

Análises microbiológicas de protetor solar manipulado nas farmácias magistrais do município de Ipatinga/MG*

Sunscreen's microbiological test handling in magistral pharmacies from Ipatinga city/MG

Mônica Ferreira Marques¹ & Mary Lucy Moreira²

RESUMO – O constante desenvolvimento da indústria cosmética tem gerado a necessidade de realizar análises microbiológicas das matérias-primas utilizadas na produção industrial de cosméticos, bem como de produtos finais, com o propósito de se obter produtos de boa qualidade. Este estudo visou determinar os microorganismos predominantes em protetor solar em gel manipulado em Farmácias Magistrais de Ipatinga - MG. Foram submetidas às análises 13 amostras para a determinação da presença de bactérias, fungos e patógenos. *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram os patógenos isolados em 53,84% das amostras analisadas; 38,46% das amostras apresentaram carga bacteriana superior aos limites estabelecidos. Os resultados salientam a necessidade da adoção de normas de controle de qualidade e prevenção da contaminação durante a produção.

PALAVRAS-CHAVE – Cosméticos, farmácia magistral, patógenos.

SUMMARY – The increase and development of cosmetic industry shows the necessity to make microbiological analysis of raw material used in its production, as well as, in the final products, to get good quality products. This study aims to determine the predominant microorganisms in sun block gel manipulated at Magistral Pharmacies of Ipatinga-MG. Thirteen samples was analyzed to detect the presence of bacteria, fungi and pathogens. *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were the pathogens isolated with 53.84% of the analyzed samples, which 38.46% presented bacterial load superior as established limits. The results show the necessity of adoption quality control norms and prevention against the contamination during the production.

KEYWORDS – Cosmetic, magistral pharmacies, pathogens.

INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de produtos cosméticos vem crescendo em um ritmo muito maior que o da economia nacional. Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumarias e Cosméticos, nos últimos seis anos este setor apresentou um crescimento de 75%, contra 10% da economia brasileira. Diante desta situação, os próprios fabricantes vêm buscando uma qualidade cada vez maior, prova disso é que durante o processo de fabricação de cosméticos a exigência com o controle de contaminação é uma constante (VENERANDA²¹). Desta forma, foram vários determinantes para o crescimento das Farmácias Magistrais no Brasil. Um deles foi a preocupação feminina com a estética e a saúde; não tem muito tempo que as pessoas iam à praia e sequer pensavam em guarda sol. O conceito era o uso de bronzeador, e não de filtro solar, com o passar do tempo as mulheres foram se engajando nos cuidados com a pele, nas medidas antienvhecimento e cada vez mais preocupando com sua aparência pessoal (ZANCHET²³).

Com o crescente aumento de Farmácias de Manipulação, no Brasil, não há ainda um controle de qualidade efeti-

vo, apesar da preocupação do Ministério da Saúde - atestada na edição da Resolução n.º 33/00 (BRASIL⁶), com a qualidade, segurança e eficácia (TORRES & et al.¹⁹). A análise microbiana deve ser realizada, pois a qualidade microbiana é uma dentre as várias exigências relacionadas com os critérios de segurança a serem considerados em produtos cosméticos.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano buscando um objetivo exclusivo ou principal que é limpá-lo, perfumá-lo, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-lo, mantendo-os em bom estado (BRASIL⁷).

Os produtos cosméticos devem ser produzidos, armazenados, transportados e distribuídos de forma segura, e devem atender à Resolução n.º 481/99 que define os limites permitidos de carga microbiana para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (BRASIL⁵). A presença de água e componentes orgânicos na formulação favorece o crescimento de microrganismo. Em alguns casos estes afetam a estrutura dos agentes conservantes influenciando na estabilidade do produto, o que justifica a avaliação mi-

Aceite em 28/5/2009

*Trabalho realizado no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais

¹Farmacêutica graduada pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais

²Mestre em Ciências da Saúde, Docente do curso de Farmácia pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais

crobiológica do produto. Com o desenvolvimento das Boas Práticas de Manipulação (BPM), a qualidade microbiológica de um cosmético não deve depender exclusivamente do seu sistema conservante, entretanto, como não se pode prescindir de seu uso, a escolha dos conservantes deve ser adequada para que sejam efetivos. Além disso, deve se considerar que conservantes podem ser inativados, total ou parcialmente, deixando o produto sem proteção esperada (ANVISA¹).

Dentre os vários problemas encontrados na produção de cosméticos pode-se destacar a contaminação microbiológica como um dos principais agentes que podem inviabilizar a produção e comercialização de uma gama de produtos. Para a obtenção de um cosmético de boa qualidade microbiológica torna-se necessário não só a ausência de microrganismo patogênico, mas também a garantia que a carga microbiana não patogênica seja a menor possível e que as concentrações dos agentes estejam dentro das concentrações legalmente permitidas (SILVA & NETTO¹⁷).

Para atingir bom nível de qualidade microbiana nos produtos farmacêuticos são fundamentais que se conheçam as fontes e os mecanismos responsáveis por essa contaminação (PINTO & *et al.*¹⁴). Entre eles, os mais comuns são: água, ar ambiente, almoxarifado, matéria-prima, equipamentos e principalmente o manipulador.

Segundo REBELLO¹⁵, a água é a principal matéria-prima da Indústria Cosmética. Portanto, é importante controlar a qualidade da água do processo, seja do ponto de vista químico e, principalmente quanto a qualidade microbiológica. No sistema de armazenamento e distribuição da água, deve se verificar a presença de biofilme, que é resultado do transporte de microrganismo viáveis a uma superfície e subsequente adesão destes na mesma (VENERANDA²¹).

O controle microbiológico da água deve ser tanto de aspecto quantitativo (carga total microbiana), como de aspecto qualitativo (determinação das espécies contaminantes). As amostras da água para análises microbiológicas devem ser tomadas nos pontos críticos de modo que possam dar ao analista informações precisas do sistema por inteiro (SILVA & NETTO¹⁷). A tolerância máxima de microrganismos totais aeróbios para a água de processo é de 100UFC/g e deve haver ausência de *Pseudomonas aeruginosa* e coliformes totais e fecais em 100 ml (CARTURAN⁸).

O ar, como é um dos parâmetros que interferem na boa qualidade de fabricação, deve ser submetido a um rígido controle microbiológico de acordo com Resolução n.º 176/00 (BRASIL³) que estabelece padrões de referências de qualidade do ar interior, em ambientes de uso público e coletivo, climatizado artificialmente. Também é certo que as considerações da publicação dessa resolução, priorizam a saúde, a segurança, o bem estar e o conforto dos usuários de ambientes climatizados. Ambientes não climatizados, mas que, de alguma forma, possam interferir na qualidade microbiológica dos produtos fabricados, devem ser controlados a partir de um programa de controle (REBELLO¹⁶).

As condições adequadas de estocagem estão entre outros fatores diretamente ligados a qualidades do produto acabado, é fundamental que no local de estocagem das matérias e matérias-primas sejam mantidos controles, incluindo combates a roedores e insetos. O emprego de saco de polietileno, pallets ou recipientes com tampa, constitui-se um recurso que minimiza, mas não impede de forma absoluta a contaminação do material. A embalagem desig-

nada de primária é aquela que entra em contato direto com o produto e que deve ser considerada dentre os elementos importantes no controle de contaminação. No caso de frascos destinados a acondicionamento de produtos não estéreis, a remoção de resíduos eventualmente contidos em seu interior por processo de lavagem leva a ponderação quanto à qualidade da água empregada, e a condição de secagem de forma a não privilegiar o desenvolvimento microbiano (PINTO & *et al.*¹⁴).

Todos os funcionários da Farmácia devem conhecer os princípios básicos das Boas Práticas de Fabricação, receber treinamento inicial e contínuo, inclusive instruções de higiene de acordo com a necessidade. Todos devem ser motivados a apoiar a empresa na manutenção dos padrões de qualidade, visando uma maior qualidade de fabricação (PINTO & *et al.*¹⁴). Os indivíduos carregam consigo um grande número de microrganismo, que normalmente passam despercebidos sem causar nenhum transtorno para seu hospedeiro. Na pele, a microbiota concentra-se em torno de 10⁴ a 10⁶ UFC/cm³, variando de acordo com o local analisado (TRABULSI²⁰).

Os contaminantes transportados pelos indivíduos são micrococcos não patogênicos e difteróides, mas também podem se constituir de *Staphylococcus aureus* como parte da microbiota normal. Outros ainda, como a *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, embora não constituintes da microbiota residente, podem estar transitoriamente a ela associada, na dependência dos hábitos de higiene dos operadores (PINTO & *et al.*¹⁴).

Segundo a Portaria n.º 348/97 (BRASIL⁴) na fabricação, as diferentes atividades devem ser organizadas de maneira a prevenir riscos de água parada, pó na atmosfera, presença de insetos ou roedores. Os equipamentos de enchimento, acondicionamento e embalagem devem ser limpos e desinfetados de acordo com seu desenho e uso. Não deve apresentar riscos de contaminação nem danos para os produtos e nem para os trabalhadores, devem estar localizados levando em conta o fluxo e ser limpo de acordo com processos definidos. Devem ser mantidos em boas condições de operação de acordo com programas pré-estabelecidos por departamentos competentes da empresa, ou por um contrato de manutenção. Para todos os equipamentos de pesagem e instrumentos de medição deve ser realizada uma calibração periódica e deve existir um registro de todas as operações de manutenção efetuadas nos equipamentos.

Os contaminantes microbianos presentes na matéria-prima serão invariavelmente transferidos ao produto, acrescido daqueles provenientes de equipamentos e ambientes produtivos, dos operadores envolvidos e das matérias de embalagem (SILVA & NETTO¹⁷).

De acordo com a Portaria n.º 348/97 (BRASIL⁴), as matérias-primas devem ser guardadas em condições apropriadas à sua natureza, de forma a garantir uma identificação eficiente, como também uma correta rotatividade. Deve existir um sistema que evite o uso de material reprovado, bem como do material que não tenha sido analisado.

Em relação às matérias-primas, recomenda-se adotar limites de tolerância, considerando que o grau de contaminação depende da sua natureza química, processamento, susceptibilidade, etc. Matérias-primas de origem natural, como gomas, açúcares, gelatina, hormônios, talco, sílica e

proteínas apresentam alta susceptibilidade de contaminação podendo acarretar problemas nos produtos acabados. O tipo e a carga de contaminantes presentes e as condições de processamento durante a obtenção destes insumos estão relacionados com o seu grau de contaminação. Por outro lado, matérias-primas sintéticas raramente apresentam contaminação acima dos limites recomendados, devido ao uso de altas temperaturas, solventes orgânicos, extremos valores de pH ou outras condições desfavoráveis à proliferação microbiana durante o processo de síntese (CARTURAN⁸; PINTO & et al.¹⁴).

Limites microbianos em cosméticos

De acordo com a Resolução n.º 79/00 (BRASIL⁷), o risco de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes podem ser classificados em dois tipos. O tipo I são aqueles que apresentam, na composição, substâncias com indicações específicas bem como informações e cuidados ao modo de uso, são classificados em: Formulações de uso infantil, sendo todos com formulações especiais para crianças, para a área dos olhos e para aqueles que estão em contato com a mucosa. O tipo II são aqueles que contêm substâncias que não apresentam ação danosa sobre o organismo humano e cuja formulação e uso implicam riscos mínimos a saúde do consumidor, corresponde ao restante dos produtos sendo xampu, condicionadores, hidratantes corporais, protetores solares, os quais somente são indicados para uso em adulto.

Para estes produtos foi estabelecido na Resolução n.º 481/99 (BRASIL⁵), os limites aceitáveis de contaminação em cosméticos:

- Tipo I - produtos para área dos olhos, de uso infantil ou que entram em contato com mucosas: Mesófilos: < 10² UFC/g ou ml; limite máximo: 5x10² UFC/g ou ml.

- Tipo II – demais produtos cosméticos susceptíveis a contaminação microbiológica: Mesófilos: < 10³UFC/g ou ml; limite máximo: 5x10³ UFC/g ou ml.

Todos os produtos devem apresentar ausência de patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp) em uma grama ou mililitro do produto final.

Diante de todos os fatores, a análise microbiológica é de extrema importância, pois assegura a estabilidade do produto e diminui os riscos ao consumidor. No presente trabalho foi realizada análise microbiológica de protetor solar em gel, manipulados em Farmácias Magistrais de Ipatinga - MG, a fim de obter um resultado sobre a qualidade dos produtos manipulados, que são adquiridos pelo consumidor.

OBJETIVOS

Analisar amostras de protetores solares manipulados em farmácias magistrais no município de Ipatinga, identificando microrganismos patogênicos de acordo com os indicadores (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp) através de análises microbiológicas de acordo com os padrões de qualidade exigidos pela ANVISA.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa realizada foi de caráter experimental e bibliográfico. As amostras foram analisadas no laboratório de

Microbiologia do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UNILESTE-MG).

Todos os materiais utilizados para o processamento das amostras foram esterilizados em autoclave, a uma temperatura de 121°C/1atm por 15min. A capela, onde as análises microbiológicas foram realizadas, foi previamente desinfetada de acordo com procedimentos padrões, por meio de agente químico. Antes da abertura e remoção das amostras, as superfícies das embalagens foram desinfetadas com uma mistura aquosa de etanol a 70% (v/v) e HCl 1% (v/v) utilizado para tal uma gaze estéril.

A amostra foi diluída utilizando uma quantidade comprada nas farmácias (10g) que foi asepticamente removida e adicionada em 90 ml de solução salina peptonada e tamponada, previamente autoclavada à 121°C/1atm por 15min. Com isto, foi obtida a diluição 10⁻¹. Em seguida foi realizada a neutralização dos agentes antimicrobianos presentes nos produtos, (metilparabeno e propilparabeno) que de acordo com GELLI & REBELLO¹⁰ utiliza-se uma associação de polissorbato 80 a 3% e lecitina a 0,3% (2 ml). Após a neutralização foi acrescentada pérola de vidro para otimizar a homogeneização e em seguida foi medido o pH, que deveria estar em torno da neutralidade. Para a preparação das diluições subsequentes (10⁻², 10⁻³), foi retirado 1,0 ml da solução procedente e adicionada à 9,0ml de diluente.

Foi pipetado uma alíquota de 1,0ml de cada diluição (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³) da amostra em placas de Petri estéreis em duplicata. Foram vertidos 20ml de ágar caseína-soja estéril (fundido e resfriado até uma temperatura de aproximadamente 45°C). A mistura então foi homogeneizada suavemente por movimentos em forma de “8”. Após a solidificação do ágar, a placa foi incubada em estufa a 35°C por 72h.

Foi pipetado uma alíquota de 1,0ml de cada diluição (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³) da amostra em placas de Petri estéreis em duplicata. Foram vertidos 20ml de ágar Sabouraud estéril (fundido e resfriado até uma temperatura de aproximadamente 45°C). A mistura então foi homogeneizada suavemente por movimentos em forma de “8”. Após a solidificação do ágar, a placa foi incubada na posição invertida em estufa a 20°C por 120h (PINTO & et al.¹⁴).

Este meio permite o crescimento de bactérias de fácil e difícil crescimento, ou bactérias fastidiosas, as quais exigem nutrientes específicos como, por exemplo, vitaminas. De cada amostra foram retiradas alíquotas de 10ml da diluição 10⁻¹ os quais serão adicionados a 90ml de caldo caseína-soja e da mesma forma em 90ml de caldo lactosado. Após homogeneização os inóculos foram incubados à 35°C por 24h (PINTO & et al.¹⁴).

Após 24h de crescimento no caldo caseína-soja, o material enriquecido foi transferido com alça bacteriológica, usando o método de estrias em superfície para placas contendo ágar Hipertônico Manita, Cetrimida e Ágar SS (Agar *Salmonella shigella*). Da mesma forma, após 24h de crescimento no caldo lactosado, o material foi semeado em Ágar MacConkey. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 35°C por 48h, quando foi feita a verificação do crescimento de colônias suspeitas dos microrganismos sob investigação: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli* (PINTO & et al.¹⁴).

O controle foi feito com um produto estéril para assegurar a confiabilidade dos ensaios. O produto estéril utili-

zado foi a água para injeção. Uma alíquota de 1ml de água estéril foi transferida para 9ml da solução obtendo uma diluição 10^{-1} . Foi pipetado 1ml da diluição 10^{-1} para a placa de Petri e em seguida verteu-se 20ml de Ágar Sabouraud-dextrose. Após homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas de forma invertida na estufa a 35°C por até 48h (PINTO & *et al.*¹⁴).

Diante da presença de antimicrobianos adicionados nas formulações durante o processo da análise, foi realizada a neutralização da amostra e paralelamente, a validação do método. Todos os procedimentos para inativação do sistema conservante devem ser validados, pois a amostra diluída não pode inibir a multiplicação dos microrganismos eventualmente presentes, principalmente, quando da utilização da técnica de contagem por semeadura em profundidade (CARTURAM⁸).

Para a validação citada anteriormente, colônias isoladas de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC (*American Type Culture Collection* 25285) e *Pseudomonas aeruginosa* (colônias típicas isoladas) foram crescidas durante 12h em caldo BHI a 37°C para realização do teste. As culturas foram diluídas em tubos de ensaio com 5ml de solução salina isotônica. A concentração bacteriana foi ajustada de acordo com a solução 0,5 da escala de MacFarland (corresponde aproximadamente 10^8 UFC/ml) e a partir desta, fez-se diluições seriadas até uma diluição de 10^{-3} .

Foram preparadas três soluções:

- a primeira continha amostra, neutralizante (polissorbato 80 a 3%, lecitina a 0,3%) e o diluente;
- a segunda amostra foi preparada da mesma forma que a primeira menos a adição do neutralizante, e
- a última contendo apenas solução salina.

Cada solução preparada foi dividida em 2 tubos de ensaio contendo 9ml cada. Em um dos tubos, foi adicionado 1ml da solução 10^{-3} contendo *Staphylococcus aureus* e no outro tubo *Pseudomonas aeruginosa* o que levou ambas as soluções à diluição 10^{-2} . Em seguida foi pipetado 1ml de cada tubo e colocado em placas de Petri estéril identificadas. Foi vertido 20ml de ágar caseína-soja (em cada placa) estéril e resfriada até temperatura de 45°C, homogeneizando em movimentos em “8” sobre a bancada de trabalho, até a solidificação do meio. Em seguida foram incubadas a 37°C por 24h.

Para todos os testes confirmatórios, foram feitos um controle positivo para a validação do teste utilizando colônias ATCC de cada patógeno encontrado para fins de comparação. Nas placas onde foram encontradas colônias, foi realizada sua identificação e os testes para confirmação dos patógenos pesquisados.

Staphylococcus aureus

Identificação das colônias: as colônias típicas de *Staphylococcus aureus* apresentam-se de cor amarela, halo amarelo.

Teste da coagulase: da placa onde houve crescimento, foi retirada uma colônia suspeita de *Staphylococcus aureus* e foi inoculada em caldo BHI (35°C/24h). Com uma alça bacteriológica, foi transferida uma quantidade representativa da mesma para um tubo contendo 0,35ml de plasma citrato. Foi incubado a 37°C, por 24h.

Teste da catalase: com auxílio de uma alça bacteriológica, foi retirada uma pequena porção de uma colônia e foi feito um esfregaço em uma lâmina e, em seguida, gotejou-se solução de água oxigenada.

Pseudomonas aeruginosa

Identificação de colônias típicas: as colônias de *Pseudomonas aeruginosa* são esverdeadas, com fluorescência.

Teste bioquímico: foi transferida uma colônia suspeita com o auxílio de uma alça bacteriológica para um tubo com o meio inclinado de ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) (coloração avermelhada na superfície e no fundo) foi semeado por estriamento e em seguida por picada profunda e incubou a 35°C por 48h).

Teste da oxidase: foi realizado o teste do citocromo-oxidase transferindo com uma agulha de níquel, colônias suspeitas para uma tira impregnada com reativo (comercial pronto para o uso).

Salmonella spp.

Identificação de colônias típicas: as colônias típicas de *Salmonella* spp. são colônias transparentes com núcleo preto.

Teste bioquímico: foi transferida uma colônia suspeita com auxílio de uma alça bacteriológica para um tubo com o meio inclinado de ágar (TSI) (foi semeado por estriamento e em seguida por picada profunda, incubou-se a 35°C por 48h).

Escherichia coli

Identificação de colônias típicas: as colônias típicas de *Escherichia coli* são colônias vermelho tijolo à púrpura.

Teste bioquímico: foi transferida uma colônia com o auxílio de uma alça bacteriológica para um tubo com o meio inclinado de ágar (TSI), foi semeado por estriamento e em seguida por picada profunda, incubou-se a 35°C por 48h.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante as análises foi realizada a validação do teste que incluiu a neutralização do conservante e o controle negativo em todos os ágares utilizados. Na análise foi necessário fazer a validação do método que, segundo NASCIMENTO¹³, a validação de métodos analíticos microbiológicos é ato documentado que comprova que o proposto pelo método corresponde à experimentação prática; desta forma a validação permitirá reduzir significativamente a incidência de falsos negativo ou positivo nas respostas dos ensaios de controle microbiano.

Teste de Validação

De acordo com o gráfico 1, o resultado do método foi validado, pois se pode observar que a quantidade de colônias crescidas na amostra neutralizada foi aproximada da quantidade de colônias crescidas na solução salina, foi inoculado a mesma quantidade de bactérias, comprovando que a neutralização foi eficaz e a quantidade de colônias de bac-

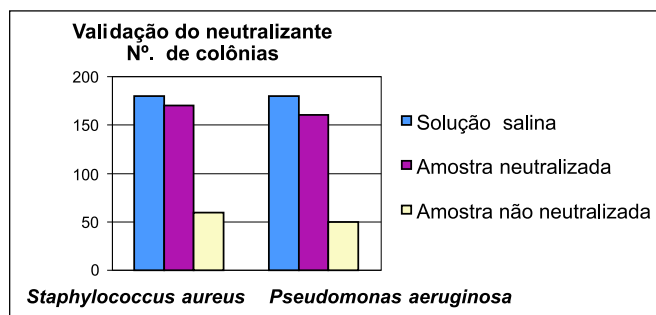


GRÁFICO 1 - Efeito da neutralização do conservante sobre o crescimento de bactérias patogênicas.

térias da amostra não neutralizada foi inferior, devido à ação do conservante adicionado na amostra. Diante disso, a neutralização foi eficaz eliminado assim, as interferências do conservante na amostra.

Análise quantitativa

Na Tabela I estão apresentados os resultados das análises microbiológicas de protetores solares manipulados nas 13 farmácias diferentes. Esta tabela mostra os resultados quantitativos para bactérias, onde 5 amostras (38,46%) exibiram carga bacteriana superior aos limites estabelecidos pela Resolução n.º 481. Estes resultados referem-se às amostras 4, 7, 9, 10 e 11.

TABELA I
Determinação do número de bactérias e fungos nas amostras de protetor solar

Amostra	Bactérias aeróbias (UFC/g)	Fungos (UFC/g)
1	—	—
2	<10	<10
3	<10	<10
4	$6,3 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3$
5	$2,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
6	$1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
7	$5,7 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$
8	$4,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$
9	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$
10	$5,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$
11	$4,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$
12	$3,5 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
13	$3,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$

Considerando apenas a carga bacteriana, no resultado obtido por SOUZA & et al.¹⁸, 29,3% das amostras analisadas estavam fora dos limites estabelecidos e de acordo com TORRES & et al.¹⁹, este resultado foi de 14,6%.

No presente trabalho, 38,46% das amostras analisadas estão fora do padrão vigente, discordando dos resultados obtidos por TORRES & et al.¹⁹ e concordando com o encontrado por SOUZA & et al.¹⁸, levando sempre em consideração o diferente número de amostras analisadas, já que esses utilizaram 48 e 117 amostras respectivamente, enquanto que nas análises realizadas foram utilizadas 13 amostras.

Nas análises realizadas apenas uma das amostras apresentou crescimento significativo de fungos, resultado este semelhante ao obtido por SOUZA & et al.¹⁸, que encontrou uma amostra nas 114 analisadas com contagem superior ao limite estabelecido e de acordo com TORRES & et al.¹⁹, onde não foi encontrada nenhuma amostra (em 48 analisadas) contaminada por fungo. Nos Estados Unidos o resultado obtido foi apenas 0,4% de contaminação por bolores de 223 amostras de produtos cosméticos (WOLVEN & LEVENSTEIN²²).

De acordo com TORRES & et al.¹⁹, a baixa frequência de fungos, provavelmente pode ser devido à presença de parabens usados como conservante na maioria dos cosméticos. Os parabens são particularmente ativos contra

bolores e leveduras (TORRES & et al.¹⁹). Portanto, a preocupação com essa contaminação é mais relevante para os produtores em razão de ser facilmente detectada e, conseqüentemente, provocar perdas, tanto nas vendas, quanto na credibilidade do fabricante (SOUZA & et al.¹⁸).

Análise qualitativa

^{1,2,3}A placa onde se identificou o crescimento de bactérias foi submetida a testes confirmatórios, (pesquisa de *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp.). ⁴As placas, onde as colônias fermentaram manitol, foram submetidas a testes confirmatórios (pesquisa de *Staphylococcus aureus*).

Na Tabela II estão apresentados os resultados de acordo com o crescimento de bactérias nos ágar seletivos utilizados. Este crescimento não confirma os patógenos pesquisados devendo assim, selecionar as placas onde houve crescimento e submete-las a testes confirmatórios descritos anteriormente na metodologia.

TABELA II
Determinação de crescimento ou não de bactérias nos ágar seletivos

Amostra	Ágar SS	Ágar Cetrimida	Ágar MacConkey	Ágar hipertônico-manita
1	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
2	Negativo	Positivo ²	Negativo	Positivo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
4	Positivo ¹	Negativo	Negativo	Positivo ⁴
5	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo ⁴
8	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo ⁴
10	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
11	Negativo	Negativo	Positivo ³	Positivo ⁴
12	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

Na amostra 2 foi identificada presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na amostra 4 foi identificada a presença de *Staphylococcus aureus* e foi confirmada a ausência de *Salmonella* spp. Na amostra 6, 7, 9 e 10 foi identificada a presença *Staphylococcus aureus*. Na amostra 11 foi identificada a presença de *Staphylococcus aureus* e foi confirmada a ausência de *Escherichia coli*.

Na Tabela III estão apresentados os resultados encontrados nas placas submetidas aos testes confirmatórios. As amostras 2, 4, 6, 7, 9, 10 e 11 estavam contaminadas por *Staphylococcus aureus*, correspondendo a 53,84% das amostras analisadas das quais 7,69% estavam contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa*, correspondendo a amostra 2. Foi confirmada a ausência de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Em outros estudos pôde-se observar a diferença dos resultados em relação ao presente trabalho; segundo TORRES & et al.¹⁹, três das 48 amostras analisadas apresen-

TABELA III
Identificação de contaminantes microbianos nos ágar seletivos

Amostra	Ágar SS	Ágar Cetrimida	Ágar MacConkey	Ágar hipertônico-manita
1	---	---	---	---
2	---	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	---	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	---	---	---	---
4	---	---	---	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	---	---	---	---
6	Negativo	---	---	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	---	---	---	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	---	---	---	---
9	---	---	---	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	---	---	---	<i>Staphylococcus aureus</i>
11	---	---	Negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
12	---	---	---	---
13	---	---	---	---

taram contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* e em apenas uma amostra foi detectada *Staphylococcus aureus*, enquanto que SOUZA & *et al.*¹⁸ obteve duas amostras contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa* e duas amostras por *Staphylococcus aureus* em relação às 117 amostras analisadas. Os resultados encontrados no presente estudo não foram divergentes aos citados anteriormente, mas deve-se sempre ter em mente a diferença da quantidade da amostra analisada e do controle de qualidade adotado por cada farmácia. Dessa forma é possível atestar a relevância do resultado encontrado, já que em tão pequeno número de amostras a quantidade de contaminação foi próxima das análises realizadas por outros pesquisadores que utilizaram quantidade maior de amostras, levando em conta que foi coletada uma amostra em cada farmácia de manipulação de Ipatinga (13 farmácias). A provável fonte de contaminação das amostras por *Pseudomonas aeruginosa* segundo FAVERO & *et al.*⁹ é a água, onde essa bactéria cresce relativamente bem em água destilada, tendo sido observado um aumento da sua população a 25°C, de $4,3 \times 10^3$ para $1,1 \times 10^6$ UFC/ml após 24h.

O risco da presença de *Pseudomonas aeruginosa* está claro na literatura segundo MURRAY & *et al.*¹²: a sua presença em contato com os olhos lesionados pode levar à ulceração da córnea, podendo progredir para uma doença capaz de ameaçar a visão. Existem relatos nos Estados Unidos de infecções oculares decorrentes deste patógeno oriundos de cosméticos e que levaram os usuários à cegueira (KALLINS & *et al.*¹¹).

Segundo MURRAY & *et al.*¹², a contaminação por *Staphylococcus aureus* pode levar a diversas doenças, entre elas a foliculite, que vem a ser uma infecção pirogênica dos folículos pilosos, onde a base do folículo se apresenta elevada e avermelhada e se observa uma pequena coleção de pus sob a superfície da epiderme; quando ocorre nas pálpebras, recebe o nome de terçol. Essa e outras infecções

são relevantes por se tratar de utilização de produtos contaminados com *Staphylococcus aureus* destinados ao uso tópico.

As amostras reprovadas foram 2, 4, 6, 7, 9, 10 e 11. As amostras 4, 7, 9, 10 e 11 ultrapassaram os limites de bactérias aeróbias. A amostra 2 detectou a presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A 4 ultrapassou os limites estabelecidos de fungos e detectou-se a presença de *Staphylococcus aureus*. Já nas amostras 6, 7, 9, 10 e 11 foi detectada *Staphylococcus aureus*.

Na Tabela IV estão apresentados os resultados das amostras analisadas onde 53,84% das amostras foram reprovadas (2, 4, 6, 7, 9, 10 e 11). Os dados obtidos no trabalho realizado não podem atestar sobre a qualidade da farmácia onde o produto foi manipulado devido à baixa representatividade da amostragem, mas deve-se considerar que os patógenos primários proibidos para o tipo de produto foram encontrados nas amostras analisadas.

TABELA IV
Apresentação da qualidade das amostras em relação aos quesitos quantitativo e qualitativo

Amostra	Bactérias aeróbias	Fungos UFC/g	Contaminante Bacteriano	Aprovada/Reprovada
1	---	---	---	Aprovada
2	<10	$1,0 \times 10^1$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Reprovada
3	<10	<10	---	Aprovada
4	$6,3 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Reprovada
5	$2,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	---	Aprovada
6	$1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Reprovada
7	$5,7 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Reprovada
8	$4,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	---	Aprovada
9	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Reprovada
10	$5,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Reprovada
11	$4,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	<i>Staphylococcus aureus</i>	Reprovada
12	$3,5 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	---	Aprovada
13	$3,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	---	Aprovada

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados, 53,84% das amostras foram reprovadas em algum quesito, evidenciando uma taxa de contaminação significativa, levando em consideração a pequena quantidade de amostra analisada. A presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras analisadas, possivelmente pode ter sido transmitida através dos manipuladores e que segundo MURRAY & *et al.*¹², 15% dos adultos normais sadios são portadores persistentes de *Staphylococcus aureus* na nasofaringe e que esta bactéria faz parte da microbiota normal.

Essa contaminação ocorreu, provavelmente, em razão pelo descumprimento das Boas Práticas de Manipulação (BPM) e à falta de qualidade sanitária. Desta forma, a adoção da lavagem correta das mãos e uso adequados de luvas serve para minimizar a possibilidade de contaminação por parte dos manipuladores.

A contaminação pode ter sido transmitida também por falhas na manutenção do sistema de purificação da água (devido à presença de *Pseudomonas aeruginosa* em uma das amostras) e pela suspeita de precariedade na higiene realizada por parte dos manipuladores por *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos aeróbios mesófilos e levar em conta a infraestrutura debilitada e a não utilização das Boas Práticas de Manipulações (BPM) como possíveis causas de contaminação.

Portanto, acredita-se que os dados encontrados sirvam de alerta e orientação para as farmácias, devendo adotar-se as Boas Práticas de Manipulação (BPM), fazer um rastreamento das possíveis fontes de contaminação (e a partir destas traçar um plano de correção) e utilizar um sistema conservante eficaz, assegurando assim, a estabilidade microbiológica de produtos cosméticos e a segurança do consumidor durante o uso do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA, Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1ª. ed. v. 1. Brasília: ANVISA, maio 2004. 52 p. Disponível em: http://www.crq4.org.br/downloads/guia_cosme.pdf. Acessado em: 12 de Maio de 2006.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução nº. 210, de 04 de agosto de 2003, Boas Práticas para Fabricação e Controle de Produtos Farmacêuticos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=17559&word=> Acesso em 10 de maio de 2006.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução, nº. 176, de 24 de outubro de 2000. Determina a publicação de orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor, sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 29 de outubro de 2000.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 348, de 18 de agosto de 1997. Determina a todos estabelecimentos produtores de produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, o cumprimento das Diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico – Manual de Boas Práticas de Fabricação para produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e perfumes. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=7315&word=>. Acesso em: 06 de maio de 2006.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº. 481, de 23 de setembro de 1999. Define os limites permitidos de carga microbiana para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=259&word=>. Acesso em 04 de maio de 2006.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº. 33, de 19 de abril de 2000. Determina requisitos técnicos mínimos para o funcionamento das farmácias magistrais, incluindo a manipulação, fracionamento, recebimento, controle e armazenagem de matérias primas e controle do medicamento entregue ao paciente. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1667&word=>. Acesso em 04 de maio de 2006.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000a. Estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal cosmético e perfumes e outros com abrangências neste contexto. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18300&word=> Acesso em: 10 de maio de 2005.
8. .CARTURAN, Gustavo Fernando (coord.) *Guia ABC de Microbiologia: controle microbiológico na indústria de produtos de higiene pessoal cosmético e perfumes. Parâmetros, Metodologia Analítica e Orientações*. 2a ed. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1999.78p.
9. FAVERO, M.S. & et al. *Pseudomonas aeruginosa* growth in distilled water from hospitals. *Science*, New York, v. 173 p. 836-838, 1971.
10. GELLI, D.S. & REBELLO, T.F.S. Laboratório de Microbiologia: Método de Análise. *Cosmetics & Toiletries*. São Paulo: v.02, nº. 4, jul/ago 1990 p. 55.
11. KALLINGS, L.O. & et al. Microbiological contamination of medical preparations. *Acta Pharm Suee*. v. 3. 1966. 219-228 p, *apud in* TORRES, Leda Maria Sapateiro & SERAFINI, Álvaro Bisol. Qualidade sanitária e riscos associados ao uso de emulsões cosméticas para aplicação dérmica, manufaturas nas farmácias de manipulação do Município de Goiânia, GO, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, v. 32, nº 2, 2003. p. 193-203.
12. MURRAY, P.R. & et al. *Microbiologia Medica*. 4ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A., 2006.p.193
13. NASCIMENTO, A. *Validação de Métodos Microbiológicos: Etapas e Legislação Controle da contaminação*. São Paulo, ano 7, nº 74, junho 2005. p. 28-29.
14. PINTO, T.J.A. & KANEKO, T.M. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.
15. REBELLO, T.F.S. Boas Práticas. Água. *Cosmetics & Toiletries*. São Paulo, v. 13 n. 3, maio/jun 2001. p. 24a.
16. REBELLO, T.F.S. Boas Práticas. Qualidade do ar Ambiente. *Cosmetics & Toiletries*. São Paulo: v. 13, n. 3, jan/fev 2001. p. 24b.
17. SILVA, C.H.P. de M. & NETTO, H. Contaminação Microbiana em produtos Cosméticos e Seu Controle. *Science News*. São Paulo, v. 1, nº 2, 2002. p. 05-07. Disponível em: http://www.science.com.br/artigos_pdf/Science%20News%20V01-N02.PDF Acesso em: 01 de junho de 2006.
18. SOUZA, M.R.S.E.L.; OHARA, M.T. & SAITO, T. Contaminação microbiana em emulsões cosméticas para aplicação dérmica. *Ver. Farm. Bioquímica*. Univ. São Paulo, São Paulo, v. 30, n. jan/jun, 1994. p. 23-28.
19. TORRES, L.M.S. & SERAFINE, A. Qualidade sanitária e risco associados ao uso de emulsões cosméticas para aplicação dérmica, manufaturadas nas farmácias de manipulação do Município de Goiânia, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, v. 32, nº 2, 2003. p. 193.
20. TRABULSI, L.R. & TOLEDO, M.R.F. *Microbiologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. 720p.
21. VENERANDA, N. *Controle de Contaminação é prioridade para Indústrias de Cosméticos*. *Controle de Contaminação*. São Paulo, ano 6, nº. 53, set 2003. p. 12-17.
22. WOLVEN, A.B. & LEVENSTEIN, I. Microbiological examination of cosmetic. *Am. Perfum Cosmet*. v. 87, 1972. 63-65p ZANCHET, E.N. *Os desafios do setor das Farmácias Magistrais. Manipulação Dermocosméticas*. São Paulo, v. 7, n. 3, maio/jun., 1995. p. 18.
23. WOLVEN, A.B. & LEVENSTEIN, I. Microbiological examination of cosmetic. *Am. Perfum. Cosmet*. v. 87, 1972. 63-65p.

Autor responsável
M.F. Marques
e-mail: canimox@yahoo.com.br