

ANA CAROLINA FERNANDES ARAUJO

**Avaliação da qualidade microbiana de sabonetes  
comercializados em feiras de artesanato de Brasília**

**BRASÍLIA-DF, 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA CAROLINA FERNANDES ARAUJO**

**Avaliação da qualidade microbiana de sabonetes comercializados  
em feiras de artesanato de Brasília**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin**

**Brasília-DF**

**2013**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de  
Brasília. Acervo 1005048

Araújo, Ana Carolina Fernandes.  
A663a Avaliação da qualidade microbiana de sabonetes  
comercializados em feiras de artesanato de Brasília /  
Ana Carolina Fernandes Araújo. -- 2013.  
72 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação  
em Ciências da Saúde, 2013.

Inclui bibliografia.

Orientação: Maria de Fátima Borin.

1. Sabonete - Processos de fabricação - Brasília (DF).
2. Sabonete - Microbiologia farmacêutica - Avaliação.  
I. Borin, Maria de Fátima. II. Título.

CDU 661.187

**ANA CAROLINA FERNANDES ARAUJO**

**Avaliação da qualidade microbiana de sabonetes comercializados em feiras de artesanato de Brasília**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**Aprovado em 15 de janeiro de 2013.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Maria de Fátima Borin – (Presidente)**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dra. Carine Royer**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista (Suplente)**  
**Universidade de Brasília**

*Dedico este trabalho à minha mãe, Socoro,  
ao meu pai, Alberto, à minha irmã Maria  
Luiza e ao meu amor, Felipe.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Socoro e Alberto pelo amor, carinho e apoio incondicional.

À minha irmã Maria Luiza pelo companheirismo, força, amizade, cumplicidade e ajuda em todos os momentos da minha vida.

Ao Felipe, meu companheiro, a quem sempre posso contar em todas as horas.

A toda minha família querida e a todos os meus amigos de quem sempre tive apoio.

À minha orientadora Fátima, pelos ensinamentos, amizade, compreensão e apoio.

Aos professores Francisco, Pérola, Yris, Luiz, Dâmaris e Angélica pelo apoio, colaboração, incentivo e docência.

À Cristina pela atenção e ajuda em todos os momentos em que precisei.

Aos meus amigos do laboratório Ádria Barros, Ângela Mendonça e Pedro Góes Mesquita que me incentivaram e me deram forças em diferentes momentos da pesquisa.

A todos do Laboratório de Farmacologia Molecular.

A todos os funcionários da UnB.

Ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade de Brasília (DPP/UnB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo 474896/2010-2) pelo apoio financeiro a este trabalho.

Muito obrigada.

*Algumas coisas estão destinadas a acontecer – precisamos apenas de algumas tentativas para chegar lá.”*

*(J. R. Ward)*

## RESUMO

Sabonetes artesanais são comuns em feiras populares de Brasília. O seu consumo tem se tornado cada vez maior devido à busca por produtos vendidos sob o apelo de *marketing* de produtos naturais e a suas características organolépticas atrativas. Apesar de a legislação exigir um responsável técnico para a manipulação de sabonetes, algumas vezes, a produção desses produtos de higiene é realizada por artesãos, que nem sempre estão familiarizados com os riscos inerentes à manipulação de produtos farmacêuticos. Por este motivo, esses produtos estão mais susceptíveis a sofrerem contaminação microbiana. A Farmacopeia Brasileira preconiza alguns ensaios a serem realizados para determinar a qualidade microbiana destes produtos, pela quantificação de microrganismos viáveis e determinação da presença de patógenos específicos. Os adjuvantes usados na formulação dos produtos de higiene para preservação da sua qualidade microbiana são os conservantes. Conservantes são um importante meio de limitar o crescimento microbiano em vários tipos de produtos farmacêuticos, porém, o número e a concentração de compostos químicos permitidos nesses produtos são limitados devido à sua toxicidade e ao seu potencial alergênico. Os conservantes mais utilizados são os parabenos, metildibromoglutaronitrila, fenoxietanol e imidazolidinil ureia. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de 15 sabonetes artesanais e identificar e quantificar alguns dos principais conservantes utilizados em produtos de higiene, através da determinação de microrganismos viáveis, pesquisa de patógenos específicos, avaliação do pH dos sabonetes e identificação e quantificação de alguns conservantes presentes por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados sugerem que, entre os sabonetes analisados, todos possuíam contagem de bactérias mesófilas totais acima dos limites aceitos nas farmacopeias e 53,3% estavam com carga de bolores e leveduras acima dos limites permitidos. Apesar de nenhum sabonete indicar a presença de conservantes em sua composição, as concentrações de propilparabeno encontradas estavam maiores que as permitidas pela ANVISA e foram encontrados valores de pH que podem inativar os parabenos. Assim, apesar da legislação para controlar a manipulação de sabonetes artesanais, estes ainda são comercializados com precárias condições de qualidade microbiológica.

Palavras-chave: sabonetes artesanais; qualidade microbiológica; conservantes; parabenos.

## ABSTRACT

Artisanal soaps are common in popular fairs of Brasilia. Its consumption has been increased due to search for products sold under the marketing appeal of natural products and their attractive organoleptic characteristics. Although the legislation requires a technical manager for soaps production, sometimes the production of these hygiene products is performed by craftsmen, who are not properly familiar with the risks involved in the handling of pharmaceutical products. Thus, these products are more likely to have microbial contamination. The Brazilian Pharmacopoeia recommends some tests to be performed to determine the microbial quality of those cosmetic products, by quantification of viable microorganisms and determining the presence of specific pathogens. Preservatives are the adjuvants used in the hygiene products formulation to preserve their microbial quality. Preservatives are important to limit the microbial growth in various types of pharmaceutical products. However, the number and concentration of chemicals allowed to be used as preservative in these products is limited because of its toxicity and its allergenic potentials. The most commonly used preservatives are parabens, metildibromoglutaronitrila, phenoxyethanol and imidazolidinyl urea. Thus, the objective of this study was to evaluate the microbiological quality of 15 artisanal soaps and identify and quantify some of the main preservatives used in hygiene products, through the determination of viable microorganisms, search for specific pathogens, assessment of pH and identification and quantification of preservatives present in the samples by high performance liquid chromatography. The results suggest that among the soaps tested, all had total mesophilic bacteria counts above the limits accepted by the pharmacopoeias and 53.3% were above the permissible limits for yeasts and molds. Although no soap indicate the presence of preservatives in its composition, concentrations of propylparaben were found higher than those permitted by ANVISA. Furthermore, pH values found for the soaps were able to promote the inactivation of the parabens. Thus, despite legislation to control the manipulation of artisanal soaps, these are still marketed under precarious conditions of microbiological quality.

Keywords: artisanal soaps; microbiological quality; preservatives; parabens.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Estrutura química do metilparabeno e do propilparabeno.....	18
Figura 2 - Estrutura química do fenoxietanol.....	21
Figura 3 - Estrutura química do metildibromoglutaronitrila .....	21
Figura 4 - Estrutura química da imidazolidinil ureia (4-hidroximetil-2,5-dioxo- imidazolidin-4-il-ureia).....	23
Figura 5 - Cultura de <i>P. aeruginosa</i> em ágar cetrimida .....	32
Figura 6 - Cultura de <i>Salmonella</i> sp em ágar verde brilhante .....	33
Figura 7 - Cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio ágar baird-parker.....	33
Figura 8 - Cultura de <i>Escherichia coli</i> em meio ágar MacConkey .....	34
Figura 9 - Fluxograma do ensaio de avaliação da presença de patógenos específicos nos sabonetes. ....	34
Figura 10 - Cromatogramas dos conservantes em estudo.....	42
Figura 11 - Curvas padrões dos conservantes.....	44
Figura 12 - Linearidade e equação da reta dos conservantes.....	46
Figura 13 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais I, II, III e IV. ....	49
Figura 14 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais V, VI, VII e VIII. ....	50
Figura 15 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais IX, X, XI e XII. ....	51
Figura 16 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais XIII, XIV e XV.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites de aceitabilidade de microrganismos em sabonetes. ....	4
Tabela 2 - Evolução dos casos de infecção por <i>E. coli</i> enteropatogênica clássica em crianças no brasil.....	11
Tabela 3 - Progressão, em anos, do número de cosméticos que utilizam os seguintes conservantes parabenos, imidazolidinil ureia, metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol.....	16
Tabela 4 - Sabonetes artesanais analisados nos experimentos .....	27
Tabela 5 - Função das substâncias utilizadas na solução neutralizante .....	31
Tabela 6 - Gradiente da fase móvel utilizado na eluição das amostras e conservantes na clae.....	36
Tabela 7 - pH dos sabonetes artesanais.....	37
Tabela 8 - Contagem de bactérias mesófilas totais e de bolores e leveduras nos sabonetes artesanais.....	38
Tabela 9 - Presença de colônias características de <i>Escherichia coli</i> nos sabonetes artesanais .....	39
Tabela 10 - Determinação do número mais provável de bactérias fermentadoras de lactose nos sabonetes artesanais.....	41
Tabela 11 - Tempo de retenção dos conservantes .....	43
Tabela 12 - Faixa de linearidade e reta obtida para cada conservante.....	45
Tabela 13 - Precisão da análise dos conservantes nas diferentes concentrações. ..	47
Tabela 14 - Porcentagem de metildibromoglutaronitrila, fenoxietanol, metilparabeno e propilparabeno nas amostras de sabonetes.....	48

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIR	<i>Cosmetic Ingredient Review</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica clássica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUS	Síndrome Urêmica Hemorrágica
Ig	Imunoglobulina
LESS	Lauril Éter Sulfato de Sódio
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Resistente a multidrogas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
NMP	Número Mais Provável
PROBAS	<i>Danish Product Register</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécie reativa de oxigênio
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USP	Farmacopeia Americana
UV/VIS	Ultravioleta/Visível

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	vii
<b>SUMÁRIO</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 SABONETES: PRODUTOS DE HIGIENE <i>vs</i> COSMÉTICOS.....	1
1.2 QUALIDADE MICROBIANA DE PRODUTOS DE HIGIENE E COSMÉTICOS.....	3
1.3 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DE COSMÉTICOS.....	5
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	8
1.3.3 <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.3.4 <i>Salmonella sp.</i> .....	12
1.4 PRINCIPAIS CONSERVANTES UTILIZADOS EM COSMÉTICOS.....	15
1.4.1 Parabenos.....	17
1.4.2 Fenoxietanol/Metildibromoglutaronitrila.....	21
1.4.3 Imidazolidinil ureia.....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1 MATERIAL.....	26
3.2 EQUIPAMENTOS.....	30
3.3 MÉTODOS.....	30
3.3.1 Avaliação do pH dos sabonetes.....	30

<b>3.3.2 Avaliação da qualidade microbiana das formulações.....</b>	<b>31</b>
3.3.2.1 Determinação quantitativa dos microrganismos viáveis nos sabonetes.....	31
3.3.2.2 Pesquisa de patógenos específicos.....	32
3.3.2.2.1 <i>Enriquecimento em meios não seletivos.....</i>	32
3.3.2.2.2 <i>Determinação qualitativa da presença de Pseudomonas aeruginosa.....</i>	32
3.3.2.2.3 <i>Determinação qualitativa da presença de Salmonella sp.....</i>	32
3.3.2.2.4 <i>Determinação qualitativa da presença de Staphylococcus aureus.....</i>	33
3.3.2.2.5 <i>Determinação qualitativa da presença de Escherichia coli.....</i>	34
3.3.2.2.6 <i>Determinação quantitativa da presença de bactérias fermentadoras de lactose.....</i>	35
<b>3.3.3 Determinação quantitativa da presença dos conservantes metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol, metildibromoglutaronitrila e imidazolidinil ureia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</b>	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 AVALIAÇÃO DO pH DOS SABONETES ARTESANAIS.....	37
4.2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS MICRORGANISMOS VIÁVEIS NOS SABONETES.....	38
4.3 PESQUISA DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS.....	39
4.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE LACTOSE.....	40
4.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS CONSERVANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	42
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 SABONETES: PRODUTOS DE HIGIENE vs COSMÉTICOS

Segundo a Farmacopeia Brasileira (1), produtos de higiene são produtos para uso externo, anti-séptico ou não, destinado ao asseio ou à desinfecção corporal, e esta definição compreende sabonete, xampu, dentifrício, enxaguatório bucal, desodorante, produto para barbear, entre outros. Já os cosméticos, por sua vez, são produtos para uso externo, destinados à proteção ou ao embelezamento das diferentes partes do corpo.

De acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),

*produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, como pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, e tem como objetivos principais limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais e protegê-los ou mantê-los em bom estado (2).*

Esses produtos podem ser classificados em grau I, que são aqueles que não necessitam de comprovação de suas propriedades e não requerem informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, e grau II, que são os que exigem comprovação de segurança e eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (2).

A resolução federal da *Food, Drug and Cosmetic* (3) inclui a definição de cosméticos nos produtos de higiene, mas exclui os sabonetes da definição de cosméticos. Dessa forma, a FDA só considera um produto com a definição de sabonete quando a maior parte da matéria não volátil do produto consistir de um sal alcalino de ácidos graxos (sabão). As propriedades detergentes desses sabonetes devem ser devidas aos sais alcalinos de ácidos graxos e, ainda, o produto deve ser rotulado e vendido apenas como sabão. Se o produto possuir alguma atividade, por exemplo, anti-séptica ou hidratante, ele deve ser considerado como um medicamento ou um cosmético, respectivamente.

Assim, apesar das controvérsias sobre a definição dos sabonetes, eles são produtos de higiene pessoal e podem ser classificados em grau I ou II, de acordo

com a Resolução nº 211 da ANVISA (2). Esta classificação indica o nível de risco de efeitos adversos que cada tipo de produto pode oferecer, considerando sua formulação, finalidade e modo de uso. Na categoria de grau I estão classificados os sabonetes abrasivos ou esfoliantes mecânicos, faciais ou corporais, e os desodorantes. Esses produtos oferecem um risco mínimo no seu uso. Já a categoria de grau II abrange os sabonetes anti-sépticos, infantis e de uso íntimo. Eles oferecem um risco potencial no uso e necessitam de comprovação de segurança e eficácia. Os sabonetes de risco grau I necessitam apenas de notificação de produção na ANVISA, enquanto que os sabonetes de risco grau II precisam de registro para produção (2, 4-6). Dessa forma, sabonetes artesanais podem ser classificados como grau I ou II, dependendo da finalidade de uso.

Sabonetes artesanais são comuns em feiras populares de Brasília. O seu consumo tem se tornado cada vez maior devido à busca por produtos vendidos sob o apelo de *marketing* de produtos naturais e a suas características organolépticas atrativas, que os transformam, às vezes, em objetos de decoração de banheiros, ao mesmo tempo em que são utilizados como produtos de higiene. Porém, a manufatura desses produtos vendidos em feiras, algumas vezes, é realizada por artesãos, que nem sempre estão familiarizados com os riscos inerentes à manipulação de produtos farmacêuticos, como os sabonetes.

De acordo com a lei federal ordinária nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, os cosméticos, os saneantes e outros produtos, todo estabelecimento que manipule produtos de higiene pessoal deve conter um responsável técnico, sob o risco de cometer infração grave ou gravíssima (7). Assim, a manipulação de sabonetes por profissionais não habilitados, além de caracterizar uma infração à lei, proporciona uma exposição desnecessária da população a um risco de saúde, principalmente devido ao fato desses produtores utilizarem de forma indiscriminada, muitas vezes por desconhecimento, diversos excipientes que podem causar sérios problemas a saúde dos consumidores.

Os excipientes são substâncias destituídas de poder terapêutico, usadas para assegurar a estabilidade, a eficácia e as propriedades físico-químicas, farmacológicas e organolépticas dos produtos farmacêuticos (8). Porém, alguns excipientes, como conservantes, fragrâncias, emolientes e antioxidantes podem

ocasionar diversas reações adversas. As fragrâncias são as principais causadoras de efeitos adversos em cosméticos, seguidas dos conservantes (9).

Conservantes são substâncias adicionadas aos produtos de higiene, cosméticos e perfumes com a finalidade de preservá-los de danos ou deteriorações causados por microrganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto (10). Para isso, eles devem, entre outras características, ser estáveis, solúveis e não interagirem com os fármacos.

## 1.2 QUALIDADE MICROBIANA DE PRODUTOS DE HIGIENE E COSMÉTICOS

Tanto os produtos de higiene quanto os cosméticos, assim como alimentos e medicamentos, podem sofrer contaminação microbiana durante a sua manipulação, transporte ou utilização, e esta contaminação pode ser por microrganismos patogênicos ou não patogênicos.

Os microrganismos podem alterar propriedades químicas ou físicas de um produto, causando, entre outros problemas, separação de fases, descoloração ou mudança no pH (11). A presença de água e componentes orgânicos na formulação favorece a proliferação de microrganismos nos produtos.

Para garantir sua qualidade, produtos não estéreis devem respeitar um limite pré-especificado de carga microbiana. Os limites microbianos especificados devem ser adequados às várias categorias de produtos de modo que reflitam o tipo de contaminação mais provável durante a fabricação, as especificações limítrofes determinadas a cada via de administração do produto, e até o risco que o consumidor final oferece na contribuição com a carga microbiana do produto durante o uso (1).

A ANVISA estabelece os parâmetros para controle microbiológico de cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes e os subdivide em dois tipos: 1) produtos infantis, para área dos olhos e que entram em contato com mucosas; 2) demais produtos susceptíveis à contaminação.

Os critérios de aceitabilidade para qualidade microbiológica para os dois tipos de produtos são: *i)* ausência de *Pseudomonas aeruginosa* em 1 g ou 1 mL de produto; *ii)* ausência de *Staphylococcus aureus* em 1 g ou 1 mL de produto; *iii)*

ausência de coliformes totais e fecais em 1 g ou 1 mL de produto; e *iv*) ausência de clostrídios sulfito-redutores em 1 g para talcos.

Para o tipo 1 a contagem de microrganismos mesófilos totais aeróbios não pode ser superior a  $10^2$  UFC/g ou mL de produto. Já para o tipo 2 esse limite é de  $10^3$  UFC/g ou mL de produto (Tabela 1) (12).

Tanto a Farmacopeia Brasileira quanto a Farmacopeia Americana (USP) e a Europeia determinam os seus limites microbianos a partir de critérios relacionados à via de administração dos produtos. Produtos para uso nasal, auricular, gengival, cutâneo e em oromucosas devem apresentar contagem de bactérias aeróbias totais menor que  $10^2$  UFC/g ou mL de produto e contagem de bolores e leveduras menor que  $10^1$  UFC/g ou mL de produto, considerando o limite máximo de 200 e 20 UFC, respectivamente. A USP e a Farmacopeia Brasileira determinam, ainda, ausência de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em 1 g ou mL de produto (1, 13-14).

**Tabela 1- Limites de aceitabilidade de microrganismos em sabonetes.**

	Limites de aceitabilidade	Classificação dos sabonetes
Tipo 1	Ausência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1 g ou 1 mL de produto; Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> em 1 g ou 1 mL de produto; Ausência de coliformes totais e fecais em 1 g ou 1 mL de produto; Contagem de microrganismos mesófilos totais aeróbios não mais que $10^2$ UFC/g ou mL Limite máximo de $5 \times 10^2$ UFC/g ou mL	Produtos infantis, Produtos para área dos olhos Produtos que entram em contato com mucosas
Tipo 2	Ausência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1 g ou 1 mL de produto; Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> em 1 g ou 1 mL de produto; Ausência de coliformes totais e fecais em 1 g ou 1 mL de produto; Contagem de microrganismos mesófilos totais aeróbios não mais que $10^3$ UFC/g ou mL Limite máximo de $5 \times 10^3$ UFC/g ou mL	Demais produtos susceptíveis a contaminação

Fonte: ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada 481/1999 (12).

### 1.3 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DE COSMÉTICOS

Diversos microrganismos, patogênicos ou não, podem estar presentes em formulações farmacêuticas. Assim, a Farmacopeia Brasileira (1) preconiza alguns ensaios a serem realizados para determinar a presença de microrganismos específicos. Entre eles estão *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., *Candida albicans* e bactérias Gram negativas bile tolerantes. Neste estudo foram realizadas as identificações de alguns destes microrganismos nas amostras, e, assim, esta parte do texto irá focar em informações sobre estes microrganismos, a saber: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* e *Salmonella* spp.. Normalmente, a água e as matérias-primas de origem natural são as principais fontes de contaminação microbiana. *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo que pode ser encontrado na água utilizada para manipular os produtos de higiene. Conversas dos manipuladores, tosses e espirros podem ser uma fonte de contaminação dos sabonetes por *Salmonella* spp. e até por *Staphylococcus* sp., presentes na pele e narinas de pessoas saudáveis (15).

#### 1.3.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram positivos encontrados em fossas nasais, garganta, intestino e pele (16). Por estarem presentes na garganta, esses microrganismos podem ser disseminados através da fala e da tosse (17). Os humanos são os principais hospedeiros dessa bactéria, mas ela também pode ser encontrada em animais domésticos e até em gado (18).

Normalmente, numa amostra aleatória, 20% das pessoas são portadoras persistentes desse microrganismo, 60% são portadoras intermitentes e os outros 20% nunca apresentaram colonização por essa bactéria (17-18). A maioria das pessoas colonizadas não desenvolve a doença, entretanto, a presença do *Staphylococcus* sp. favorece infecções posteriores (19). No trabalho realizado por Gorwitz e colaboradores, foi demonstrado que, nos Estados Unidos, numa pesquisa

nacional realizada entre 2001 e 2004, a prevalência de colonização nasal por *S. aureus* no período de 2003 a 2004 foi de 28,6% das 9.004 pessoas estudadas (19). E ainda, Boucher e Corey, em trabalho publicado em 2008, demonstraram que existiam 400 mil internações devido a essa bactéria por ano nos Estados Unidos (20).

Existem vários fatores responsáveis pela virulência do *Staphylococcus aureus*, como componentes da superfície celular, toxinas e enzimas. Entre os componentes celulares estão a cápsula que protege a bactéria contra a fagocitose, o peptidoglicano, que ativa a via alternativa do complemento e estimula a produção de citocinas, os ácidos teicóicos, que ligam o microrganismo ao epitélio da mucosa nasal, e a proteína A, que se liga ao anticorpo IgG, impedindo a ligação deste às células fagocitárias (21).

As toxinas podem ser subdivididas em citocinas, superantígenos e as que degradam moléculas de adesão das células epiteliais cutâneas. As principais citocinas são a  $\alpha$ -toxina e a leucocidina. Ambas promovem a morte leucocitária através de diferentes mecanismos de ação (21). Um exemplo de superantígeno é a enterotoxina. Esta é termoestável e pode sobreviver a até 30 minutos de fervura e, assim, pode contaminar alimentos e causar intoxicação alimentar (22). Um exemplo entre as toxinas que degradam moléculas de adesão das células epiteliais cutâneas são as esfoliatinas. Elas são produzidas no sítio da infecção e são distribuídas para áreas distantes da pele gerando uma separação da epiderme e da derme, conhecida como síndrome da pele escaldada (21).

A principal enzima produzida pelo *Staphylococcus aureus* é a coagulase, que catalisa várias reações que resultam na formação de fibrina, que, por sua vez, facilita a coagulação do plasma (21).

O *Staphylococcus aureus* pode gerar infecções superficiais ou profundas. As infecções superficiais afetam a pele, como foliculite (infecção de folículos pilosos), furúnculo (infecção de folículos pilosos com nódulos dolorosos) e terçol (infecção de uma glândula sebácea marginal das pálpebras) (21-22). Já as infecções profundas podem originar-se nos focos das infecções superficiais, como osteomielite, endocardite e sepse. (19, 21-22). A endocardite é a complicação mais severa do *S. aureus* e em 40% dos casos ela se desenvolve em ambiente hospitalar (20). O

*Staphylococcus aureus* é a principal causa de osteomielite aguda e crônica e é responsável por 25 a 35% dos casos de endocardite (21).

Atualmente, diversas linhagens dessa bactéria têm desenvolvido resistência a múltiplos antibióticos, como, por exemplo, a meticilina (MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina). Essas linhagens são mais virulentas e de difícil tratamento (17). Elas são responsáveis por infecções em profissionais da saúde desde 1960, e são responsáveis pelo pior surto de infecções hospitalares do mundo (17, 19). A infecção por MRSA pode ser classificada em hospitalar e comunitária. As diferenças estão relacionadas a características epidemiológicas e clínicas da doença e genóticas da bactéria. As infecções comunitárias ocorrem em pacientes não hospitalizados ou quando o paciente é internado e desenvolve a infecção antes de 48 horas de hospitalização e não possui os seguintes fatores de risco: hemodiálise, cirurgia, cateter e hospitalização durante o ano anterior (18). Desde 1980 têm aumentado o número das infecções comunitárias (18, 23). Em São Francisco, Estados Unidos, entre 1996 e 1997 a prevalência de MRSA entre pessoas infectadas com *S. aureus* era de 10%. Já em 2004 e 2005 esse número aumentou para 53% (23).

Uma revisão bibliográfica realizada entre 1980 e 2006 em artigos de 37 países apresentou dados que demonstraram que aproximadamente 5% dos profissionais da saúde estavam colonizados com MRSA (24). Já outro estudo realizado em São Paulo, no ano de 2011 demonstrou que 7,1% dos profissionais da saúde estavam colonizados com MRSA e, entre eles, 73,1% das infecções já eram resistentes a outro antibiótico utilizado no tratamento de MRSA, a mupirocina (17).

MRSA leva a óbito aproximadamente 19 mil pacientes americanos hospitalizados por ano. Esse número é similar ao número de óbitos por HIV, tuberculose e hepatite viral juntos (20). Aproximadamente 48,8% dos pacientes que tiveram infecção por MRSA são portadores dessa bactéria após 1 ano da infecção e 21,2% continuam sendo portadores após 4 anos (18). Assim, percebe-se como as infecções com *Staphylococcus aureus* estão aumentando e o controle dessas infecções é de suma importância.

### 1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram negativos responsáveis por 70% das infecções causadas por *Pseudomonas* (16). Em hospitais, ela está entre as principais causas de infecções por Gram negativos (25-26). Elas produzem diversos pigmentos, como a piocianina (azul), a pioverdina (verde), a piomelanina (marrom) e a piorrubina (vermelho) (21). Normalmente habitam o solo, água e vegetais, mas também piscinas, banheiras, soluções de lente de contato e até drogas ilícitas podem ser sítios de contaminação (27). Esse microrganismo pode sobreviver a baixas temperaturas, por isso são encontradas com facilidade em alimentos refrigerados (28). O homem pode conter, normalmente, 0 a 2% de *Pseudomonas aeruginosa* na pele, 0 a 3% na mucosa nasal, 0 a 6% na garganta e 2 a 24% nas fezes (21). Ela pode ainda estar presente na axila e região perianal (27).

Por ser um microrganismo que pode atingir diferentes órgãos no hospedeiro, a *Pseudomonas aeruginosa* possui vários fatores de virulência. Estes podem ser componentes estruturais ou fatores extracelulares da bactéria. Entre os componentes estruturais estão as fímbrias, as adesinas, o lipopolissacarídeo (LPS) e o alginato. As fímbrias promovem a adesão da bactéria nas células epiteliais do hospedeiro. As adesinas exercem a fixação ao muco, que permite a colonização dos pulmões. O LPS pode gerar o choque tóxico e ainda aumentar a produção de anticorpos no paciente. O alginato é um polissacarídeo que promove a formação de um gel em volta da bactéria, o que dificulta a fagocitose e a difusão de antibióticos, além de agir como um fator de adesão. Dentre os fatores extracelulares estão as exoenzimas S e U, as proteases, os pigmentos fenazínicos e a formação de biofilme. A exoenzima S e a exoenzima U são proteínas liberadas pela *Pseudomonas aeruginosa* para impedir a fagocitose de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. As proteases promovem lesões nos vasos e tecidos gerando hemorragias e necrose. Os pigmentos fenazínicos são metabólitos secundários liberados pela bactéria para impedir a proliferação de outras bactérias e de linfócitos, garantindo a sua subsistência. A formação do biofilme, composto por um conjunto de bactérias organizadas em uma matriz, comportamento característico deste gênero, permite um maior contato entre as bactérias, favorecendo a troca de material genético, além de

dificultar a difusão de antibióticos, proteger as bactérias contra o sistema imunitário do paciente, entre outras vantagens (21).

Essa bactéria é tipicamente oportunista podendo desenvolver infecções devido a processos cirúrgicos, infecções urinárias associadas ao uso de cateteres, utilização de respiradores contaminados que podem gerar graves pneumonias, e imunodepressão de pacientes (16), além de apresentarem risco a idosos e crianças. Um estudo apresentou a alta ocorrência de resistência a antibióticos (25). A revisão de Livermore em 2002 descreveu que a resistência a antimicrobianos é mais frequente em pacientes que sofreram queimaduras, portadores de fibrose cística e internados em unidade de terapia intensiva, e que 70% a 98% das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas nos Estados Unidos e Reino Unido ainda eram susceptíveis a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos (29).

Porém, em hospitais da Pensilvânia, o aumento da taxa de resistência dessas bactérias ao antimicrobiano imipenem (antibiótico  $\beta$ -lactâmico) de 13% para 20% entre 1989 e 2006. O mesmo trabalho indicou que o tempo de internação dos pacientes portadores de *P. aeruginosa* resistente a imipenem era de 16 dias, enquanto dos pacientes com bactérias sensíveis era de 9 dias (25). Um estudo nacional em pacientes hospitalares identificou que essa bactéria é o terceiro patógeno mais frequente, com 30,2% de resistência ao imipenem (26). Já as regiões do Sul e Centro-Oeste do país apresentaram percentuais de resistência de 58,9% e de 82,7%, respectivamente (26). Dessa forma, a resistência a antimicrobianos tem provocado aumento significativo nas taxas de mortalidade, morbidade, custos hospitalares e tempo de internação hospitalar (25-26). Para contornar o problema da resistência a antimicrobianos, atualmente tem-se utilizado a combinação de fármacos (27).

### **1.3.3 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Por ser uma bactéria presente em alimentos e água contaminados com fezes, a *E. coli* é utilizada para medir o nível de contaminação por fontes fecais (28), sendo utilizado como indicador de higiene. Algumas linhagens

dessas bactérias adquiriram fatores de virulência que aumentaram a sua capacidade de adaptação a diversos ambientes (30). Essas características favoreceram a classificação das bactérias em grupos, como cepas patogênicas extraintestinais, causadores de diversas infecções, agentes enteropatogênicos e cepas que participam da microbiota normal nos intestinos (comensais) (31). As cepas patogênicas extraintestinais podem ocasionar infecção urinária, pneumonias, osteomielite e meningite do recém-nascido. Já os agentes enteropatogênicos podem ser categorizadas em *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (16, 21).

As EPEC formam colônias no intestino delgado e são as principais causas de diarreia infantil em crianças menores de 6 meses de idade no Brasil, e em menores que 2 anos de idade no mundo (21, 32). As fontes de infecção e os meios de transmissão das EPEC não são bem descritos. Essa bactéria possui diversos fatores de virulência, como a fímbria *bundle-forming* (BFP), que promove a adesão de uma bactéria a outra formando microcolônias no intestino, a intimina, que é uma proteína membranar que pode determinar sítios preferenciais de aderência no intestino, e até algumas proteínas secretadas que podem gerar apoptose dos enterócitos e disfunções mitocondriais (16, 21, 31). As EPEC podem ser classificadas em típicas ou atípicas dependendo da presença dos genes de BFP e intimina. As típicas possuem ambos os genes, enquanto que as atípicas possuem apenas a intimina. De acordo com diagnóstico molecular, as EPEC são responsáveis por 5 a 10% das diarreias pediátricas no mundo. Antigamente, a principal causadora de diarreia infantil em países em desenvolvimento era a EPEC típica, enquanto que nos países industrializados eram as atípicas. Porém, atualmente, as EPEC atípicas são as responsáveis por infecções infantis tanto em países em desenvolvimento quanto em industrializados, conforme dados mostrados na Tabela 2. As atípicas produzem 78% das infecções por EPEC em crianças menores de 5 anos de idade com diarreia. Como as atípicas podem persistir mais tempo no intestino, elas podem causar diarreia persistente, que são aquelas que duram mais de 14 dias (32).

**Tabela 2- Evolução dos casos de infecção por *E. coli* enteropatogênica clássica em crianças no Brasil**

Brasil	Idade	Número de amostras	EPEC (%)	EPEC Típica (%)	EPEC Atípica (%)
1998-1999	< 2 anos	237	34	21	13
2001-2002	< 5 anos	175	13	1	12
2002-2003	< 5 anos	446	25	2	23

Fonte: Ochoa, 2008 (32)

As STEC são bactérias produtoras de toxinas capazes de inibir a síntese proteica de células do hospedeiro (31). Essas toxinas recebem o nome de Shiga devido à semelhança com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*. As STEC podem habitar o intestino de diversos animais e causar desde diarreia branda até diarreia sanguinolenta que pode gerar complicações, como síndrome hemolítica urêmica, púrpura trombocitopênica trombótica e apendicite. As fontes de infecção são alimentos e água contaminados com fezes, que geram uma diarreia não sanguinolenta e dor abdominal nos primeiros dois dias, evoluindo para diarreia sanguinolenta do terceiro ao quarto dia. As STEC atingem o intestino grosso, aderem-se, multiplicam-se e produzem a toxina Shiga. Esta promove alterações em subunidades ribossômicas de células eucarióticas, levando à inibição do processo traducional de proteínas (21). Jansen (2011) publicou um trabalho demonstrando que aproximadamente 80% dos pacientes portadores de infecção por STEC apresentavam quadros de diarreia sanguinolenta, enquanto que 20% apresentavam quadros de diarreia aquosa. Em 25% dos casos, a diarreia sanguinolenta progrediu para uma síndrome urêmica hemorrágica (HUS) depois de 3 a 5 dias. Entre os pacientes que tinham HUS, 50% desenvolveram sintomas neurológicos depois de 3 a 10 dias, como convulsões e desorientação leve, indicando um sério risco à saúde (33).

As EAEC levam esse nome devido a um padrão de adesão agregativa em que as bactérias ficam unidas umas às outras e às células do hospedeiro (30). Essa adesão é mediada por dois tipos de fímbrias (34). Elas produzem uma toxina enteroagregativa que está associada aos sintomas da doença (34). A patogênese pode ser dividida em três etapas: i) infecção, em que as bactérias aderem à mucosa

intestinal e à camada de muco; *ii*) multiplicação, em que há uma hipersecreção de muco formando um biofilme, e *iii*) produção de toxinas ou inflamação, levando a lesões intestinais. A formação do biofilme está associada à diarreia. Aproximadamente um terço dos pacientes com infecção por EAEC apresentam diarreia com sangue. Weintraub (2007) publicou um estudo realizado no Vietnã mostrando que 87% de crianças com diarreia portadoras de EAEC tinham menos de 2 anos, indicando a prevalência da doença nesse grupo de pacientes. Esse microrganismo pode causar diarreias persistentes (30).

As ETEC foram as primeiras bactérias a serem diagnosticadas como causadoras de diarreia em 1970 (34). As infecções por ETEC podem durar entre um e dois dias. As ETEC podem produzir toxinas termolábeis e termoestáveis. As toxinas termolábeis fixam-se nos enterócitos e entram na célula ativando a adenilciclase, que aumenta o AMP cíclico. Este estimula a secreção de cloreto e reduz a absorção de sódio. Assim, ocorre o aumento de líquido no intestino, promovendo a diarreia. As toxinas termolábeis podem ainda estimular o metabolismo de ácido araquidônico, aumentando a produção de prostaglandinas e leucotrienos, que aumentam a motilidade intestinal (31). As EIEC invadem e se proliferam no interior dos enterócitos do cólon. Após a sua multiplicação, elas podem promover a morte do enterócito e serem liberadas para invadir novas células intestinais. Isso gera uma resposta inflamatória acompanhada de necrose e ulceração no intestino grosso que pode liberar sangue e muco nas fezes (34).

A diarreia causada por *E. coli* é responsável por aproximadamente 2 milhões de mortes em crianças no mundo anualmente (32).

#### **1.3.4 *Salmonella* sp.**

As salmonelas também pertencem à família *Enterobacteriaceae*; são bacilos Gram negativos e, normalmente, não fermentam lactose. As principais infecções causadas por essas bactérias são a febre tifoide e a gastroenterite (35). A febre tifoide é causada pela *Salmonella typhi*. Já foram identificadas, aproximadamente, 2.600 sorotipos de salmonelas entéricas, mas apenas algumas cepas podem causar

gastroenterite humana, como *S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. heidelberg* (35-36). As gastroenterites, conhecidas também como salmoneloses, são as maiores causas de infecções intestinais em seres humanos e animais, ocasionando 5.000 casos por ano em humanos no Canadá (37). Nos Estados Unidos, estima-se que 1,4 milhões de pessoas sofrem de salmonelose e 500 a 2.000 pessoas morrem por ano devido às salmonelas não-tifoides (38-39). No Brasil, em 1994 e 1995 foram identificados 27 surtos com 2364 pessoas acometidas e 2 mortes por essa bactéria em São Paulo (40).

A principal bactéria identificada como causadora de gastroenterites em 2000 foi a *S. typhimurium* (39). Já em 2007, a *Salmonella enteritidis* causou 55% das infecções por salmonelas no mundo (36). No Canadá, a taxa de infecções por *S. enteritidis* aumentou de 12% a 27% das infecções causadas por salmonelas entre os anos de 1999 a 2006 (37). Comparando os anos de 2003 a 2009, o número total de casos de salmoneloses aumentou em 10%, enquanto que as infecções por *S. enteritidis* aumentaram em 63% (37).

A febre tifoide é uma infecção sistêmica que atinge normalmente crianças. Ela é transmitida via fecal-oral, sendo disseminada somente por fezes humanas (21-22). As bactérias invadem a mucosa intestinal e depois se espalham pelo corpo através do sangue, gerando uma bacteremia primária assintomática. Posteriormente, as bactérias se multiplicam em alguns órgãos, como fígado, baço e medula óssea e alcançam novamente o sangue, ocasionando uma segunda bacteremia sintomática, com febre de 10 a 14 dias, cefaleia e desconforto abdominal. Algumas pessoas podem desenvolver um quadro de infecção crônica assintomática, em que a *Salmonella typhi* fica na vesícula biliar durante anos sendo liberada nas fezes (21). Alguns estudos têm demonstrado que pacientes portadores de HIV possuem uma proteção contra a *Salmonella typhi*. Isso pode ocorrer devido à falta de resposta imunológica celular contra essa bactéria. Assim, mesmo infectado, o paciente não desenvolve febre nem apresenta respostas inflamatórias, desenvolvendo a doença com características mais brandas (35).

As gastroenterites são infecções agudas conhecidas como infecções alimentares. Ovos, queijo, carne de porco, de frango e de boi são potenciais fontes de salmonelas (37). Nelas, as bactérias ingeridas oralmente aderem-se à mucosa do

intestino delgado e a invadem, causando diarreia (21). Algumas vezes, a bactéria pode atravessar a mucosa intestinal e atingir o sistema linfático e cardiovascular podendo, dessa forma, atingir diversos órgãos (22). O período de incubação é de 48 horas, mas a bactéria permanece nas fezes por quatro a cinco semanas (21). Durante a fase aguda da doença, são encontradas até um bilhão de salmonelas por grama nas fezes (22).

Entre os pacientes com gastroenterites, 5% desenvolvem bacteremias. Crianças muito novas ou crianças e adultos portadores de outras doenças, como HIV e anemia hemolítica, são mais susceptíveis a desenvolverem bacteremias que podem gerar infecções extraintestinais (36-37, 39).

As salmonelas podem ser transferidas de animais para humanos através da carne e do leite, e a utilização de antibióticos na pecuária tem originado diversas bactérias resistentes a vários antibióticos (22). Muitas linhagens de salmonelas têm demonstrado resistência maior que 50% aos antimicrobianos convencionais (ampicilina, cloranfenicol e sulfametaxazol-trimetropim) (39). As salmonelas possuem diversos fatores de virulência, como as fímbrias, proteínas efetoras e a proteína ShdA. As fímbrias promovem a adesão da bactéria em células epiteliais e na matriz extracelular. As proteínas efetoras permitem a multiplicação das bactérias nos macrófagos, o que gera a apoptose dessa célula. A ShdA é uma proteína de superfície que se liga à matriz extracelular. Ela está envolvida na eliminação de salmonela nas fezes de forma duradoura (21).

Devido à patogenicidade de algumas linhagens dessa bactéria, como surtos de *S. enteritidis* no Canadá desde 2005, o estudo da contaminação desse patógeno em produtos de uso comum são de grande importância (37). Um ótimo exemplo para diminuir os danos causados por essas bactérias é a estratégia sueca desenvolvida há mais de 50 anos. Essa estratégia busca eliminar a contaminação desde a ração dos animais até o derivado do animal que será consumido pelas pessoas. Os resultados encontrados desse programa são ótimos, como a presença de apenas 0,02%, 0,01% e 0,03% na carcaça de gado, porco e aves contaminados por salmonela, respectivamente. Em humanos, as infecções por salmonelas na Suécia foram de 47 casos para cada 100.000 habitantes entre 1997 a 2008 (41).

## 1.4 PRINCIPAIS CONSERVANTES UTILIZADOS EM COSMÉTICOS

Conservantes são substâncias adicionadas a produtos farmacêuticos e cosméticos para prevenir ou retardar a deterioração microbiana. Eles são um importante meio de limitar o crescimento microbiano em vários tipos de produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos (42). Conservantes antimicrobianos são usados para reduzir a probabilidade de crescimento microbiano em produtos aquosos e para reduzir a chance de sobrevivência microbiana em produtos anidros que podem ser contaminados ou umedecidos durante o seu uso (43). Agências reguladoras governamentais recomendam o uso de conservantes em todas as formulações farmacêuticas multidosas (44).

Os conservantes têm como alvo bactérias, bolores e leveduras. Eles são normalmente utilizados em concentrações muito baixas, ou seja, menos de 1% da formulação, e são dirigidos a espécies como *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp, *Serratia* spp. e *Aspergillus niger* (45).

O número de compostos químicos permitidos para uso como conservantes em alimentos e produtos farmacêuticos é limitado. Isso ocorre, principalmente, devido aos problemas de toxicidade e potencial alergênico desses compostos. Assim, é necessário um cuidado na escolha do conservante a ser empregado para que o melhor desempenho possível seja conseguido com o menor potencial de toxicidade (46). Fármacos estéreis acondicionados em recipientes com múltiplas doses devem ter um sistema conservante que seja capaz de os auto-esterilizar durante o uso, pois eles também estão sujeitos à contaminação. Produtos aquosos não estéreis precisam de sistemas conservantes que sejam capazes de reduzir sua carga microbiana a níveis aceitáveis em um período de tempo que garanta sua qualidade durante o uso, dentro do prazo de validade, e que garanta a ausência de patógenos (47-49).

Porém, de modo geral, todos os agentes conservantes são tóxicos. Para maximizar a proteção aos consumidores, a concentração de conservantes que se mostra efetiva no produto final deve estar bem abaixo dos níveis tóxicos para humanos (44). Geralmente, somente a fração não dissociada da molécula de um conservante é ativa, pelo fato de sua porção ionizada ser incapaz de penetrar na

célula do microrganismo. Deste modo, o conservante selecionado deverá estar na forma não dissociada no pH da formulação (43).

Em quase todas as formulações farmacêuticas há fatores propiciadores ou inibidores do crescimento microbiano, como o pH e a presença de substâncias tóxicas e de água. O balanço entre esses fatores, incluindo a presença de conservantes, determina o crescimento microbiano ou taxa bactericida. Deteriorações químicas ou físico-químicas podem produzir formulações com uma significativa contaminação microbiana e vice-versa (43).

Diversos compostos químicos podem ser utilizados como conservantes em produtos de higiene, mas alguns são popularmente mais utilizados, como os parabenos, metildibromoglutaronitrila, fenoxietanol e imidazolidinil ureia. A utilização desses compostos vem aumentando ao longo dos anos, conforme dados mostrados na Tabela 3 (50). Em um estudo realizado entre os anos de 2001 a 2006 com 1.927 pacientes com eczema crônico foi demonstrado que 1,1% dos pacientes apresentaram sensibilização por parabenos, 1,7% pela associação de metildibromoglutaronitrila com fenoxietanol e 0,7% por imidazolidinil ureia (51). Isso demonstra a importância do estudo desses conservantes e o cuidado que se deve ter no uso desses compostos em produtos farmacêuticos e cosméticos. O principal efeito adverso causado por conservantes é a dermatite de contato. Por ser a área de maior contato a alérgenos, as mãos estão envolvidas em dois terços de todos os casos de dermatite de contato (52).

**Tabela 3- Progressão, em anos, do número de cosméticos que utilizam os seguintes conservantes parabenos, imidazolidinil ureia, metildibromoglutaronitrila e fenoxietanol**

Conservantes	Ano					
	1980	1990	1993	1996	2001	2003
Parabenos	13.786	16.107	15.020	3.345	16.424	17.336
Imidazolidinil ureia	1.684	2.749	2.312	10	2.025	2.038
Metildibromoglutaronitrila + Fenoxietanol	-	-	-	16	88	95

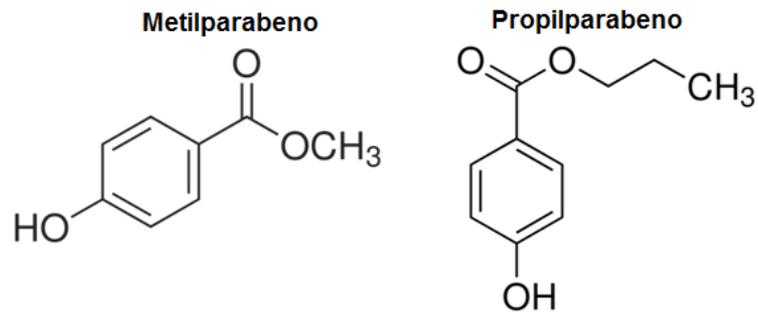
Fonte: Sasseville, 2004 (50)

### 1.4.1 Parabenos

Por serem incolores, inodoros, possuírem amplo espectro de ação e serem de baixo custo, os parabenos são os conservantes mais utilizados no mundo (50, 53). Eles têm sido utilizados em alimentos, cosméticos e medicamentos tópicos e sistêmicos desde 1930 (50). Normalmente, os parabenos estão presentes em 10% dos cosméticos e sua concentração pode variar de acordo com o produto, não excedendo 1% da formulação (54). Tanto a União Europeia quanto a ANVISA permitem a utilização de, no máximo, 0,4% de cada parabeno e quando eles estão associados, a concentração máxima permitida é de 0,8% (55-56).

O primeiro caso de dermatite de contato por parabenos foi registrado em 1940 (50). Um estudo classificou estes conservantes como os alergênicos mais comuns (43% dos casos) em crianças indianas com dermatite de contato (57). Pessoas com mais de 60 anos são as mais propensas a desenvolver reações alérgicas a esses excipientes (58).

Parabenos são alquil ésteres de ácido *p*-hidroxibenzoico, como o metil, etil, propil, isobutil e butil parabenos, que agem inibindo o transporte da membrana celular ou a função mitocondrial de leveduras e atuam tanto na fase germinativa quanto na vegetativa de microrganismos (54). O propilparabeno altera a permeabilidade da membrana celular bacteriana, favorecendo a liberação de potássio. Essas alterações na membrana podem favorecer mudanças mitocondriais levando a morte da bactéria (59). Quanto maior o comprimento da cadeia do grupo éster, maior a sua atividade antimicrobiana e menor sua hidrossolubilidade. Esses excipientes são mais ativos contra fungos que bactérias, e entre as bactérias são mais ativos contra as Gram positivas (54). Os menores ésteres, ou seja, os mais hidrofílicos, como o metil e o etil parabeno são associados aos maiores, ou mais lipofílicos, como o propil e o butil parabeno, para permitir maior eficiência na conservação dos produtos (60).



**Figura 1 – Estrutura química do metilparabeno e do propilparabeno.**

Fonte: Sítio eletrônico da empresa Sigma-Aldrich (61-62)

Alguns indivíduos apresentam uma situação conhecida como o paradoxo dos parabenos. Nessa situação a pessoa pode utilizar os cosméticos contendo esse excipiente sem apresentar problemas. No entanto, pode desenvolver dermatite de contato e inflamação quando exposta a medicamentos com parabenos. Durante a utilização dos medicamentos, os conservantes possuem maior facilidade em sensibilizar a pele, pois os medicamentos são, geralmente, aplicados na pele já inflamada ou danificada, enquanto que os cosméticos são aplicados na pele íntegra (63).

Os principais parabenos utilizados na manipulação de produtos de higiene e cosméticos são o propilparabeno e o metilparabeno (55). Soluções aquosas com o pH igual ou superior a 7 e 8 geram rápida hidrólise do propilparabeno e metilparabeno, respectivamente, a ácido *p*-hidroxibenzoico (54-55), e a resistência à hidrólise é maior com o aumento da cadeia alquil (64).

Os parabenos são rapidamente absorvidos pela pele e tem-se sugerido que o metabolismo dessas substâncias por esterases da pele é incompleto. Estudos *in vitro* demonstraram que 30% do propilparabeno era absorvido pela pele de ratos de forma inalterada. Após 8 horas essa concentração chegava a 60% para metilparabeno e 40% para etilparabeno em pele de coelhos. Outros estudos concluíram que o metabolismo por esterases na pele de humanos é mais lento que em pele de ratos. Uma hora após a aplicação tópica de cremes contendo parabenos em humanos, podem-se encontrar essas substâncias no soro e, 8 a 12 horas após a aplicação, os parabenos foram encontrados na urina. Isso indica que esses conservantes são absorvidos de forma sistêmica e eliminados na forma inalterada (55).

Os parabenos são considerados como agonistas totais dos receptores de estrogênios (ER) (55). Quanto maior a cadeia alquil, maiores são os efeitos estrogênicos (60). Além disso, o metabólito ácido *p*-hidroxibenzoico também possui esse efeito. Os parabenos podem, ainda, inibir a enzima sulfotransferase, que catalisa a sulfatação de estrogênios livres, aumentando indiretamente os níveis de estrogênio livre (55).

Um estudo *in vitro* demonstrou que os parabenos aumentam tanto a expressão gênica quanto a multiplicação de células humanas de câncer de mama. Assim, tem-se sugerido que os parabenos são iniciadores ou promotores do câncer de mama (55, 65). Vários artigos têm demonstrado a capacidade dos parabenos em agirem como antagonistas de receptores androgênicos. Estudos em roedores jovens com uma dieta de propilparabeno e butilparabeno apresentaram alterações nas funções reprodutivas, como na espermatogênese e na secreção de testosterona (55). Em ratos machos, os parabenos provocaram diminuição dose-dependente do peso do epidídimo e da próstata e redução na produção de esperma (66). Porém, o ácido *p*-hidroxibenzoico apresentou fraca atividade anti-androgênica, corroborando com a ideia de que grande parte dos parabenos pode não sofrer metabolização. Apesar desses achados, o mecanismo de ação dos parabenos como antagonistas de receptores androgênicos e sua função na alteração da capacidade reprodutiva ainda não está bem esclarecido (55, 66). A exposição de ratos fêmeas ao butilparabeno (via subcutânea) durante a gestação e lactação afetou o desenvolvimento de órgãos reprodutivos e a contagem de espermatozoides nos filhotes (67).

A aplicação por um longo período de metilparabeno em queratinócitos promoveu alterações na taxa de proliferação celular, na morfologia celular, na expressão de enzimas e no colágeno. Essas mudanças indicam a influência que o metilparabeno pode ter no envelhecimento e na diferenciação de queratinócitos. O metilparabeno pode ainda potencializar os danos causados pela luz ultravioleta nos queratinócitos da pele através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico. Assim, a atividade agonista dos parabenos aos receptores de estrogênio associada aos danos da luz ultravioleta podem favorecer o desenvolvimento de melanomas malignos (55).

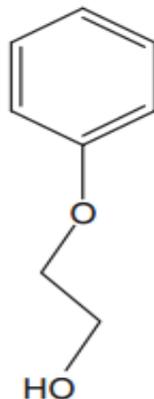
Algumas pesquisas têm relatado a capacidade do propilparabeno e do butilparabeno em causar danos ao DNA. Apesar desses estudos terem sido

realizados com altas concentrações de conservantes, ainda existe a possibilidade de doses menores promoverem algum efeito mutagênico e carcinogênico (55). Estudos *in vitro* sugerem que o butilparabeno pode atuar ainda como agonista do receptor tireoideano. Porém, ensaios *in vivo* não demonstraram alterações dos níveis hormonais. De qualquer modo, pode-se perceber que os parabenos podem atuar em diversos tecidos e com diferentes mecanismos de ação em cada um deles e, por esse motivo, seu uso deve ser muito bem controlado (67).

Outro aspecto importante sobre o uso dos parabenos é a resistência de alguns microrganismos a este conservante. Um exemplo é o *Enterobacter gergoviae* que pode desenvolver um mecanismo de resistência a parabenos que foi apresentada pela modificação do efluxo de potássio. Davin-Regli e colaboradores, em 2006, encontraram que o efluxo de potássio de *E. gergoviae* sensíveis e resistentes a parabenos eram bastante diferentes, sendo que nas cepas sensíveis a taxa de efluxo de potássio era cerca de 5 vezes maior que nas cepas resistentes. Os autores sugeriram que, como a atividade dos parabenos se dá pela modificação da integridade da membrana dos microrganismos, os mecanismos de resistência encontrados nas cepas de *E. gergoviae*, que resultaram na modificação da expressão da bomba de efluxo de potássio e na expressão de esterase no periplasma, protegeram eficientemente este microrganismo da atividade do propilparabeno (68). Os autores, em trabalho publicado por Bredin e colaboradores em 2005, citaram, ainda, que o propilparabeno induzia efluxo de potássio em *E. coli*, sugerindo que os parabenos podem mimetizar a atividade de proteínas formadoras de poros nas membranas, as polimixinas, que induzem a liberação de potássio a partir da célula alvo. Este efluxo de potássio é o primeiro indício de extravasamento da membrana bacteriana induzida pelo propilparabeno, que promove a permeabilização de membrana, causando a liberação de moléculas intracelulares, e a alteração de potencial das membranas, que é a cascata de eventos que se supõe que ocorra na atividade antimicrobiana dos parabenos (59).

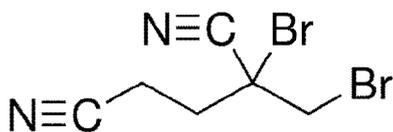
### 1.4.2 Fenoxietanol / Metildibromoglutaronitrila

O fenoxietanol é um conservante que age em bactérias Gram positivas, Gram negativas, bolores e leveduras, cuja concentração máxima permitida para uso em cosméticos é de 1% (69). Normalmente, o fenoxietanol encontra-se associado à metildibromoglutaronitrila (1,2-dibromo-2,4-dicianobutano) na proporção de 1:4 (metildibromoglutaronitrila : fenoxietanol), comercialmente conhecido como Euxyl K 400<sup>®</sup>. A associação foi introduzida no comércio Europeu em 1985 e no Norte Americano só em 1990 (50). Na América do Norte, sua utilização é restrita a produtos de higiene pessoal e cosméticos em concentrações entre 0,0075 e 0,06% (50). A ANVISA autoriza a utilização de fenoxietanol na concentração máxima de 1% enquanto que a concentração de uso permitida para a metildibromoglutaronitrila é de 0,1% (5, 10, 56).



**Figura 2 – Estrutura química do fenoxietanol**

Fonte: Meyer, 2007 (70)



**Figura 3 – Estrutura química do metildibromoglutaronitrila**

Fonte: Sítio eletrônico da empresa Sigma-Aldrich (71)

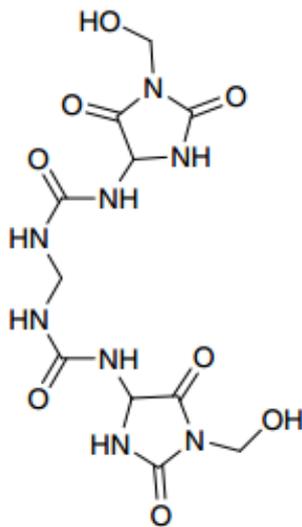
Devido ao aumento da utilização de metildibromoglutaronitrila na indústria cosmética, os níveis médios registrados de reações alérgicas aumentaram de 0,7%

para 2,4-4%, no período de 1990 a 2000, em pacientes com dermatite de contato na Turquia (9). A partir de 2004/2005 o número de reações alérgicas à metildibromoglutaronitrila no Reino Unido começou a diminuir (2,4% em 2000 para 1,1% em 2005), provavelmente devido à proibição de sua utilização em produtos para uso sem enxágue, em 2003, e em produtos para uso com enxágue, em 2007, pela União Europeia (52, 72). Entre 159 pacientes alérgicos à associação, apenas 2,7% apresentavam alergia apenas ao fenoxietanol, ou seja, o principal causador de reações alérgicas era a metildibromoglutaronitrila (73). O fenoxietanol é considerado um alérgeno extremamente raro. Já a metildibromoglutaronitrila foi considerada o alérgeno do ano em 1989 (72). Normalmente, a dermatite nas mãos é devido à utilização de sabonetes com Euxyl K 400<sup>®</sup> (50).

Pacientes que tiveram alergia de contato devido a 0,1% de metildibromoglutaronitrila presente em um sabonete líquido e foram submetidos a uma nova exposição a esse alérgeno, após um mês do primeiro contato, tiveram reações alérgicas amplificadas (74).

### **1.4.3 Imidazolidinil ureia**

Imidazolidinil ureia é o segundo conservante mais utilizado do mundo. Tem sido utilizado desde 1970 contra bactérias Gram positivas e negativas. Normalmente é associada aos parabenos para ampliar o espectro de ação deste conservante. A concentração utilizada em cosméticos varia de 0,03 a 0,2% e a concentração máxima permitida, tanto na União Europeia quanto no Brasil, é 0,6% (50, 56, 75). Esse conservante é composto por 10% de 4-hidroximetil-2,5-dioxo-imidazolidin-4-il-ureia (imidazolidinil), 20% de alantoína, 10% de dois compostos não identificados (prováveis doadores de formaldeído) e 60% de polímeros decorrentes da condensação de alantoína-formaldeído. Esse composto participa do grupo de conservantes doadores de formaldeído (75). A imidazolidinil ureia pode sofrer hidrólise, liberando cerca de 75% de formaldeído, que possui potente atividade antimicrobiana (75-76).



**Figura 4 – Estrutura química da imidazolidinil ureia (4-hidroximetil-2,5-dioxo-imidazolidin-4-il-ureia).**

Fonte: Lehmann, 2006 (76)

Nos Estados Unidos, um em cada seis cosméticos sem enxágue possui doadores de formaldeído como conservantes e, nos produtos com enxágue, esse tipo de conservante é usado em cerca de 25% dos produtos. Entre o grupo de conservantes doadores de formaldeído, a imidazolidinil ureia é o de uso mais frequente desde 1996, de acordo com a base de dados do FDA, apesar de ter havido uma diminuição de sua utilização com o tempo. Em 1996 esse conservante era usado em 13% dos cosméticos e produtos de higiene e, em 2008, seu uso diminuiu para 7% dos produtos. Em um estudo realizado em 2005 na Dinamarca, após uma análise de dados dos produtos registrados no PROBAS (*Danish Product Register Database*), foi observado que dentre 1.170 cosméticos e produtos de higiene pessoal registrados, 15,7% possuíam imidazolidinil ureia como conservante (75).

As reações alérgicas à imidazolidinil ureia estão crescendo muito, mas não estão muito associadas ao formaldeído liberado (52, 72). Um estudo realizado em pele de porco demonstrou que pouco formaldeído permeia a pele e o próprio conservante é que possui atividade alergênica. Entre pacientes que apresentavam reações a esse conservante, apenas 39% possuíam reações concomitantes ao formaldeído (77). A maioria das reações alérgicas é observada na face dos

pacientes, permitindo uma relação das reações alérgicas com o uso de cosméticos que contêm esse conservante (72).

Estudos em pacientes com suspeita de dermatite de contato nos Estados Unidos, entre os anos de 1992 a 2005, demonstraram que 1,3% a 3,3% dos pacientes apresentaram sensibilização devido à presença da imidazolidinil ureia. Já na Europa esse índice foi de 0,3% a 1,4% dos pacientes analisados em 2000 e de 2004 a 2005 (75).

Estudos têm demonstrado os mecanismos de resistência de alguns microrganismos a antibióticos, mas pouco se sabe a respeito da resistência de microrganismos a conservantes antimicrobianos. Resistência intrínseca a antibióticos em bactérias Gram negativas, sem mutação cromossômica ou aquisição de modificações genéticas que codificam para elementos determinantes de resistência, pode ser aumentada evitando que o antibiótico entre na célula. Isto pode ser conseguido através do controle da permeabilidade da membrana da célula e pela eficácia do efluxo ativo de antimicrobianos (78). A superexpressão de bombas de efluxo em bactérias Gram negativas resulta em um fenótipo resistente a multidrogas (MDR) conhecido por ser uma forma predominante de resistência clínica a antibióticos (79). Vários trabalhos têm mostrado que as modificações da permeabilidade de membrana e da expressão da bomba de efluxo também conferem resistência dos microrganismos aos conservantes.

O uso indiscriminado de antibióticos tem contribuído para o aparecimento de microrganismos resistentes. Muitos esforços têm sido voltados para o entendimento dos processos de resistência dos microrganismos e para evitar o aparecimento de novos mecanismos de resistência. Porém, o uso de conservantes ainda é, muitas vezes, feito com certa displicência por parte de manipuladores não preparados para esta função, e isso pode gerar não só o aparecimento de novas cepas resistentes ou adaptadas, como oferecer um risco à saúde dos usuários dos produtos que contêm esses conservantes, pois estas são substâncias com certas características de toxicidade e alergenicidade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de sabonetes artesanais comercializados em feiras populares de Brasília, identificar e quantificar em suas composições alguns dos principais conservantes utilizados em produtos de higiene.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contagem de microrganismos viáveis nas amostras de sabonetes adquiridos nas feiras populares.
- Identificação da presença de patógenos específicos nos sabonetes.
- Avaliação do pH dos sabonetes.
- Avaliação qualitativa e quantitativa dos conservantes por cromatografia líquida de alta eficiência.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

Neste estudo foram utilizados reagentes de grau analítico nos ensaios. Os meios de cultura usados foram das marcas Acumedia<sup>®</sup> ou Himedia<sup>®</sup>.

Os seguintes microrganismos padrões foram utilizados como controle positivo para os ensaios de controle de qualidade microbiológico: *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923 (Gram positiva), *Escherichia coli* - ATCC 25922 (Gram negativa), *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 (Gram negativa).

Os padrões analíticos para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), metilparabeno, propilparabeno, imidazolidinil ureia, fenoxietanol e metildibromoglutaronitrila, foram adquiridos da Sigma-Aldrich com pureza igual ou superior a 99%. A coluna utilizada para a cromatografia foi uma coluna 250 x 4,6 mm SSWakosil C18RS 5 µm (Re-order Part no 206505 serial no F12-049 – marca SGE). Os solventes usados para a cromatografia líquida eram da marca JTBaker, solvente de grau HPLC, e a água usada no preparo do tampão era do tipo ultrapura.

Os sabonetes artesanais foram adquiridos de algumas feiras populares de Brasília, como a Feira da Lua, a Feira dos Importados e uma feira natalina.

Na Feira da Lua foram adquiridos 8 sabonetes, na Feira dos Importados foram obtidos 3 sabonetes e na feira natalina foram obtidos 4 sabonetes. As informações contidas nos rótulos dos sabonetes estão transcritas na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4 - Sabonetes artesanais analisados nos experimentos

	Local de aquisição	Aspectos organolépticos	Responsável técnico identificado	Data de fabricação	Data de validade	Composição descrita no rótulo*
I Sabonete de maracujá	Feira da Lua	Laranja e amarelo com sementes naturais de maracujá	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, extratos vegetais, semente desidratada, essência, corante
II Sabonete de morango com champagne	Feira da Lua	Vermelho	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, extratos vegetais, semente desidratada, essência, corante
III Sabonete de arruda e sal grosso	Feira da Lua	Formato de árvore, verde, presença de sal grosso e fitas de tecido ao redor-	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, extratos vegetais, semente desidratada, essência, corante
IV Sabonete de aveia e mel	Feira da Lua	Bege com flocos de aveia	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, extratos vegetais, semente desidratada, essência, corante
V Sabonete de leite de cabra	Feira da Lua	Branco	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, extratos vegetais, semente desidratada, essência, corante

Tabela 4 - Sabonetes artesanais analisados nos experimentos (continuação)

	Local de aquisição	Aspectos organolépticos	Responsável técnico identificado	Data de fabricação	Data de validade	Composição descrita no rótulo*
VI Sabonete de argila	Feira da Lua	Marrom-esverdeado	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, argila, centella asiática, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, essência.
VII Sabonete de melancia	Feira da Lua	Verde e vermelho com sementes	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, extratos vegetais, semente desidratada, essência, corante
VIII Sabonete de pêssego	Feira da Lua	Verde e vermelho	Sim	09/2010	03/2011	óleo de coco babaçu, massa base para sabonete, less, álcool, propilenoglicol USP, glicerina, acqua, ácido, aditrônico, NaCl, extratos vegetais, semente desidratada, essência, corante
IX Sabonete de algas marinhas	Feira dos Importados	Azul	Sim	06/2010	05 anos	Ausente
X Sabonete de segóvia	Feira dos Importados	Rosa	Sim	06/2010	05 anos	Ausente
XI Sabonete de bambu chinês	Feira dos Importados	Verde	Sim	06/2010	05 anos	Ausente

Tabela 4 - Sabonetes artesanais analisados nos experimentos (continuação)

	Local de aquisição	Aspectos organolépticos	Responsável técnico identificado	Data de fabricação	Data de validade	Composição descrita no rótulo*
XII Sabonete de morango	Feira Natalina	Vermelho, verde e rosa	Não	Ausente	Ausente	Ausente
XIII Sabonete com formato de sino	Feira Natalina	Branco, dourado e vermelho	Não	Ausente	Ausente	Ausente
XIV Sabonete em formato de hena	Feira Natalina	Marrom e amarelo	Não	Ausente	Ausente	Ausente
XV Sabonete com formato de boneco	Feira Natalina	Verde	Não	Ausente	Ausente	Ausente

\* Composição idêntica à contida no rótulo do produto

### 3.2 EQUIPAMENTOS

- Placa aquecedora Fisaton.
- Estufa MA033 – Marconi.
- Estufa FANEM Ltda – São Paulo.
- Geladeira Cônsul duplex *Frost Free* 420.
- Destilador de água - GFL 2008.
- Fluxo Laminar Labculture - ESCO Class II type A2.
- Balança eletrônica Marte<sup>®</sup> - modelo As 500C.
- Balança Analítica Chyo<sup>®</sup>.
- Autoclave Vertical Línea AV plus.
- Agitador de tubos vórtex Super Mixer, Lab-line instruments Inc.
- pH metro digital microprocessado DLA-PH DEL-LAB.
- Rotaevaporador Heidolph<sup>®</sup>.
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Shimadzu Class-VP, com detector espectrofotométrico UV-Visível.

### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 Avaliação do pH dos sabonetes

Uma alíquota de cada um dos sabonetes foi diluída em água destilada, numa concentração final de 10% (p/v), e teve seu pH determinado. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos como média aritmética das medidas  $\pm$  desvio padrão.

### 3.3.2 Avaliação da qualidade microbiana das formulações

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram o caldo e o ágar de caseína-soja para crescimento de bactérias viáveis e o ágar Sabouraud-dextrose para crescimento de bolores e leveduras. Para a pesquisa de patógenos específicos foram utilizados o caldo tetracionato, o caldo lactosado, o caldo de caseína-soja, o ágar Verde Brilhante, o ágar Cetrimida, o ágar MacConkey e ágar Baird Parker. Todos os meios de cultura foram preparados a partir do meio de cultura desidratado e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### 3.3.2.1 Determinação quantitativa de microrganismos viáveis nos sabonetes

A contagem de bactérias mesófilas e bolores e leveduras foi efetuada pelo método convencional de semeadura em superfície usando um diluente para inativar o sistema conservante. Amostras de 1 g de sabonetes foram solubilizadas no diluente, uma solução neutralizadora de conservantes, composto por 2,0% de polissorbato 80, 0,6% de lecitina de soja, 1,0% de glicina e 0,5% de sulfito de sódio em solução fisiológica. A função de cada composto neutralizador está indicada na Tabela 5. As amostras foram submetidas à diluição seriada na solução neutralizadora e inoculadas nos meios de cultura apropriados.

No caso das bactérias mesófilas, as amostras foram inoculadas em placas de ágar caseína-soja, incubadas a 37°C e examinadas diariamente até 48 horas. A contagem de bolores e leveduras foi executada por semeadura das amostras em placa de ágar Sabouraud-dextrose, incubadas a 30°C por 7 dias e analisadas diariamente.

**Tabela 5 - Função das substâncias utilizadas na solução neutralizante**

Composto	Concentração	Tipo de Conservante Neutralizado
Polissorbato 80	2,0%	Compostos de amônio quaternário, parabens
Lecitina de soja	0,6%	Compostos de amônio quaternário, bis-guanidas, parabens
Glicina	1,0%	Aldeídos

Fonte: Farmacopeia Brasileira e Europeia (1, 80)

### 3.3.2.2 Pesquisa de patógenos específicos

#### 3.3.2.2.1 Enriquecimento em meios não seletivos

Amostras dos sabonetes artesanais foram solubilizadas na solução neutralizadora descrita anteriormente e inoculadas em caldo lactosado e caldo de caseína e soja. Após incubação a 37° C por 48 horas, alíquotas dos caldos foram inoculadas por esgotamento em meios seletivos de diferenciação para pesquisa de patógenos específicos.

#### 3.3.2.2.2 Determinação qualitativa da presença de *Pseudomonas aeruginosa*

Uma alíquota da cultura de enriquecimento em caldo de caseína e soja foi inoculada por esgotamento em meio ágar Cetrimida e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após este período, foi avaliado o crescimento de colônias com coloração esverdeada (Figura 5) (13).

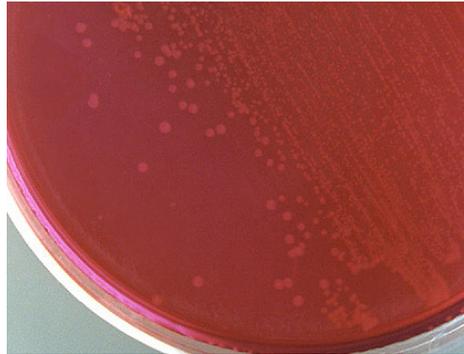


Figura 5 - Cultura de *P. aeruginosa* em ágar Cetrimida

#### 3.3.2.2.3 Determinação qualitativa da presença de *Salmonella* sp.

Uma alíquota da cultura de enriquecimento em caldo lactosado foi inoculada por esgotamento em meio ágar Verde Brilhante. Outra amostra do sabonete foi solubilizada no diluente descrito anteriormente e inoculada em caldo tetracionato, meio de enriquecimento seletivo. Uma alíquota do caldo tetracionato foi inoculada

por esgotamento em meio ágar Verde Brilhante. Após a inoculação, o meio ágar Verde Brilhante foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após este período, foi avaliado o crescimento de colônias pequenas, transparentes, sem cor ou com coloração de rosa a branco opaco, frequentemente cercadas por um halo com coloração rosa a vermelha (Figura 6) (13).



**Figura 6 - Cultura de *Salmonella* sp em ágar Verde Brilhante**

#### 3.3.2.2.4 Determinação qualitativa da presença de *Staphylococcus aureus*

Uma alíquota da cultura de enriquecimento em caldo de caseína e soja foi inoculada por esgotamento em meio ágar Baird-Parker e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após este período, foi avaliado o crescimento de colônias pretas brilhantes cercadas por halos claros de 2 a 5 mm (Figura 7) (13).



**Figura 7 - Cultura de *Staphylococcus aureus* em meio ágar Baird-Parker**

### 3.3.2.2.5 Determinação qualitativa da presença de *Escherichia coli*

Uma alíquota da cultura de enriquecimento em caldo lactosado foi inoculada por esgotamento em meio ágar MacConkey, e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após este período, foi avaliado o crescimento de colônias com coloração vermelho-tijolo, geralmente não mucosas (Figura 8) (1, 13).



Figura 8- Cultura de *Escherichia coli* em meio ágar MacConkey

Um resumo do ensaio para avaliação da presença de patógenos está esquematizado na Figura 9.

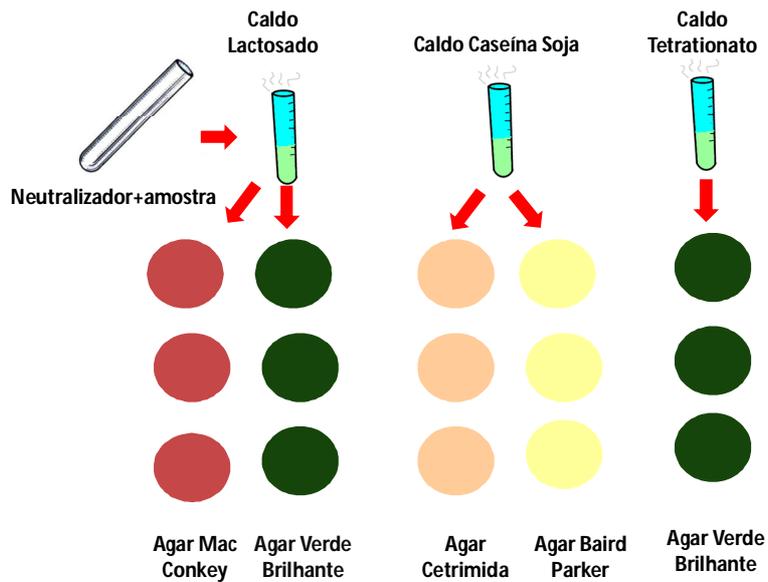


Figura 9 - Fluxograma do ensaio de avaliação da presença de patógenos específicos nos sabonetes.

#### 3.3.2.2.6 Determinação quantitativa da presença de bactérias fermentadoras de lactose.

Amostras de 1 grama dos sabonetes foram solubilizadas em solução neutralizadora de conservantes e inoculadas em 3 séries de 5 tubos de ensaio com caldo lactosado, de modo a obter séries de diluições decimais, contendo tubos de Durhan invertidos. Os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas e a presença de bactérias fermentadoras de lactose foi avaliada pela produção de gás, observado dentro dos tubos de Durhan. O número de tubos positivos em cada série de diluição foi determinado e os resultados comparados com a tabela de Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais por g ou mL de amostra, disponível na Farmacopeia Brasileira (Anexo A) (1).

#### **3.3.3 Determinação quantitativa dos conservantes metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol, metildibromoglutaronitrila e imidazolidinil ureia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Amostras dos sabonetes foram diluídos em água e submetidos a uma extração líquido-líquido com acetato de etila. Após as extrações, as amostras foram concentradas em rotaevaporador e as amostras obtidas foram solubilizadas em metanol.

Essas amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e aplicadas a uma coluna 250 x 4,6 mm SSWakosil C18RS 5 µm em sistema de CLAE e eluídas por uma fase móvel composta por tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 3,5 e metanol, em sistema gradiente com um fluxo de 1 mL/min. O sistema gradiente utilizado está descrito na Tabela 6. A eluição foi acompanhada por detecção em espectrofotômetro UV/VIS a 220 nm. Padrões de conservantes em diferentes concentrações foram aplicados à mesma coluna e eluídos com a mesma fase móvel para traçar uma curva padrão para cada um desses conservantes. As curvas padrões foram plotadas na forma de concentração dos conservantes *versus* a área sob a curva dos cromatogramas obtidos para cada concentração de conservante.

**Tabela 6 - Gradiente da fase móvel utilizado na eluição das amostras e conservantes na CLAE.**

<b>Tampão fosfato de sódio 25 mM pH 3,5 (%)</b>	<b>Metanol (%)</b>	<b>Tempo (minutos)</b>
60	40	05
50	50	10
40	60	15
30	70	20
20	80	25
60	40	30

A validação do método foi feita pela avaliação dos parâmetros: seletividade, linearidade, recuperação, precisão inter e intra-dia.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DO pH DOS SABONETES ARTESANAIS

Os resultados da avaliação do pH dos sabonetes artesanais estão apresentados na tabela 7. Eles indicam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 determinações distintas.

**Tabela 7 - pH dos sabonetes artesanais**

<b>Sabonetes</b>	<b>pH</b>
I	9,75 $\pm$ 0,037
II	9,83 $\pm$ 0,041
III	9,41 $\pm$ 0,087
IV	9,64 $\pm$ 0,005
V	9,83 $\pm$ 0,026
VI	9,93 $\pm$ 0,040
VII	9,76 $\pm$ 0,023
VIII	9,80 $\pm$ 0,055
IX	9,72 $\pm$ 0,040
X	9,78 $\pm$ 0,020
XI	9,85 $\pm$ 0,017
XII	9,91 $\pm$ 0,101
XIII	9,85 $\pm$ 0,091
XIV	9,55 $\pm$ 0,034
XV	9,74 $\pm$ 0,025

## 4.2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NOS SABONETES

A contagem do número de bactérias mesófilas e do número de bolores e leveduras obtidas para os sabonetes testados estão apresentados na Tabela 8. Os ensaios foram realizados em triplicata e a tabela apresenta a média dos resultados obtidos.

**Tabela 8 - Contagem de bactérias mesófilas totais e de bolores e leveduras nos sabonetes artesanais.**

Sabonetes	Média da contagem de bactérias mesófilas totais (UFC/g de sabonete)	Média da contagem de bolores e leveduras (UFC/g de sabonete)
I	995**	371**
II	682**	0*
III	394**	700**
IV	1.245**	0*
V	1.046**	0*
VI	386**	77**
VII	467**	343**
VIII	1.034**	7*
IX	1.431**	45**
X	901**	0*
XI	529**	1044**
XII	443**	39**
XIII	455**	0*
XIV	587**	4*
XV	679**	110**

Legenda: UFC, Unidades Formadoras de Colônia; \*, atende as especificações da Farmacopeia Brasileira - V edição; \*\*, não atende as especificações da Farmacopeia Brasileira - V edição.

### 4.3 PESQUISA DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

Conforme ilustrado na Tabela 9, não houve crescimento de colônias com características típicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. nos sabonetes testados. Porém, houve crescimento de colônias no meio ágar MacConkey, sugerindo a presença de *Escherichia coli* nos sabonetes III, V, VI e VIII.

Houve também um crescimento de algumas colônias com características diferentes das colônias típicas de *E. coli* no meio de cultura ágar MacConkey dos sabonetes I, III, IV, VI, VII e VIII. O mesmo ocorreu no meio de cultura ágar Verde Brilhante para os sabonetes III e VIII, indicando o crescimento de bactérias, mas sem as características típicas das colônias de *Salmonella* sp.

**Tabela 9 - Presença de colônias características de *Escherichia coli* nos sabonetes artesanais**

Sabonetes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
I	-	-	-	-
II	-	-	-	-
III	-	-	+	-
IV	-	-	-	-
V	-	-	+	-
VI	-	-	+	-
VII	-	-	-	-
VIII	-	-	+	-
IX	-	-	-	-
X	-	-	-	-
XI	-	-	-	-
XII	-	-	-	-
XIII	-	-	-	-
XIV	-	-	-	-
XV	-	-	-	-

Legenda: -, ausência de colônias típicas; +, presença de colônias típicas.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE LACTOSE

A produção de gás, observada nos tubos de Durhan invertidos dentro dos tubos de ensaio com caldo lactosado, foi o indicativo da presença de bactérias fermentadoras de lactose nos sabonetes estudados. A Tabela 10 mostra o resultado da quantificação dessas bactérias, através do método do Número Mais Provável (NMP). Os ensaios foram realizados em triplicata, indicados pelos ensaios 1, 2 e 3. Os sabonetes II, III, IX e XV apresentaram o maior número de bactérias fermentadoras de lactose por grama de produto.

**Tabela 10 - Determinação do número mais provável de bactérias fermentadoras de lactose nos sabonetes artesanais**

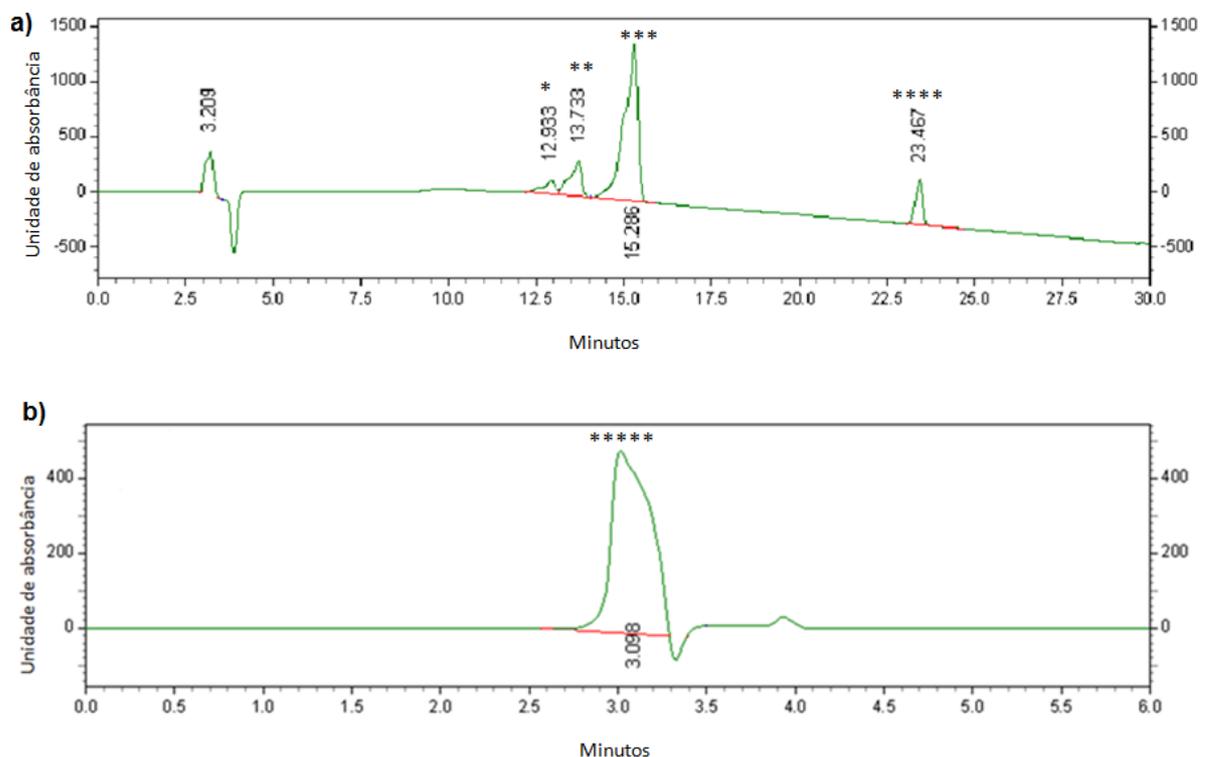
Sabonetes	Determinação do Número Mais Provável de microrganismos fermentadores de lactose para limite de confiança de 95%					
	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	NMP	Limites inferior / superior	NMP	Limites inferior / superior	NMP	Limites inferior / superior
I	□ 2	□ 0,5/-	4	□ 0,5/11	□ 2	□ 0,5/-
II	2	□ 0,5/7	2	□ 0,5/7	4	□ 0,5/11
III	4	□ 0,5/11	6	□ 0,5/15	□ 2	□ 0,5/-
IV	2	□ 0,5/7	2	□ 0,5/7	□ 2	□ 0,5/-
V	□ 2	□ 0,5/-	□2	□ 0,5/-	□ 2	□ 0,5/-
VI	□ 2	□ 0,5/-	□2	□ 0,5/-	2	□ 0,5/7
VII	□ 2	□ 0,5/-	□2	□ 0,5/-	□ 2	□ 0,5/-
VIII	□ 2	□ 0,5/-	□2	□ 0,5/-	□ 2	□ 0,5/-
IX	□ 2	□ 0,5/-	4	□ 0,5/11	5	□ 0,5/13
X	□ 2	□ 0,5/-	2	□ 0,5/7	2	□ 0,5/7
XI	□ 2	□ 0,5/-	2	□ 0,5/7	□ 2	□ 0,5/-
XII	2	□ 0,5/7	□2	□ 0,5/-	□ 2	□ 0,5/-
XIII	□ 2	□ 0,5/-	□2	□ 0,5/-	4	□ 0,5/11
XIV	4	□ 0,5/11	□2	□ 0,5/-	□ 2	□ 0,5/-
XV	□ 2	□0,5/-	4	□ 0,5/11	4	□ 0,5/11

Legenda: NMP, Número Mais Provável de UFC/g de sabonete

#### 4.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS CONSERVANTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Antes da avaliação da presença dos conservantes metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol e metildibromoglutaronitrila nos sabonetes, uma validação do método de análise foi feita por avaliação dos parâmetros seletividade, linearidade, precisão inter e intra-dia e recuperação.

O cromatograma obtido para o ensaio realizado com a aplicação dos padrões analíticos dos conservantes está apresentado na Figura 10.



**Figura 10 - Cromatogramas dos conservantes em estudo**

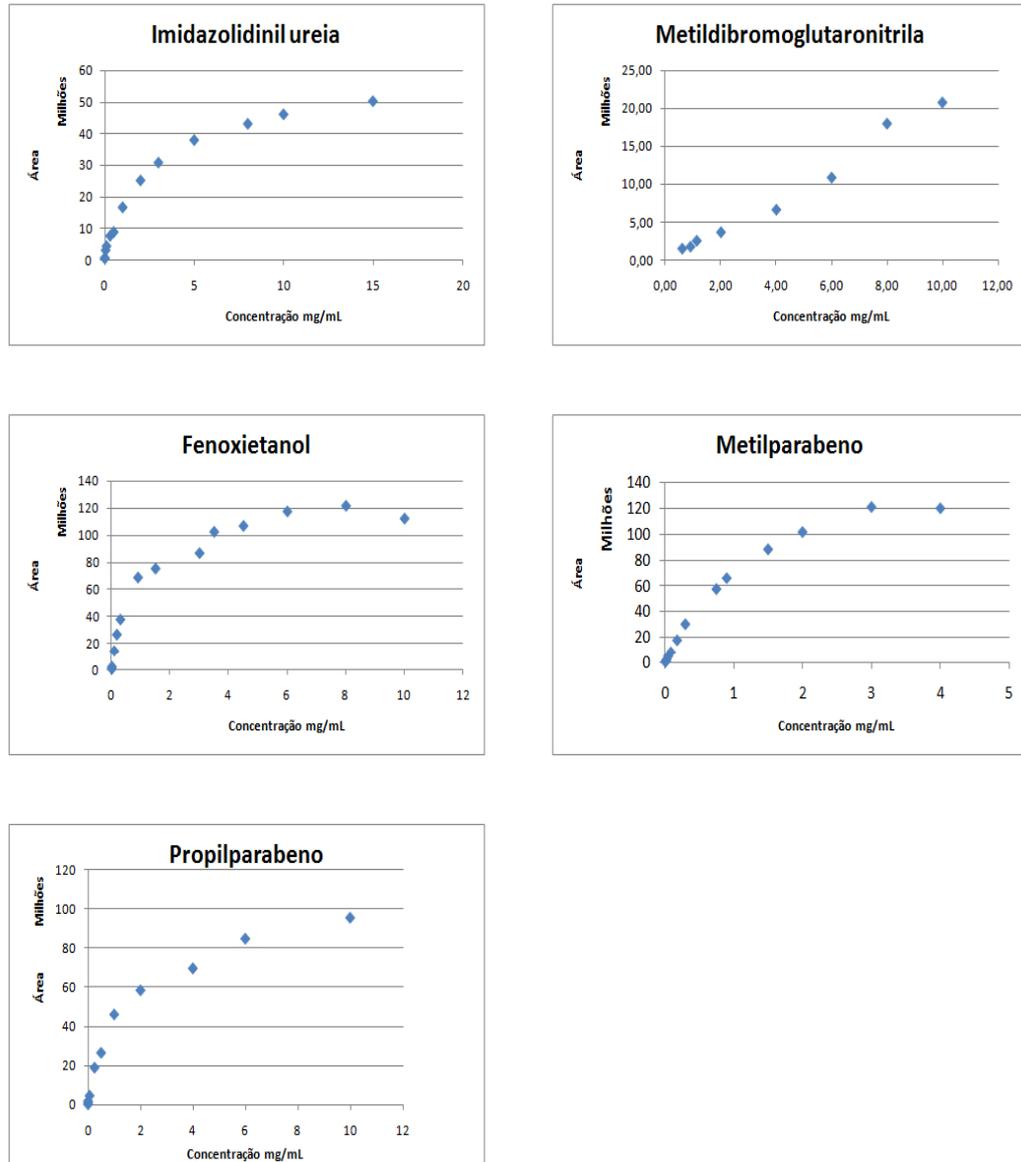
Cromatogramas obtidos por aplicação dos conservantes padrões em um sistema de CLAE em uma coluna 250 x 4,6 mm SS Wakosil C18RS 5  $\mu$ m e eluídos por uma fase móvel composta por tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 3,5 e metanol em sistema gradiente com um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi acompanhada por detecção em espectrofotômetro a 220 nm. a) metildibromoglutaronitrila\*, fenoxietanol\*\*, metilparabeno\*\*\* e propilparabeno\*\*\*\*. b) imidazolidinil ureia\*\*\*\*\*.

Pode-se observar pelos diferentes tempos de retenção dos conservantes (Tabela 11) que o método foi seletivo para os diferentes conservantes analisados.

**Tabela 11 - Tempo de retenção dos conservantes**

Conservante	Tempo de retenção (minutos)
Imidazolidinil ureia	2,98 ± 0,04
Metildibromoglutaronitrila	12,83 ± 0,11
Fenoxietanol	13,61 ± 0,10
Metilparabeno	15,24 ± 0,09
Propilparabeno	23,39 ± 0,07

Uma curva padrão foi feita com diferentes concentrações dos padrões de cada conservante. As curvas padrões podem ser vistas na Figura 11.



**Figura 11 - Curvas padrões dos conservantes.**

As faixas de linearidade de cada um dos conservantes usados como padrão analítico, assim como as curvas obtidas para o intervalo escolhido podem ser vistos na tabela 12 e figura 12.

**Tabela 12 - Faixa de linearidade e reta obtida para cada conservante**

Padrões analíticos dos conservantes	Intervalo de linearidade (µg/mL)	Curva obtida para o intervalo de linearidade (y = ax+b)	R <sup>2</sup>
Imidazolidinil ureia	60-1000	y = 14.675.532,43x + 769.429,89	1
Metildibromoglutaronitrila	250-2000	y = 1.535.263,09x - 442.932,93	0,96
Fenoxietanol	12,5-200	y = 36.126.921,76x - 212.464,94	0,99
Metilparabeno	125-2000	y = 17.966.304,93x + 882.656,88	1
Propilparabeno	60-1000	y = 4.571.268,12x + 118.231,61	1

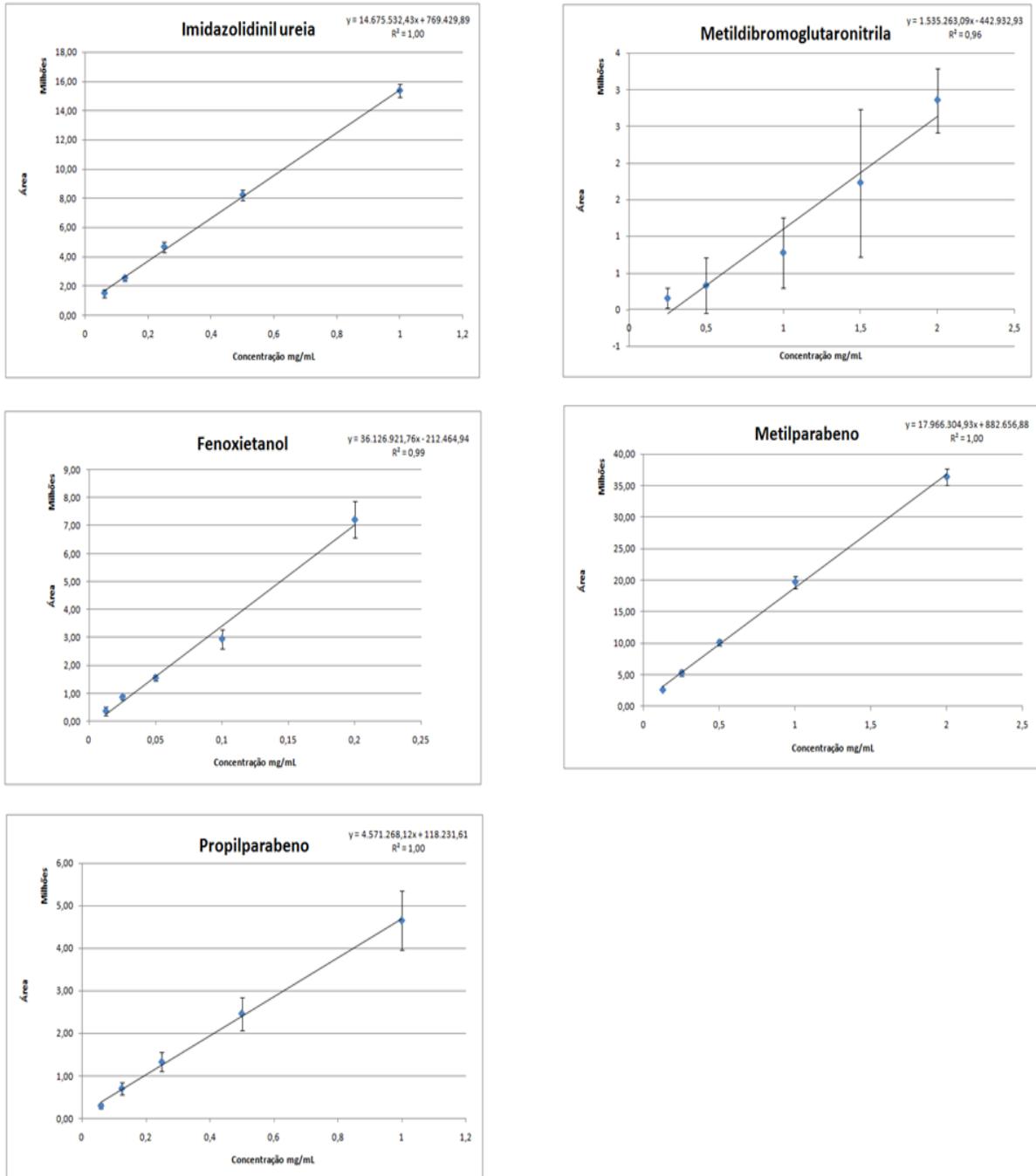


Figura 12- Linearidade e equação da reta dos conservantes.

A precisão foi determinada pelo estudo da repetitividade do método analítico, através da avaliação do coeficiente de variação obtido entre as medidas de 5 concentrações distintas, dentro da faixa de linearidade, repetidas no mesmo dia

(intradia) e a precisão intermediária foi avaliada com a repetição do ensaio em, pelo menos, 3 dias distintos (inter-dia). Foram realizadas 3 replicatas para cada concentração no ensaio intradia e 3 replicatas nos ensaios inter-dia. Os resultados podem ser vistos na Tabela 13.

**Tabela 13 – Precisão da análise dos conservantes nas diferentes concentrações.**

Padrões analíticos dos conservantes	Concentrações analisadas (µg/mL)	Precisão	
		Repetitividade intradia CV (%)	Repetitividade inter-dia CV (%)
Imidazolidinil ureia	60	17,36	6,03
	125	6,21	0,22
	250	7,71	0,87
	500	4,65	0,13
	1000	2,93	0,12
Metildibromoglutaronitrila	250	8,72	18,91
	500	7,31	19,03
	1000	7,49	19,45
	1500	7,61	18,51
	2000	19,09	17,17
Fenoxietanol	12,5	8,08	19,82
	25	2,29	9,53
	50	4,61	6,87
	100	2,85	10,87
	200	4,74	7,77
Metilparabeno	125	2,89	6,23
	250	0,52	8,39
	500	0,63	4,34
	1000	0,41	4,79
	2000	1,01	3,62
Propilparabeno	60	0,18	19,40
	125	1,51	19,21
	250	0,39	16,84
	500	0,26	15,67
	1000	1,05	14,92

Legenda: CV, coeficiente de variação (desvio padrão/média x 100).

A recuperação do conservante da amostra pelo método de partição líquido-líquido com acetato de etila também foi avaliada antes da análise dos conservantes dos sabonetes artesanais. Para isso, uma concentração conhecida de conservante

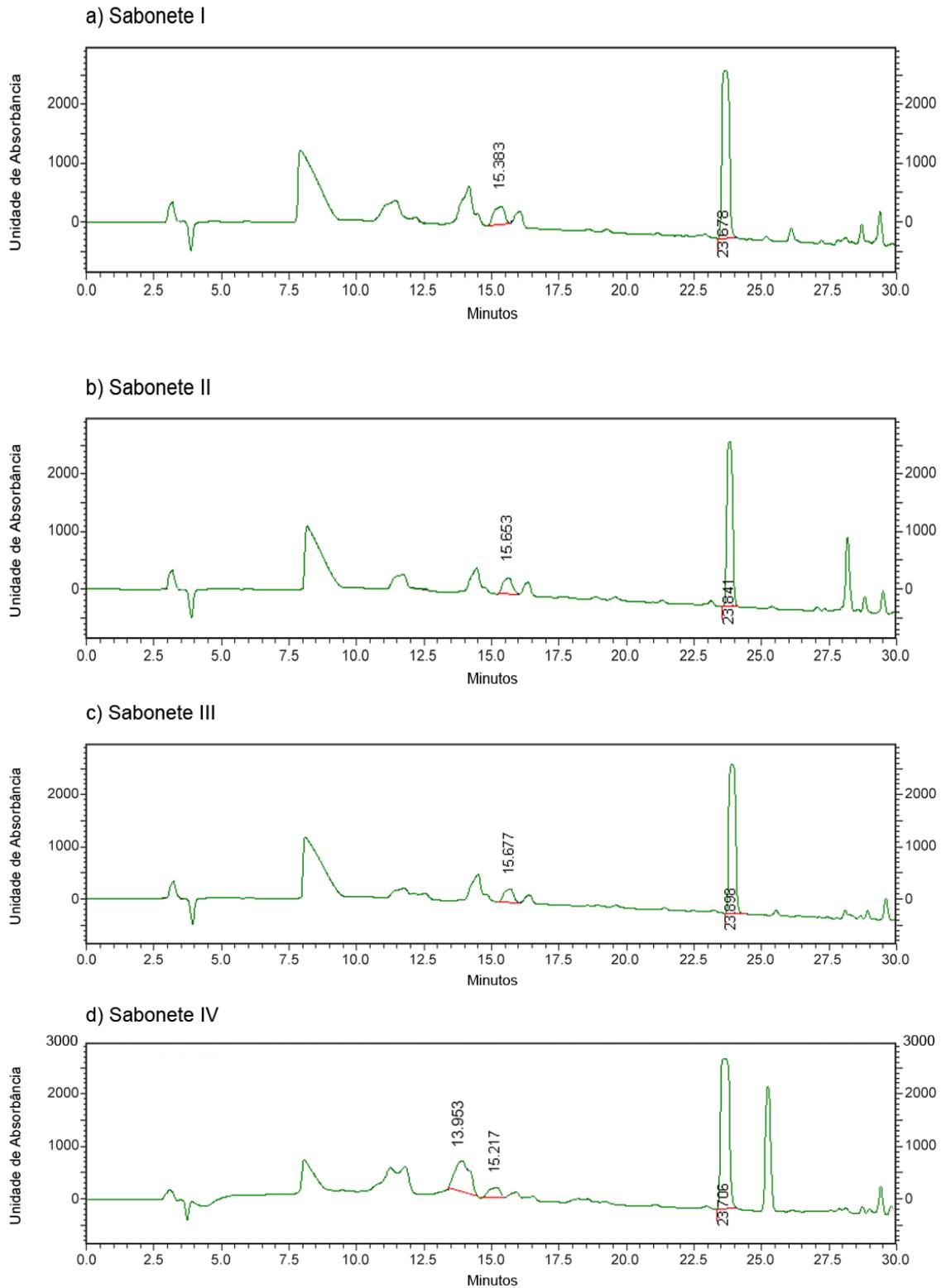
padrão foi adicionada a uma amostra de sabonete (fortificação) e esta foi submetida ao processo de extração para verificação da eficácia do processo de recuperação. O método foi considerado adequado para a extração dos conservantes das amostras.

Após a validação do método de análise, amostras dos sabonetes artesanais foram analisadas para identificação e quantificação dos conservantes presentes.

Conforme apresentado na Tabela 14, todos os sabonetes apresentaram a presença de metilparabeno e propilparabeno. Apenas o sabonete IV continha fenoxietanol em uma concentração menor que 0,1%. Nas figuras 13 a 16 estão apresentados os cromatogramas dos sabonetes.

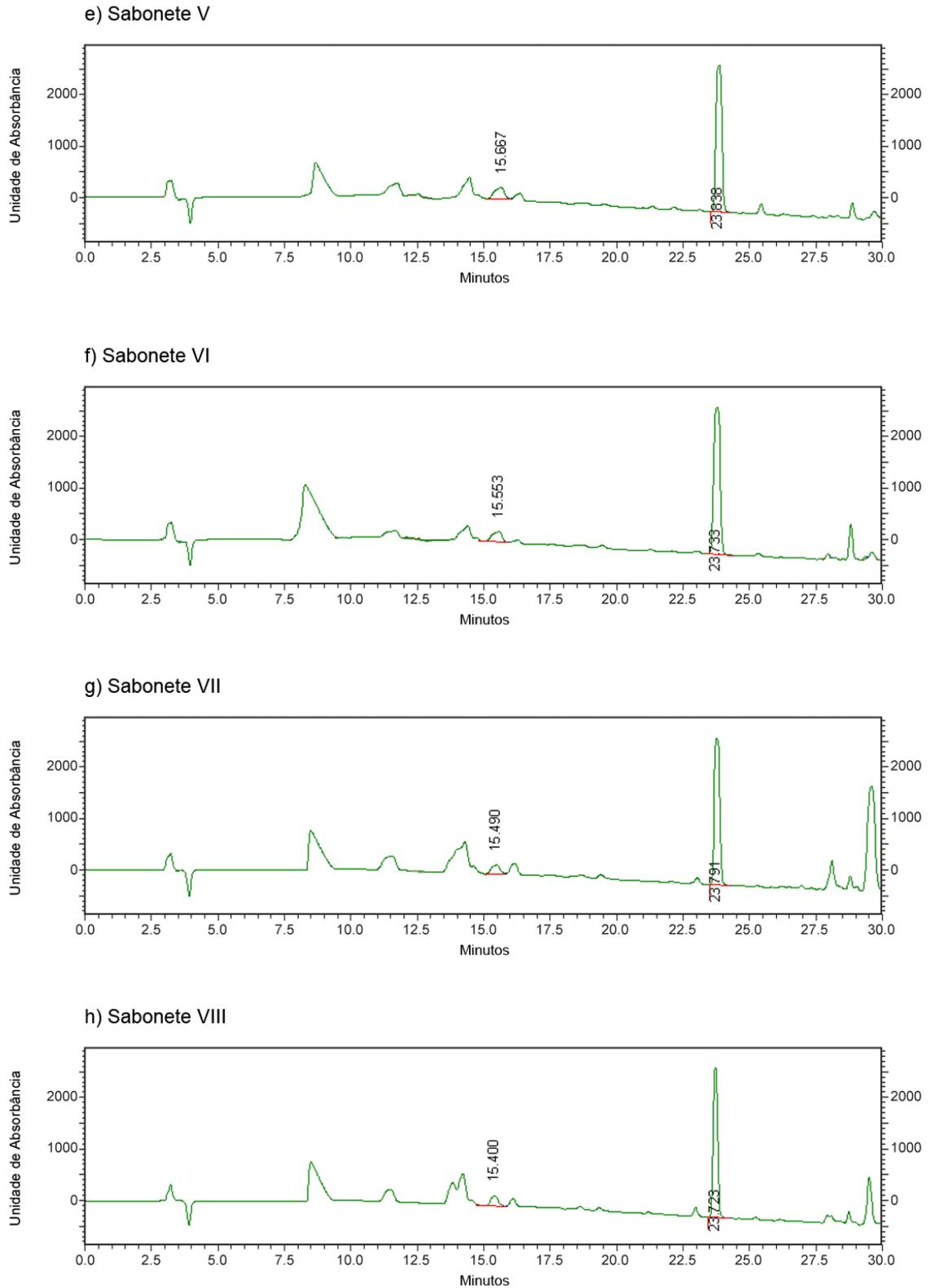
**Tabela 14 – Porcentagem de metildibromoglutaronitrila, fenoxietanol, metilparabeno e propilparabeno nas amostras de sabonetes.**

Sabonetes	Conservantes identificados nos sabonetes artesanais.			
	Metilparabeno	Propilparabeno	Fenoxietanol	Metildibromoglutaronitrila
I	0,05%	1,63%	-	-
II	0,04%	1,25%	-	-
III	0,04%	1,67%	-	-
IV	0,04%	2,23%	0,08%	-
V	0,03%	1,13%	-	-
VI	0,04%	1,33%	-	-
VII	0,02%	1,51%	-	-
VIII	0,02%	1,06%	-	-
IX	0,02%	1,32%	-	-
X	0,03%	1,01%	-	-
XI	0,02%	0,98%	-	-
XII	0,04%	1,53%	-	-
XIII	0,05%	2,22%	-	-
XIV	0,04%	1,79%	-	-
XV	0,05%	1,72%	-	-



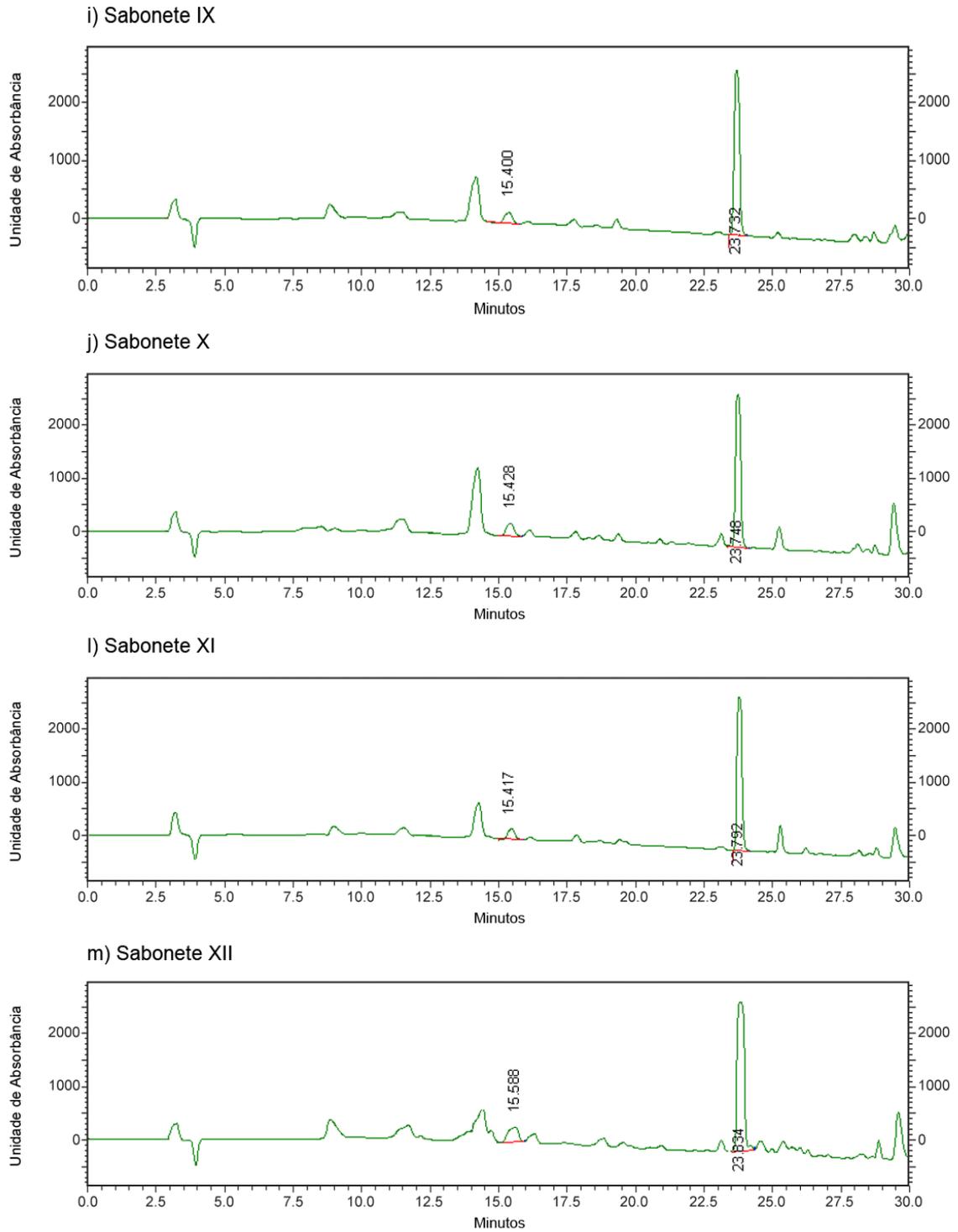
**Figura 13 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais I, II, III e IV.**

Cromatogramas obtidos por aplicação dos extratos resultantes da partição líquido-líquido das amostras de sabonetes com acetato de etila em um sistema de CLAE, usando uma coluna 250 x 4,6 mm SSWakosil C18RS 5  $\mu$ m e eluídos por uma fase móvel composta por tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 3,5 e metanol em sistema gradiente com um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi acompanhada por detecção em espectrofotômetro a 220 nm.



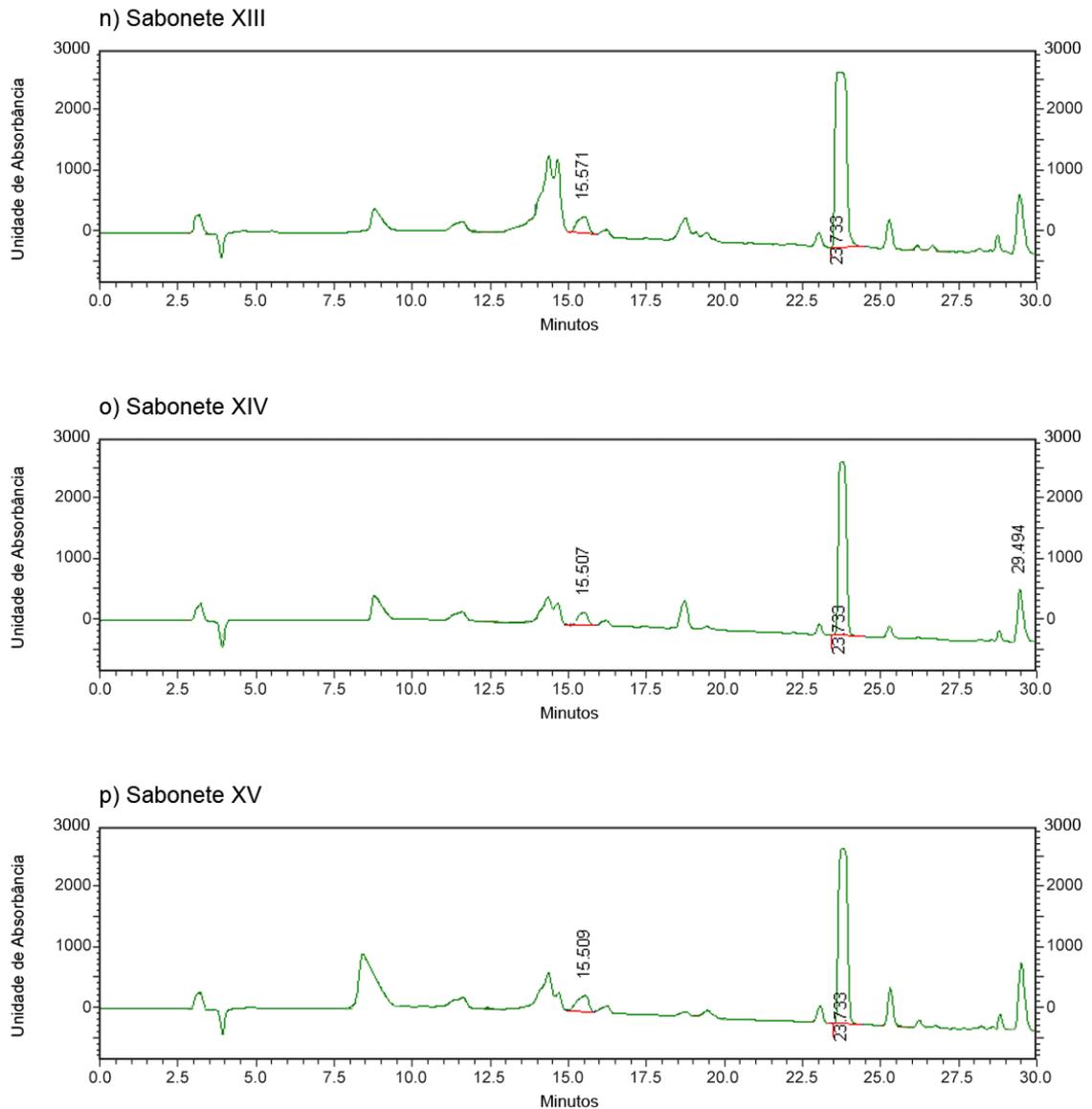
**Figura 14 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais V, VI, VII e VIII.**

Cromatogramas obtidos por aplicação dos extratos resultantes da partição líquido-líquido das amostras de sabonetes com acetato de etila em um sistema de CLAE, usando uma coluna 250 x 4,6 mm SSWakosil C18RS 5  $\mu$ m e eluídos por uma fase móvel composta por tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 3,5 e metanol em sistema gradiente com um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi acompanhada por detecção em espectrofotômetro a 220 nm.



**Figura 15 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais IX, X, XI e XII.**

Cromatogramas obtidos por aplicação dos extratos resultantes da partição líquido-líquido das amostras de sabonetes com acetato de etila em um sistema de CLAE, usando uma coluna 250 x 4,6 mm SSWakosil C18RS 5  $\mu\text{m}$  e eluídos por uma fase móvel composta por tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 3,5 e metanol em sistema gradiente com um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi acompanhada por detecção em espectrofotômetro a 220 nm.



**Figura 16 - Cromatogramas dos sabonetes artesanais XIII, XIV e XV.**

Cromatogramas obtidos por aplicação dos extratos resultantes da partição líquido-líquido das amostras de sabonetes com acetato de etila em um sistema de CLAE, usando uma coluna 250 x 4,6 mm SSWakosil C18RS 5  $\mu\text{m}$  e eluídos por uma fase móvel composta por tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 3,5 e metanol em sistema gradiente com um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi acompanhada por detecção em espectrofotômetro a 220 nm.

Nenhum dos sabonetes testados apresentou metildibromoglutaronitrila em suas formulações. Não foi possível a detecção de imidazolidinil ureia nos sabonetes, pois as condições de ensaio não permitiram resultados conclusivos acerca da presença deste conservante nas amostras.

## 5. DISCUSSÃO

De acordo com as Resoluções 211 e 343 da ANVISA, o rótulo dos produtos de higiene devem conter informações sobre nome do produto, marca, número de registro, lote, prazo de validade, conteúdo, país de origem, fabricante, modo de uso (se for o caso), advertências e restrições de usos, composição, número identificador de produto, número da Autorização de Funcionamento da empresa e a expressão “Res. ANVISA nº \_/05”(2, 6). Nas amostras analisadas, os sabonetes I a VIII traziam todas as informações necessárias em seus rótulos, porém, algumas das informações não condiziam com a formulação do produto. Os sabonetes IX, X e XI continham apenas informações sobre o responsável técnico, CNPJ e prazo de validade. Já os sabonetes XII, XIII, XIV e XV não traziam nenhuma informação em seus rótulos. Nenhum sabonete indicava a presença de conservantes em sua composição. Isso sugere que, apesar dos esforços da legislação brasileira em regular a manipulação dos sabonetes, ainda existem muitos produtos sendo comercializados de forma irregular em feiras de artesanato de Brasília, e isso pode colocar em risco a saúde da população.

Hugbo e colaboradores, em 2003, analisaram 10 cosméticos (cremes e loções) comercializados na Nigéria. Entre eles, apenas três possuíam data de validade, quatro informavam o tipo de conservante utilizado e quatro indicavam o número do lote (81). Portanto, os problemas de regulamentação não são exclusividade do Brasil.

Uma vez que foram percebidas irregularidades na apresentação das embalagens dos sabonetes artesanais, a qualidade microbiana desses sabonetes foi analisada. Para que os sabonetes tenham características organolépticas atrativas, manipuladores adicionam compostos orgânicos, óleos e extratos de plantas e, alguns desses compostos podem favorecer o crescimento de microrganismos (82-83). Os produtos analisados continham sementes de maracujá e de melancia, respectivamente nos sabonetes I e VII, e leite em pó no sabonete V. A presença destes compostos, que não possuem qualidade adequada para serem utilizados como matérias-primas em cosméticos, introduz um maior risco de contaminação dos produtos. Produtos de origem vegetal normalmente contêm alta carga microbiana,

principalmente de fungos. Além disso, a presença de compostos orgânicos e proteicos, como o leite em pó, favorece o desenvolvimento de microrganismos, por serem fontes de carbono de fácil utilização para esses organismos. Condições climáticas, como calor e umidade, presentes em países tropicais, como o Brasil, também favorecem a sobrevivência e o crescimento de microrganismos nesses produtos (81).

Ainda, a falta de informação de registro e da indicação de profissional responsável no rótulo, faz com que se questione se as condições de manipulação adequadas, ambientais e profissionais, e de qualidade das matérias-primas certificadas foram respeitadas, para que o produto não fosse submetido a condições que pudessem introduzir uma grande carga de microrganismos no mesmo.

Os conservantes antimicrobianos acrescentados aos produtos têm a função de eliminar com rapidez qualquer microrganismo que venha a entrar em contato com o produto durante a fabricação e o uso. Porém, a capacidade desses conservantes na concentração usada apresenta um limite, e o aumento excessivo de conservantes pode aumentar os riscos de alergenicidade e toxicidade do produto. A soma destes fatores produz um risco bastante elevado aos consumidores destes produtos.

O critério de aceitabilidade de carga microbiana em produtos não estéreis varia de acordo com o uso do produto, natureza e potencial dano que ele pode causar ao consumidor (13). De acordo com resolução 481 da ANVISA, os produtos de higiene podem ser classificados em tipo 1, produtos infantis, para área dos olhos e que entram em contato com mucosas, ou tipo 2, os demais produtos susceptíveis de contaminação (12). Considerando os sabonetes artesanais como tipo 2, de acordo com a ANVISA, a contagem de microrganismos mesófilos totais não poderia ser maior que  $10^3$  UFC/g ou mL de produto, sendo o limite máximo de  $5 \times 10^3$  UFC/g ou mL de produto. Já de acordo com a Farmacopeia Brasileira, a Farmacopeia Americana (USP) e a Europeia a contagem de bactérias aeróbias totais deve ser menor que  $10^2$  UFC/g de produto, considerando o limite máximo de 200 UFC/g de produto (1, 13-14).

Conforme mostrado na Tabela 8, todos os sabonetes analisados possuem contagem de bactérias mesófilas totais acima dos limites aceitos nas farmacopeias. Já quando avaliados de acordo com os critérios de aceitabilidade da ANVISA, os

sabonetes IV, V, VIII e IX, que possuem mais que  $10^3$  UFC/g de produto, porém não ultrapassam o limite máximo de  $5 \times 10^3$  UFC/g de produto, estariam dentro dos limites permitidos. A maior concentração de bactérias mesófilas foi encontrada no sabonete IX, com um *bioburden* de 1.431 UFC/g de sabonete.

Em relação a bolores e leveduras, as Farmacopeias Brasileira, Americana e Europeia delimitam uma quantidade inferior a 10 UFC/g de produto ou, no máximo, 20 UFC/g de produto. Foram encontradas quantidades de bolores e leveduras acima das estabelecidas nos sabonetes I, III, VI, VII, IX, XI, XII, XV. Ou seja, 53,3% das amostras estavam com cargas microbianas acima dos limites permitidos. A maior carga microbiana foi encontrada no sabonete XI, que apresentou uma carga 52 vezes maior que a carga de bolores e leveduras máxima permitida por grama de sabonete. Os sabonetes I e VII possuíam sementes de maracujá e de melancia, respectivamente, o que pode ter favorecido o aparecimento de fungos.

No estudo de Hugbo e col. (2003) descrito anteriormente, os autores demonstraram que 9 dos 10 cosméticos apresentavam contagem bacteriana de  $5 \times 10^2$  a  $1,25 \times 10^4$  UFC/mL, sendo que o gênero mais comumente encontrado nesses produtos foi o *Staphylococcus*. Em relação aos fungos, 6 cosméticos apresentaram crescimento de  $5 \times 10^2$  a  $3,5 \times 10^4$  UFC/mL (81).

Atualmente, a contaminação microbiana ainda é uma das principais causas de *recall* de produtos no mundo, principalmente em países tropicais em desenvolvimento (84). Por isso, é de grande importância o controle de qualidade microbiológico em produtos farmacêuticos, e este pode ser feito com processos de rastreamento de produtos bem definidos e estabelecidos. Os sabonetes IX, X e XI não continham todas as informações necessárias em seus rótulos. Provavelmente, sua produção não ocorreu dentro dos parâmetros de boas práticas de manipulação. Assim, as chances de contaminação são maiores e, realmente, estes foram os produtos que apresentaram a maior contagem de bactérias mesófilas, no sabonete IX, e de bolores e leveduras, no sabonete XI.

Em farmácias de manipulação, as principais fontes de contaminação de produtos são a água, as matérias-primas, os equipamentos, o ambiente e o manipulador (85-86). A água pode ser tanto a utilizada na produção quanto a utilizada na lavagem do ambiente de manipulação e na lavagem de utensílios. As

matérias-primas de origem natural possuem a capacidade de reter água e, assim, favorecem o crescimento de microrganismos. Já a higiene do manipulador inclui a lavagem adequada das mãos e o seguimento das boas práticas de manipulação (85). A água pode ser considerada a principal fonte de contaminação em cosméticos por bactérias Gram negativas, como a *E. coli* e *P. aeruginosa* (83). Como os sabonetes artesanais possuem uma suspeita de manipulação caseira, existem grandes chances das causas citadas serem as responsáveis pelo alto índice de contaminação encontrado nos sabonetes.

Em um estudo realizado por Maiuta e colaboradores (2011) em que foi analisada a qualidade microbiológica do carbonato de cálcio, que é uma matéria-prima muito utilizada para a produção de cosméticos, não foram encontradas a presença de *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e o número de bactérias mesófilas totais e bolores e leveduras foi de até  $10^2$  UFC/g de produto. Assim, essa matéria-prima estava dentro dos padrões estabelecidos de qualidade microbiana (86). Porém, o uso de matérias-primas não certificadas, ou ainda a utilização de sementes desidratadas e fitas em contato direto com o produto, podem incluir riscos desnecessários ao usuário destes cosméticos.

Outro aspecto importante a se considerar é a qualidade microbiana do produto em uso. Behravan e colaboradores, 2005, realizaram uma análise microbiológica de 48 cremes cosméticos, sendo que 24 deles eram produtos novos e 24 cremes que estavam sendo utilizados por pessoas saudáveis. Os autores demonstraram que os cremes possuíam carga bacteriana entre  $10^2$  e  $10^6$  UFC/g de produto, e que a incidência de contaminação dos cremes foi maior nos produtos que já haviam sido utilizados (75%) quando comparados com os cosméticos novos (58%) (82). Esse resultado comprova o efeito que a manipulação de uso pode causar nos produtos. No caso dos sabonetes artesanais, é ainda importante notar que muitas vezes esses produtos são colocados em lavabos, que são pouco usados, para servirem, ao mesmo tempo, como produto de higiene e como elementos de decoração de ambiente. Banheiros são ambientes que favorecem muito o desenvolvimento de microrganismos por serem ambientes que são constantemente umedecidos e aquecidos pelo uso de chuveiros, que propiciam o acúmulo de vapor de água. O uso dos sabonetes artesanais como decoração e o uso esporádico com a efetiva função de produto de higiene pode favorecer o

desenvolvimento da carga microbiana já existente, inculindo um maior risco do que aquele previsto pela análise do produto novo.

Bactérias e fungos podem interferir na estabilidade de produtos farmacêuticos devido a alterações físico-químicas que podem produzir, como mudança de cor, odor e até alterações no pH (87). Nos sabonetes analisados, todos apresentaram pH de aproximadamente 9,0, sendo os maiores resultados encontrados na amostra VI com 9,93 e XII com 9,91 (Tabela 7).

Os conservantes possuem uma faixa de pH ótima de utilização. Ultrapassando esse limite, pode ocorrer degradação do conservante e, assim, perda de sua eficácia. O propilparabeno e o metilparabeno sofrem rápida hidrólise a ácido *p*-hidroxibenzoico em soluções aquosas com pH igual ou acima de 7 e 8, respectivamente (54-55). Já o fenoxietanol é estável em pH de 7 a 10 (informações do fabricante – Sigma-Aldrich). Todos os sabonetes artesanais testados apresentaram pH acima dos valores da faixa de eficácia dos parabenos, em valores em que os mesmos sofrem degradação.

Dessa forma, pode-se levantar algumas hipóteses sobre os resultados encontrados. Ou a presença de microrganismos ocasionou alterações no pH, ou os altos valores de pH encontrados inativaram parte dos parabenos e, conseqüentemente, favoreceram o crescimento de microrganismos. Em soluções fortemente alcalinas, os parabenos são hidrolisados a ácidos carboxílicos, que depois se tornam ionizados (64). Na forma ionizada, os parabenos perdem suas funções, pois perdem a capacidade de permeação nas células dos microrganismos. Assim, o pH 9 dos sabonetes analisados pode interferir na ação desses conservantes, uma vez que os mesmos estejam na presença de água, para que ocorra o processo de hidrólise.

Com o objetivo de tentar identificar alguns dos contaminantes dos sabonetes, foi realizado o ensaio para pesquisa de patógenos específicos. De acordo com a ANVISA e a Farmacopeia Americana, os sabonetes não podem conter *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em 1 g ou mL de produto (12). Assim, foram analisadas a presença tanto de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, quanto de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*.

O *S. aureus* é um microrganismo encontrado em fossas nasais, garganta, intestino e pele e pode ser disseminado através da fala e da tosse (16-17). A *P. aeruginosa* pode estar presentes no solo, vegetais e na água, e pode sobreviver a baixas temperaturas (28). É um dos principais contaminantes de ambientes que não foram bem enxutos após o processo de higienização e, por isso, pode ser um potente contaminante de áreas de produção. Esses microrganismos podem habitar a pele, mucosa nasal, garganta e fezes (21) e podem ser importantes patógenos oportunistas. A *Salmonella* sp. é a principal causadora de infecções intestinais no ser humano, ocasionando o aparecimento de 5.000 casos por ano em humanos no Canadá (37). A *E. coli* é utilizada como um indicador de contaminação por fonte fecal (28). Assim, a análise da presença desses microrganismos foi realizada para verificar a contaminação dos sabonetes através de sua manipulação ou como indicador de ausência de higiene.

Os sabonetes III, V, VI e VIII apresentaram colônias com características típicas de *E. coli* (Tabela 9). Apesar dos sabonetes I a VIII possuírem todas as informações obrigatórias em seus rótulos, indicando serem produzidos de acordo com as boas práticas de manipulação, os sabonetes III, V, VI e VIII possuíam colônias com características típicas de *E. coli*, que são indicativas de contaminação por fontes fecais.

No meio de cultura seletivo para crescimento de *E. coli* houve o aparecimento de algumas colônias com características diferentes das esperadas para *E. coli* nos sabonetes I, III, IV, VI, VII e VIII. O mesmo ocorreu no meio de cultura seletivo para *Salmonella* sp. nos sabonetes III e VIII. Isso demonstra que houve o crescimento de outras espécies de bactérias nos meios de cultura seletivos, que não os patógenos em estudo.

Em um estudo realizado na Nigéria, em 2001, com cremes e loções, foram encontradas contaminações por *E. coli* em 16,3% dos produtos analisados (83). A *E. coli* é uma bactéria que pode ocasionar infecções intestinais (enteropatogênicas) ou extraintestinais. As principais infecções extraintestinais são a infecção urinária, pneumonias, osteomielite e meningite do recém-nascido. Já as infecções enteropatogênicas podem ser causadas por diversas cepas de *E. coli*. (16, 21). A diarreia causada por *E. coli* é responsável por aproximadamente 2 milhões de

mortes em crianças no mundo, anualmente (32). Normalmente a *E.coli* é considerada um comensal no humano. Muitas cepas podem ser isoladas das fezes de humanos saudáveis (88), sendo o principal representante dos coliformes termotolerantes (89). Porém, em pacientes imunocomprometidos a *E.coli* pode causar diversas infecções oportunistas. Assim, a presença dessa bactéria em sabonetes pode oferecer um risco às pessoas imunocomprometidas e, dessa forma, ocasionar diversas patologias. Existem diversos gêneros de bactérias fermentadoras de lactose, como *Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo que a mais comum é a *E. coli*. Conforme apresentado na Tabela 10, os sabonetes II, III, IX e XV possuíam as maiores quantidades de bactérias fermentadoras de lactose. De acordo com a Tabela 9, o sabonete III apresentava colônias de bactérias características de *E. coli*, assim, o alto índice de bactérias fermentadoras de lactose está de acordo com a presença de *E. coli* no sabonete III. Nos outros sabonetes, há a presença de bactérias fermentadoras de lactose, mas provavelmente não são, especificamente, cepas de *E. coli*.

Os produtos farmacêuticos utilizam combinações de diversos conservantes para impedir o crescimento da maior quantidade de microrganismos possíveis. Por exemplo, como os parabenos possuem maior atividade contra fungos e bactérias Gram positivas, eles podem ser associados à imidazolidinil ureia que possui grande atividade contra bactérias Gram positivas e negativas (54). Já o fenoxietanol age em bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e leveduras (69). Entre os parabenos, os menores ésteres, ou seja, os mais hidrofílicos, como o metil são associados aos maiores, ou mais lipofílicos, como o propil, para permitir maior eficiência na conservação dos produtos (60).

A concentração máxima de parabenos que a ANVISA e a União Europeia permitem é de 0,4% de cada parabeno ou, quando eles estão associados, a concentração máxima permitida é de 0,8% (55-56). A associação de parabenos permite um efeito sinérgico contra o crescimento de microrganismos (90). Em relação ao fenoxietanol, a ANVISA permite a utilização máxima de 1% (56). O propilparabeno é o conservante mais comumente utilizado em produtos baseados em água, como cosméticos, xampus, condicionadores e protetores solar (90).

A Tabela 14 demonstra que todos os sabonetes possuíam metilparabeno e propilparabeno em suas composições. As concentrações de metilparabeno utilizadas eram menores que 0,4%. Porém, todas as concentrações de propilparabeno eram muito maiores que 0,4%, gerando uma soma de parabenos maior que 0,8%, em desacordo com o preconizado pela ANVISA. As maiores concentrações de propilparabeno foram encontradas nos sabonetes IV e XIII com 2,23% e 2,22%, respectivamente.

Apenas o sabonete IV apresentou fenoxietanol na sua composição, numa concentração de 0,08%, ou seja, estava dentro do limite de 1% preconizado pela ANVISA.

Os sabonetes com maiores concentrações de propilparabeno foram os sabonetes IV e XIII, sendo que o sabonete IV possuía ainda 0,08% de fenoxietanol. Nestes produtos não foram encontradas cargas microbianas de bolores e leveduras, nem foram identificadas colônias com características específicas de *E. coli*.

Em 1984, a *Cosmetic Ingredient Review* (CIR), dos Estados Unidos, considerou que os parabenos eram seguros para serem utilizados em cosméticos em concentrações de até 25%. Apesar de hoje esses valores terem mudado, a CIR continua classificando os parabenos como seguros, o que leva a sua ampla utilização (91). Os parabenos podem provocar diversos efeitos adversos nos seres humanos. Recentemente, eles estão sendo considerados como genotóxicos, estrogênicos, como produtos que afetam o sistema endócrino, que podem causar câncer de mama, distúrbios no sistema reprodutor masculino e ainda existe uma relação entre a maior utilização de protetores solares com parabenos e o aumento da taxa de aparecimento de melanomas (92). Já foram encontrados parabenos, na forma conjugada ou livre, na urina de pessoas que não sabiam que tinham exposição ao conservante. Na forma livre, 99%, 96%, 58%, 69% e 39% das amostras de urina dessas pessoas possuíam metilparabeno, propilparabeno, etilparabeno, butilparabeno e benzilparabeno, respectivamente. Já foram relatados, também, a presença de parabenos no leite materno, indicando uma exposição precoce a esse conservante em bebês (91).

Os principais parabenos utilizados em produtos farmacêuticos são o metilparabeno e o propilparabeno. Os parabenos são rapidamente absorvidos pela

pele e tem-se sugerido que o metabolismo dessas substâncias por esterases da pele é incompleto (55). Outros fatores podem influenciar o tempo de exposição à parabenos, como o consumo de flavonoides do suco de toranja e os extratos de sementes de uva que inibem a ação das esterases e, conseqüentemente, aumentam a biodisponibilidade de parabenos na circulação, além do uso de alguns tensoativos e promotores de absorção que também podem alterar a absorção de parabenos (91). Nos sabonetes I a VIII havia a presença do tensoativo aniônico LESS (lauril éter sulfato de sódio) que pode interferir na absorção desses conservantes e alterar a sua toxicidade. Dependendo da concentração dos tensoativos não iônicos, por exemplo, Tween 80 ou 60, pode haver um aumento ou diminuição dos efeitos dos parabenos (64).

De acordo com a FDA, em 2006, foram utilizados metilparabeno, etilparabeno e propilparabeno em 8.786, 2.679 e 7.118 produtos cosméticos, respectivamente. No total, utilizavam-se os parabenos como conservantes em 22.000 produtos cosméticos. Em 1981, a concentração utilizada de metilparabeno e propilparabeno em sabonetes e detergentes era de até 1%. Já em 2003 essas proporções diminuíram para 0,001 a 0,4 e 0,02 a 0,1%, respectivamente (64). Nos sabonetes analisados, a concentração de metilparabeno foi de 0,02 a 0,05%, ou seja, está de acordo com os dados publicados anteriormente e com os valores permitidos pelos compêndios oficiais. Porém, a concentração de propilparabeno foi de 0,98 a 2,23%, muito acima da concentração esperada.

Os parabenos atuam de forma mais efetiva contra fungos que contra bactérias. Entre as bactérias, eles atuam mais contra Gram positivas que Gram negativas (54). Como há excesso de parabenos nos sabonetes analisados, eles podem estar atuando mais efetivamente contra os bolores e leveduras. Assim, essa hipótese coincide com os resultados encontrados de menor carga microbiana de bolores e leveduras quando comprada com as bactérias. Entre as bactérias patogênicas identificadas, não houve o crescimento de Gram positivas, mais uma vez corroborando com os resultados encontrados de quantificação e tipo de conservantes presentes.

Concentrações de 0,5 a 2,0 mM de propilparabeno foram capazes de matar hepatócitos de ratos em concentrações e tempo dependentes. Em 1 hora, 2,0 mM

de propilparabeno matou 50% de hepatócitos, enquanto que o isobutilparabeno matou 98%. Essa alteração foi proporcionada pela diminuição da função mitocondrial (93).

O propilparabeno é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e a absorção pela pele pode chegar a 100% (54). Assim, o excesso desse parabeno, presente nos sabonetes analisados, pode propiciar o desenvolvimento das reações adversas citadas anteriormente.

Além disso, como discutido previamente neste trabalho, os conservantes são uma classe de compostos com alta alergenicidade, o que apresenta mais um risco aos consumidores.

## 6. CONCLUSÕES

- Os sabonetes IX, X, XI, XII, XIII, XIV e XV não continham ou apresentavam informações incompletas em seus rótulos.
- Todos os sabonetes analisados possuíam contagem de bactérias mesófilas totais acima dos limites preconizados nas Farmacopeias, mas estavam dentro dos limites permitidos pela ANVISA.
- 53,3% das amostras estavam com carga de bolores e leveduras acima dos limites permitidos, sendo que o sabonete XI apresentou uma carga 52 vezes maior que a carga de bolores e leveduras máxima permitida pela Farmacopeia brasileira por grama de sabonete.
- Os valores de pH encontrados para as amostras de sabonetes não são compatíveis com aqueles sugeridos para este tipo de produto e, ainda, os altos valores de pH encontrados podem inativar parte dos parabenos e, conseqüentemente, favorecer o crescimento de microrganismos.
- Os sabonetes III, V, VI e VIII apresentaram colônias com características típicas de *E. coli*, que são indicativas de contaminação por fontes fecais. O resultado do ensaio de fermentação de lactose corroborou com o achado da presença dessa bactéria no sabonete III.
- Apesar de nenhum sabonete indicar a presença de conservantes em sua composição, as concentrações de propilparabeno encontradas foram muito maiores que 0,4%, enquanto que as concentrações de metilparabeno foram menores que 0,4%. Assim, a soma de parabenos foi maior que 0,8%, em desacordo com o preconizado pela ANVISA, podendo provocar diversos efeitos adversos nos seres humanos.
- Apenas o sabonete IV apresentou fenoxietanol na concentração de 0,08%, ou seja, dentro do limite de 1% preconizado pela ANVISA.

## 7. REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. Brasília: Fiocruz; 2010. p. 41,50, 236-53.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 211. Dispõe sobre a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brasília, 14 de julho de 2005.
3. US Food and Drug Administration, FDA. Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap?). 2012 [acesso em 26 jan 2012]; Disponível em: <http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm074201.htm>
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 335. Brasília, 22 de julho de 1999.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 79.. Brasília, 28 de agosto de 2000.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 343. Brasília, 13 de dezembro de 2005.
7. BRASIL. Lei 6360. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Brasília, 23 de setembro de 1976.
8. Balbani APS, Stelzer LB, Montovani JC. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. Rev Bras Otorrinolaringol. 2006;72(3):400-6.
9. Boyvat A, Akyol A, Gürgey E. Contact sensitivity to preservatives in Turkey. Contact dermatitis. 2005;52(6):329-32.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 162. Dispõe sobre a lista de conservantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brasília, 11 de setembro de 2001.
11. Patrone V, Campana R, Vittoria E, Baffone W. In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Current microbiology. 2010;60(4):237-41.

12. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 481. Brasília, 23 de setembro de 1999.
13. US Pharmacopeia, USP 30 NF 25. Microbiological examination of nonsterile: acceptance criteria of pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use. 2007.
14. European Pharmacopoei 7. Microbiological quality os non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use. 2011.
15. Aulton ME, Ortega GG. Delineamento de formas farmacêuticas: Artmed; 2008.
16. Trabulsi LR. Microbiologia. Editora: Atheneu, 2ª edição; 1989 p. 105 a 72.
17. Moura JP, Pimenta FC, Hayashida M, Cruz EDA, Canini SRMS, Gir E. Colonization of nursing professionals by *Staphylococcus aureus*. Revista Latino-Americana de Enfermagem. 2011;19(2):325-31.
18. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clinical microbiology reviews. 2010;23(3):616-87.
19. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. Journal of Infectious Diseases. 2008;197(9):1226-34.
20. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical infectious diseases. 2008;46(Supplement 5):S344-S9.
21. Trabulsi L, Alterthum F. Microbiologia. Editora Atheneu, São Paulo, SP; 2008.
22. Tortora G, Funke B, Case C. Microbiologia. 8 edição, 2005. Editora Artmed, Porto Alegre, RS.
23. Hermos CR, Shiau R, Hsiang M, Chambers HF, Pan E. Epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in San Francisco children. Journal of Pediatric Infectious Diseases. 2009;4(3):247-59.
24. Albrich WC, Harbarth S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? The Lancet infectious diseases. 2008;8(5):289-301.
25. Lautenbach E, Synnestvedt M, Weiner MG, Bilker WB, Schein J, Kim M. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2010;31(1):47-53.

26. Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. J Bras Patol Med Lab. 2011;47(4):409-20.
27. Paterson DL. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Clinical infectious diseases. 2006;43(Supplement 2):S43-S8.
28. Lues J, Theron M, Venter P, Rasephei M. Microbial composition in bioaerosols of a high-throughput chicken-slaughtering facility. Poultry science. 2007;86(1):142-9.
29. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clinical infectious diseases. 2002;34(5):634.
30. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. Journal of medical microbiology. 2007;56(1):4-8.
31. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2004;2(2):123-40.
32. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2008;102(9):852-6.
33. Jansen A, Kielstein J. The new face of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections. Euro Surveill. 2011;16:25.
34. Clarke SC. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*—an emerging problem? Diagnostic microbiology and infectious disease. 2001;41(3):93-8.
35. Gordon MA. Invasive Non-typhoidal Salmonella Disease – epidemiology, pathogenesis and diagnosis. Curr Opin Infect Dis. October 2011 24(5):484–9.
36. Hendriksen RS, Hyytia-Trees E, Pulsrikarn C, Pornruangmong S, Chaichana P, Svendsen CA, et al. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates recovered from blood and stool specimens in Thailand. BMC microbiology. 2012;12(1):92.
37. Nesbitt A, Ravel A, Murray R, McCormick R, Savelli C, Finley R, et al. Integrated surveillance and potential sources of *Salmonella enteritidis* in human cases in Canada from 2003 to 2009. Epidemiology and Infection. 2011;1(1):1-16.
38. Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(7):2465-7.

39. Chiu CH, Su LH, Chu C. Salmonella enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(2):311-22.
40. Cardoso TG, de Carvalho VM. Toxinfecção alimentar por *Salmonella spp*\*. *Rev Inst Ciênc Saude*. 2006;24(2):95-101.
41. Wahlström H, Andersson Y, Plym-Forshell L, Pires S. Source attribution of human Salmonella cases in Sweden. *Epidemiology and Infection*. 2011;139(8):1246.
42. Russell A. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Microbiology*. 1991;71(3):191-201.
43. Denyer SP, Baird RM, Orth D. Principles of Preservation. In: Raton B. *Guide to microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*. 2 ed. New York: Ellis horwood; 2007. p. 309-21.
44. Block SS, Fassihi, RA. Preservation and Microbiological Attributes of Nonsterile Pharmaceuticals Products. In: Block SS. *Disinfection, Sterilization and Preservation* 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
45. Brannan DK. Cosmetic preservation. *J Soc Cosmet Chem*. 1995;46:199-220.
46. Denyer SP, Hodges N, Gorman SP, Gilmore BF. *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*: Wiley-Blackwell; 1991.
47. Orth D. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J Soc Cosmet Chem*. 1979;30:321-32.
48. Kabara JJ., Orth DS. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. *Cosmet Toiletries*. 1998;113:51-8.
49. Orth D. *An Introduction to Cosmetic Microbiology*. Weymouth, U.K.: Micelle Press; 1999.
50. Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. *Dermatologic therapy*. 2004;17(3):251-63.
51. Dastychová E, Necas M, Vasku V. Contact hypersensitivity to selected excipients of dermatological topical preparations and cosmetics in patients with chronic eczema. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*. 2008;17(2):61.
52. Jong CT, Statham BN, Green CM, King CM, Gawkrödger DJ, Sansom JE, et al. Contact sensitivity to preservatives in the UK, 2004–2005: results of multicentre study. *Contact Dermatitis*. 2007;57(3):165-8.

53. Cashman AL, Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis*. 2005;16(2):57.
54. Soni M, Burdock G, Taylor S, Greenberg N. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*. 2001;39(6):513-32.
55. Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of applied toxicology*. 2008;28(5):561-78.
56. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 29. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. Brasília, 1 de junho de 2012.
57. Sarma N, Ghosh S. Clinico-allergological pattern of allergic contact dermatitis among 70 Indian children. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2010;76(1):38.
58. Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch P. Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. *British Journal of Dermatology*. 1998;138(3):467-76.
59. Bredin J, Davin-Régli A, Pagès JM. Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(6):1013-5.
60. Msagati TAM, Barri T, Larsson N, Jönsson JÅ. Analysis and quantification of parabens in cosmetic products by utilizing hollow fibre-supported liquid membrane and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *International journal of cosmetic science*. 2008;30(4):297-307.
61. Sigma-Aldrich. [acesso em 21 jan 2013]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/47889?lang=pt&region=BR>.
62. Sigma-Aldrich. [acesso em 21 jan 2013]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/phr1010?lang=pt&region=BR>.
63. Oiso N, Fukai K, Ishii M. Allergic contact dermatitis caused by parabens in a compress. *Contact dermatitis*. 2004;50(5):317.
64. Panel Meeting Expert, CIR. Final amended report on the safety assessment on methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isobutylparaben, butylparaben, isobutylparaben and benzylparaben as used in cosmetic products. *International Journal of Toxicology*. Março 5-6, 2012.

65. Crinnion WJ. Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 2010;15(3):190.
66. Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;221(3):278-84.
67. Taxvig C, Vinggaard AM, Hass U, Axelstad M, Boberg J, Hansen PR, et al. Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis? *Toxicological sciences*. 2008;106(1):206-13.
68. Davin-Regli A, Chollet R, Bredin J, Chevalier J, Lepine F, Pagès J. *Enterobacter gergoviae* and the prevalence of efflux in parabens resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(4):757-60.
69. Bohn S, Bircher A. Phenoxyethanol-induced urticaria. *Allergy*. 2001;56(9):922-3.
70. Meyer BK, Ni A, Hu B, Shi L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2007;96(12):3155-67.
71. Sigma-Aldrich. [acesso em 2 jan 2013]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/34392?lang=pt&region=BR>.
72. Schnuch A, Lessmann H, Geier J, Uter W. Contact allergy to preservatives. Analysis of IVDK data 1996–2009. *British Journal of Dermatology*. 2011.
73. De Groot AC, van Ginkel CJW, Weijland JW. Methyl dibromoglutaronitrile (Euxyl K 400): An important "new" allergen in cosmetic. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996;35(5):743-7.
74. Jensen CD, Johansen JD, Menné T, Andersen KE. Increased retest reactivity by both patch and use test with methyl dibromoglutaronitrile in sensitized individuals. *Acta dermato-venereologica*. 2006;86(1):8-12.
75. De Groot AC, White IR, Flyvholm MA, Lensen G, Coenraads PJ. Formaldehyde-releasers in cosmetics: relationship to formaldehyde contact allergy. *Contact dermatitis*. 2010;62(1):2-17.
76. Lehmann SV, Hoeck U, Breinholdt J, Olsen CE, Kreilgaard B. Characterization and chemistry of imidazolidinyl urea and diazolidinyl urea. *Contact dermatitis*. 2006;54(1):50-8.

77. Agner T, Andersen KE, Björkner B, Bruze M, Frosch P, Gruvberger B, et al. Standardization of the TRUE Test imidazolidinyl urea and diazolidinyl urea patches. *Contact dermatitis*. 2001;45(1):21-5.
78. Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One*. 2007;2(4):e365.
79. Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(8):629-36.
80. European Pharmacopoeia 5. Microbiological examination of nonsterile: acceptance criteria of pharmaceutical preparations. 2007.
81. Hugbo P. G., Onyekweli A. O., Igwe I. Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2003;2(2):229-34.
82. Behravan J, Bazzaz F, Malaekheh P. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran (2000). *International journal of dermatology*. 2005;44(6):482-5.
83. Okeke I. N., Lamikanre A. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; 91:922-8.
84. Campana R., Scesa C., Patrone V., Vittoria E., W. B. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *Applied Microbiology*. 2006(43):301–6.
85. Silva MFS, L.L. Análise microbiológica de três formulações magistrais. *Cadernos das Escolas de Saúde*. 2012; vol.2 (ISSN 1984 - 7041 ):117-30
86. Maiuta N. Di., P S. Molecular detection of bacteria in calcium carbonate powder used in cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science* 2011;33:426–31.
87. Medeiros A, Porto K, Paiva A, Procópio J. Análise de contaminantes microbiológicos em produtos comercializados em farmácias de manipulação.: Dissertação: Departamento de Farmácia e Biologia. [acesso em 30 nov 2011]. Disponível em: [http://eduep.uepb.edu.br/biofar/n1v1/n1v1\\_analise\\_de\\_contaminantes.html](http://eduep.uepb.edu.br/biofar/n1v1/n1v1_analise_de_contaminantes.html).
88. Duarte PB. Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

89. Mascarenhas A.; Martins J.; Neves M. Avaliação de tratamento de águas superficiais efectuado na ETA de Alcantarilha com base na análise de indicadores de poluição fecal. . Universidade do Algarve Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Faro. 2002.
90. Smaoui S, Hlima H. Effects of parabens and isothiazolinone on the microbiological quality of baby shampoo: the challenge test. *Biocontrol science*. 2012;17(3):135.
91. Hu P., Chen X., Whitener R., Boder E., Jones J., Porollo A., et al. Effects of Parabens on Adipocyte Differentiation. *Toxicological Sciences*. 2012.
92. Prichodko A, Janenaite E, Smitiene V, Vickackaite V. Gas chromatographic determination of parabens after in-situ derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction. *Acta Chromatographica*. 2012:1-13.
93. Nakagawa Y., Moldéus P. Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1998(55(11):1907-14.

## ANEXO A - Tabela de Números Mais Provável (NMP)

**Tabela 3** – Número mais provável para réplicas de 5 tubos e limites de confiança de 95%

Número de Tubos Positivos			NMP/ g(mL)	Limite	
100 mg ou 0,1 mL/tubo	10 mg ou 0,01 mL/tubo	1 mg ou 0,001 mL/tubo		Inferior	Superior
0	0	0	< 2	< 0,5	-
0	0	1	2	< 0,5	7
0	0	2	4	< 0,5	11
0	1	0	2	< 0,5	7
0	1	1	4	< 0,5	11
0	1	2	6	< 0,5	15
0	2	0	4	< 0,5	11
0	2	1	6	< 0,5	15
1	0	0	2	< 0,5	7
1	0	1	4	< 0,5	11
1	0	2	6	< 0,5	15
1	0	3	8	1	19
1	1	0	4	< 0,5	11
1	1	1	6	< 0,5	15
1	1	2	8	1	19
1	2	0	6	< 0,5	13
1	2	1	8	1	19
1	2	2	10	2	23
1	1	0	8	1	19
1	3	1	10	2	23
1	4	0	11	2	23
2	0	0	5	< 0,5	13
2	0	1	7	1	17
2	0	2	9	2	21
2	0	3	12	3	28
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	1	2	12	3	28
2	2	0	9	2	21
2	2	1	12	3	28
2	2	2	14	4	34