 22 - COLIPA. EUROPEAN COSMETIC, TOILETRY AND PERFUMERY ASSOCIATION. **Guidelines for the Manufacturer of Cosmetics Products,** 1994.
- 23 - CTFA. THE PERSONAL CARE PRODUCTS COUNCIL **Microbiology Guidelines. The Cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association.** Washington, 2001.

- 24 - CTFA. THE PERSONAL CARE PRODUCTS COUNCIL. **Microbiology Guidelines. Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association.** Washington, 2007.
- 25 - CUNHA, O.A.A. **Água Desmineralizada para Indústria Cosmética.** Cosmetics & Toiletries, v.3, p 22-28, 1991.
- 26 - EUROPEAN. PHARMACOPOEIA. **Efficacy of Antimicrobial Preservation.** Vol. 01, 2008.
- 27 - FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; GERAD, J.; TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**, 10º Ed, Porto Alegre: Artmed, 2005.
- 28 - International Organization for Standardization **ISO 11930:2012** – Cosmetics Microbiology – Evaluation of The Antimicrobial Protection of a Cosmetic Product. First Edition: 2012. 03.06. 23 pages.
- 29 - International Organization for Standardization **ISO 22717:2007** – Cosmetics - Microbiology – Detection of Candida albicans. First Edition: 2007.07.15.
- 30 - International Organization for Standardization **ISO 29621:2010** – Cosmetics - Microbiology - Guidelines for the Risk Assessment and Identification of Microbiologically Low - Risk Products. First Edition: 2014.12.18. 10 pages.
- 31 - International Organization for Standardization **ISO/TS 11133-1:2000** - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. First Edition: 2009.01.13.
- 32 - International Organization for Standardization. **ISO 16212:2008** – Cosmetics – Microbiology - Enumeration of Yeast and Mould. First Edition: 2008.10.15. 21 pages.
- 33 - MATSUMURA, E.M.; MIERZWA, J.C. **Water conservation and reuse in poultry procession plant case study.** Resources Conservation & Recycling n.52, p835-842, 2008.
- 34 - MIERZWA, J.C. **Perspectivas tecnológicas para tratamento de água e Efluentes.** Revista da Fundação de Apoio a Tecnologia, n.3, p.34-37, 2005.
- 35 - MIERZWA, J.C.; HESPANHOL, I. **Água na Indústria: uso racional e reuso.** Oficina de textos, 144P. São Paulo, 2005.
- 36 - MISLIVEC, P. B.; BANDLER, R.; ALLEN, G. **Incidence of Fungi in Shared-use Cosmetics Available to the Public.** Journal of AOAC International. v.2, p. 430-436. 1993.

- 37 - NCCLS. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. United States, Pennsylvania, 2003. – Tradução autorizada disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 24/02/2014.
- 38 - NCCLS. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. United States, Pennsylvania, 2003. – Tradução autorizada disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 24/02/2014.
- 39 - NICOLÓSI, M. **Salas limpas e Ambientes Controlados integram-se ao controle de Contaminação na Indústria Alimentícia, controle de contaminação**. São Paulo, 2001.
- 40 - OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual de Segurança Biológica em Laboratório**. 3º ed. São Paulo, 2004.
- 41 - ORTH, D. S. **Preservative Efficacy Testing a Review of Various Methods and Their Reliability**. *Cosmetics & toiletries*, vol. 112, p. 59-62, 1997.
- 42 - RUIZ, L. R. **Manual Prático de Microbiologia Básica**. Editora Universidade de São Paulo (EDUSP), São Paulo, 2000.
- 43 - SCHNEIDER, R.P.; TSUTIYA, M.T. **Membranas filtrantes para o Tratamento de água, esgoto e água de reuso**. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, São Paulo, 2001.
- 44 - UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 35 NF 30. **Microbiological Examination of Nonsterile Products: microbial enumerations tests**. 35ºed. 2012.
- 45 - UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 37 NF 32. 37ºed. 2014.
- 46 - VARVARESOU, A. *et al.* **Self-preserving cosmetics**. *International Journal of Cosmetics Science*. v.31, p. 163-175. 2009.
- 47 - WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Cosmetologia de Harry**. Ediciones Diaz de Santos. Madrid, 1990.
- 48 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Laboratory Biosafety Manual**. Geneva, 2004. Disponível em <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/biosafety7.pdf>. Acesso em 08/07/2011.
- 49 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Good Practices for Pharmaceutical Microbiology Laboratories**. Geneva, 2011
- 50 - YABLONSKI, J. I.; MANCUSO, S. E. **Preservative Efficacy Testing: accelerating the process** *Cosmetics & Toiletries*. p. 51-60. 2007.

10
ANOS

ABDI
Agência Brasileira de
Desenvolvimento Industrial

ABIHPEC
Associação Brasileira da Indústria de
Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

SEBRAE