UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

NICOLLE SILVA ROCHA

ANÁLISE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE CREMES HIDRATANTES CAPILARES COMERCIAIS EM USO

BRASÍLIA, DF

2016

NICOLLE SILVA ROCHA

ANÁLISE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE CREMES HIDRATANTES CAPILARES COMERCIAIS EM USO

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alves Areda

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília/UnB como parte dos requisitos básicos para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

BRASÍLIA, DF

2016

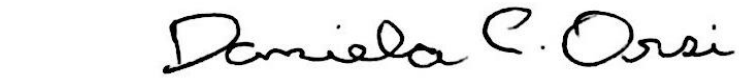
NICOLLE SILVA ROCHA

ANÁLISE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE CREMES HIDRATANTES CAPILARES COMERCIAIS EM USO

BANCA EXAMINADORA

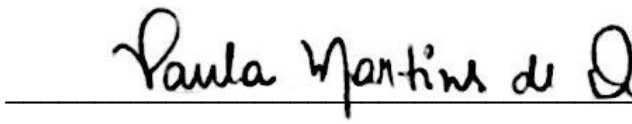
Orientadora: Profa. Dra. Camila Alves Areda

(FCE/ Universidade de Brasília)



Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

(FCE/ Universidade de Brasília)



Msc. Paula Martins de Oliveira

(UnB/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus por ter me dado à oportunidade de cursar farmácia na Universidade de Brasília e por sempre ter me dado forças para chegar até aqui. Sem Ele esse sonho não teria se tornado realidade em minha vida.

À minha avó Zulma que me apoiou e foi minha principal incentivadora para chegar até aqui. Agradeço pelos conselhos, pelo apoio, por toda vez que precisei de um ombro amigo ela esteve comigo e não me deixou desistir. Apesar da distância entre cidades, nunca deixou de participar da minha vida.

À minha mãe Kátia, minha tia Shirley, meu irmão Victor Hugo e meu tio Leonardo, que de certa forma esteve me ajudando nesses anos. Agradeço por acreditarem em mim e estarem ao meu lado em todas as situações.

Ao meu namorado Oney que desde o início do curso foi além de tudo foi um grande amigo, que me deu forças nas horas que mais precisei, pela paciência na minha ausência para realização desse trabalho e por me incentivar e acreditar que eu conseguiria vencer mais essa etapa da minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Camila Areda por fazer parte desse trabalho, pelo profissionalismo, pela disposição em me ajudar e por todas correções feita. Agradeço também a Profa. Dra. Daniela Orsi que sempre se mostrou disponível, me ajudando na realização dos experimentos e pela grande profissional que é.

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Daniela Orsi e Paula Martins por terem aceito o convite de participação e por poderem contribuir com meu trabalho.

Por fim à todos que estiveram ao meu lado em todo esse período de graduação, à todos amigos que fiz que foram fundamentais para o melhor aproveitamento do meu curso e pelas experiências vividas.

RESUMO

Tendo em vista a vastidão de produtos cosméticos oferecidos no mercado, é de suma importância que estes possuam segurança microbiológica adequada. Sendo relevante não só para os fabricantes como também para seus consumidores. As alterações decorrentes de contaminação microbiana na formulação do produto podem modificar a forma com que o princípio ativo atua e também levar a manifestações clínicas indesejadas ao usuário. O objetivo desse estudo foi realizar análises microbiológicas e físico-químicas em cremes hidratantes capilares em uso. Foram coletadas seis amostras para realização dos testes de análise de características organolépticas, contagem total de bactérias mesófilas, contagem total de fungo e Teste do desafio do Sistema Conservante. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade e duas delas apresentaram contaminação bacteriana acima dos limites permitidos de 1,0 x 10^3 UFC de bactérias/g. Pode-se notar a necessidade de vigilância rigorosa em indústrias de cosméticos, como também se constatou a importância que tem o fabricante seguir cuidadosamente as Boas Práticas de Fabricação, visando um produto final eficaz e seguro ao consumidor. Além das Boas Práticas de Fabricação, o consumidor deve ter conhecimento do uso correto dos produtos de higiene pessoal e cosméticos, pois o mau uso pode possibilitar a entrada de microrganismos e possíveis danos futuros com o uso de produtos contaminados.

Palavras-Chave: Condicionadores; Cosméticos; Contaminação microbiana; Controle de qualidade.

ABSTRACT

Given the wide range of cosmetic products on the market, it is very important that they have adequate microbiological safety. In this way, it is relevant not only to manufacturers but also to their consumers. Changes resulting from microbial contamination in the formulation of the product may modify the way the active principle acts and also lead to undesired clinical manifestations of the user. The objective of this study was to perform microbiological and physico-chemical analyzes in capillary moisturizing creams in use. Six samples were collected for the analysis of organoleptic characteristics, total count of mesophilic bacteria, total fungus count and Preservative System challenge test. All samples were within the expiration date and two of them showed bacterial contamination above the permitted limits 1.0×10^3 CFU of bacteria/g. The need for strict surveillance in the cosmetics industry can be noted, as well as the importance of the manufacturer to follow the Good Manufacturing Practices carefully, aiming at an effective and safe final product to the consumer. In addition to Good Manufacturing Practices, consumers should be aware of the correct use of personal care products and cosmetics, as misuse may allow the entry of microorganisms and possible future damages through the use of contaminated products.

Keywords: Conditioners; Cosmetics; Microbial contamination; Quality control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das características organolépticas e da determinação de pH das amostras de cremes hidratantes.....15

Tabela 2 – Resultados das análises de contaminação inicial de bactérias em meio de cultura ágar PCA e em meio de cultura ágar SD nas amostras de cremes hidratantes.....16

Tabela 3 – Resultados das análises de contaminação inicial de fungos.....18

Tabela 4 – Aspectos das bactérias em meio de cultura ágar PCA presentes nos cremes contaminados.....19

Tabela 5 – Aspectos das bactérias em meio de cultura ágar SD presentes nos cremes contaminados.....19

Tabela 6 – Análises das bactérias crescidas em Ágar SS.....20

Tabela 7 – Resultados das amostras semeadas em meio de cultivo ágar TSI.....21

Tabela 8 - Resultados das contagens de *S. aureus* e de *K. pneumoniae* durante o teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes.....22

Tabela 9 - Resultados das contagens de *A. niger* durante o teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes.....23

Tabela 10 - Conservantes utilizados nas amostras escolhidas.....24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bactérias presentes na amostra 3 em meio de cultivo ágar PCA.....16

Figura 2 – Bactérias presentes na amostra 6 em meio de cultivo ágar PCA.....16

Figura 3 - Bactérias e fungos presentes na amostra 3 em meio de cultivo ágar SD.....17

Figura 4 - Bactérias presentes na amostra 6 em meio de cultivo ágar SD.....17

Figura 5 - Fungos presentes na amostra 1 em meio de cultivo ágar SD.....18

Figura 6 – Bactérias crescidas em Ágar SS.....20

Figura 7 – Bactérias semeadas em meio de cultivo ágar TSI.....22

Figura 8 – Teste do desafio conservante no dia zero.....23

Figura 9 – Teste do desafio conservante no dia zero.....24

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

DMDM – dimethyl-dimethyl

DP – Desvio Padrão

E. coli – Escherichia coli

H_2S – Sulfeto de hidrogênio

K. pneumoniae – Klebsiella pneumoniae

LB – *Luria-Bertani*

Log – Logaritmo

mL – Mililitro

n° - Número

ND – Não detectado

P. aeruginosas – Pseudomonas aeruginosas

p/v – Peso/Volume

PCA – Padrão para Contagem

pH – potencial hidrogeniônico

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SD – *Sabouraud Dextrose*

SS – *Salmonella Shigella*

TSI – Três açúcares e ferro

UFC/g – Unidades Formadoras de Colônias por grama ou

USP – *United State Pharmacopeia*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Cosméticos capilares presentes na história 1

1.2. Estrutura capilar 2

1.3.Xampus e Condicionadores Hidratantes Capilares 2

1.4.Contaminação microbiana em cosméticos 4

1.5.Conservantes 6

2. JUSTIFICATIVA 8

3. OBJETIVOS 9

3.1.Objetivo Geral 9

3.2.Objetivos Específicos 9

4. MATERIAIS E MÉTODOS 10

4.1. Equipamentos 10

4.2. Materiais 10

4.3. Reagentes 11

4.4. Coleta e preparo das amostras 12

4.5. Análises de características organolépticas e determinação de pH 12

4.6. Contagem total de bactérias mesófilas para análise de contaminação inicial nas amostras de cremes hidratantes 13

4.7. Contagem total de fungos para análise de contaminação inicial nas amostras de cremes hidratantes 13

4.8. Análises das bactérias presentes nas amostras contaminadas 13

4.9. Teste do desafio do Sistema Conservante 14

5. RESULTADOS 16

5.1.Características organolépticas e determinação de pH dos cremes hidratantes 16

5.2 Análises microbiológicas 16

5.2.1 Análise de contaminação microbiana inicial nas amostras de cremes hidratantes 16

5.2.2 Análises microscópicas das bactérias presentes nas amostras de cremes hidratantes contaminados 20

5.2.3 Análises em meios seletivos das bactérias presentes nas amostras contaminadas 21

5.3 Teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes 23
5.4 Análises dos conservantes contidos nas amostras 25
6. DISCUSSÃO 26
6.1 Características organolépticas e determinação de pH 26
6.2 Análises microbiológicas 26
6.3 Testes do desafio do sistema conservante e análises dos conservantes contidos nas amostras 29
7. CONCLUSÃO 30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cosméticos capilares presentes na história

A indústria de cosméticos possui uma variedade de produtos disponíveis. Desse modo, observa-se a contínua necessidade do ser humano em realizar mudanças em sua aparência. Esta tendência pode estar ligada a razões sociais como também à capacidade de proporcionar o bem-estar pessoal. Existem registros desse comportamento há quase meio milhão de anos atrás, evidenciado por achados arqueológicos que indicam o uso de produtos para decoração do corpo (CURRY; BRANNAN; GEIS, 2006).

A arte do cuidado dos cabelos é um atributo marcante do Egito Antigo, por meio de escavações arqueológicos encontraram grande quantidade de escovas, loções de tratamentos, entre outros produtos que eram utilizados para fins capilares. Desde então se observa a aplicação de cosméticos capilares, tais como tintas, *henna*, entre outros, que eram utilizadas para conseguir uma coloração escura às perucas (DAL'PIZZOL e*t al.,* 2013).

Há evidências que no Império Romano eram utilizados pentes contendo sulfeto de chumbo. Este composto em contato com o vinagre produzia uma coloração marrom escura, caracterizando-se como um cosmético capilar na antiguidade (OLIVEIRA *et al.,* 2014).

No Oriente Médio, os hebreus empregavam o uso de cosméticos não só para embelezamento, mas também para limpeza da pele, dentes e cabelos. Utilizavam produtos como romã, pomada de hissopo, azeite de oliva e óleo de semente de uva para esses fins (SUENAGA *et al.,* 2012).

O cabelo possui funções de proteção da cabeça contra raios solares e de fatores externos. Além dessa finalidade protetora, é também um adorno, principalmente para as mulheres (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999). Em todo histórico da civilização humana, a presença do cabelo e suas diversas mudanças no decorrer dos anos, apresentaram uma importância tanto em rituais, como em questões socioculturais, apresentando-se muitas vezes como um símbolo de atração (DAL'PIZZOL *et al*., 2013).

1.2. Estrutura capilar

A estrutura física do cabelo humano se divide em camadas. Sendo estas a cutícula, camada mais externa do fio; o córtex, camada mediana; e a medula, localizada na região central. Todas revestidas por membrana celular (ZHANG *el al*., 2015).

Já em sua composição, o cabelo é constituído por aminoácidos, lipídios e proteínas. A queratina, uma proteína muito presente no fio, constituída por cerca de 21 aminoácidos que estão interagindo entre si por meio de pontes dissulfeto (S-S), que são ligações covalentes que ajudam na estabilização da queratina. A ocorrência de diminuição nessas ligações pode levar a mudanças das propriedades mecânicas do fio (DE PAULA, 2001).

A cutícula é uma importante barreira protetora, que está exposta constantemente a agentes químicos e físicos. Os principais componentes presentes nas cutículas são a exocutícula e a endocutícula, com composições distintas que influenciam em reatividades diferentes frente ao produto a surfactantes, água e tratamentos cosméticos (WAGNER, 2006).

1.3. Xampus e Condicionadores Hidratantes Capilares

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N°211, de 14 de Julho de 2005, os xampus e condicionadores capilares de uso adulto estão classificados como Grau 1, sendo produtos categorizados como de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Estão enquadrados na regulamentação como produtos possuidores de propriedades básicas ou elementares para os quais não são requeridas informações detalhadas quanto a restrições e modo de uso, de acordo com as características intrínsecas do produto. Essa classificação se baseia na probabilidade da ocorrência de efeitos adversos devido ao uso inadequado do produto (BRASIL, 2005).

O xampu tem como função principal proporcionar a limpeza do couro cabeludo e fios, removendo substâncias indesejadas provenientes de suor, poluição ambiental, oleosidade e resíduos obtidos pelo uso anterior de outros produtos

capilares. Encontrar componentes que possuam essa característica de limpeza profunda é simples, porém deve-se observar que alguns desses componentes podem causar agressões a fibra capilar, deixando-a mais porosa, seca e com aparência desagradável (D'SOUZA; RATHI, 2015). Na composição dos xampus encontram-se como produto base os surfactantes, que possuem como função principal a detergência. Além desse composto existem agentes espessantes, estabilizadores de espuma, perolantes, conservantes, essências, corantes, diluentes e aditivos especiais (MOTTA, 2007).

Na fabricação de diversos xampus, são utilizadas bases fortes. Essa característica básica também é oferecida pelos surfactantes da formulação. Com isso, observa-se a presença de um pH básico acima de 7, diferente do pH do cabelo que varia entre 4 e 5, tendo um caráter ácido. Essa diferença de pH pode levar a alterações na estrutura dos fios, sendo importante a adição de algum tipo de ácido ao xampu, como o ácido cítrico ou até mesmo utilizar produtos posteriormente que apresentem o pH ácido, como os condicionadores (OLIVEIRA, 2013).

Na composição de condicionadores, encontra-se uma combinação de diversos ativos utilizados para tratamento. Apresentam caráter catiônico, pH ácido e são acrescidos de aditivos, dentre eles estão os óleos minerais, silicone, conservantes, parabenos e álcool isopropílico, sofrendo modificações ou adições de acordo com a produção de cada indústria. Devido sua característica catiônica, permite a fixação do condicionador ao fio, pela grande afinidade com a queratina (MOTTA, 2007). A aplicação de condicionadores é feita posteriormente à lavagem dos cabelos com o xampu. Possuindo diversas finalidades, tais como, hidratação dos fios, diminuição do atrito que pode ter sido causado anteriormente pelo xampu, facilitador do processo de pentear os cabelos, preventivo contra o destacamento das cutículas, redução de atrito superficial, entre outras específicas de cada formulação (COLOMBERA, 2004).

Os condicionadores comerciais são disponibilizados de diversas formas, dentre elas estão os cremes, géis, mousses e loções. Também podem ser categorizados de acordo com seu uso como: Condicionadores sem enxágue; *leave-in*; de tratamento intensivo; e de uso diário. Para os produtos que são destinados ao tratamento intensivo, a recomendação de uso é diferenciada, pois contém um nível

maior de ingredientes ativos que são mantidos nos cabelos por maior tempo antes de realizar o enxágue (REICH *et al*., 2009). Outro aspecto importante que deve ser levado em consideração são as vantagens para o tratamento de cabelos danificados por processos químicos, exposição ao sol, escovação e tinturas. Sendo todos esses processos agressores da fibra capilar, que causam desde pequenos danos até os irreparáveis. Para que possam atuar corretamente, os condicionadores capilares devem manter durante todo o período de validade, suas características físico-químicas e microbiológicas, evitando a inativação de componentes e também a possibilidade de causar danos ao usuário (SOUZA, 2015).

1.4. Contaminação microbiana em cosméticos

Tendo em vista a vastidão de produtos para o uso pessoal bem como cosméticos, estes devem possuir uma segurança microbiológica adequada. Sendo relevante não só para os fabricantes como também para seus consumidores (PITT *et al*., 2015). As alterações decorrentes de contaminação microbiana na formulação do produto podem modificar a forma com que o princípio ativo atua e também podem levar a mudanças nas características físicas causando perda na confiança dos consumidores com a empresa (GOMYO *et al.,* 2015).

Além de comprometer a qualidade do produto final devido à redução ou até mesmo perda da estabilidade, o uso de produtos contaminados podem levar a manifestações clínicas indesejadas ao usuário (YAMAMOTO *et al.,* 2004). Creme hidratantes capilares são aplicados nos cabelos e podem entrar em contato com partes sensíveis do corpo, como: olhos, boca e mucosas. A transmissão indesejada de microrganismos ocasionalmente traz prejuízos a saúde do consumidor, dependendo da quantidade de fungos e bactérias presentes no produto (SOARES *et al.,* 2015). Há um grande risco de o consumidor desenvolver irritações e infecções decorrentes da contaminação microbiológica, principalmente quando entram em contato com os olhos e a pele que estiver ferida ou machucada (LERANOZ, 2002).

Em meados da década de 1960 os cosméticos começaram a se tornar alvo de interesse, pois não haviam regulamentações adequadas que se aplicavam a estes produtos. Por meio de vários estudos desenvolvidos nessa época, os produtos

cosméticos analisados apresentavam-se com alta incidência de contaminação, tornando-se evidente a necessidade de implementação de normas para controle de qualidade visando solucionar o problema. Nesse mesmo período alguns pacientes apresentavam infecções que foram atribuídas a cosméticos contaminados o que reforçou a urgência da elaboração de medidas efetivas para a preservação do produto e segurança do consumidor (CURRY; BRANNAN; GEIS, 2006).

Existem diversas fontes de contaminação de cosméticos e é importante analisar detalhadamente durante a produção cada uma delas. As matérias primas dependem diretamente de sua origem. Quando são obtidas de origem sintética apresentam menor quantidade de microrganismos em relação às de origem natural, como os extratos vegetais. A água também é uma grande fonte de contaminação, se na prática de fabricação não for obtida da forma correta. No meio ambiente o ar pode conter fungos e esporos de bactérias, assim, deve ser evitado o contato do produto com correntes de ar para a redução desse tipo de contaminação. No uso pessoal do produto, o microrganismo pode ser trazido diretamente pelo próprio consumidor devido a pele possuir uma microbiota natural. Também existem fontes de contaminação pela embalagem, acondicionamento e nas práticas de fabricação (LERANOZ, 2002).

A RDC N° 481, de 23 de setembro de 1999 estabeleceu um limite de aceitabilidade para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais em produtos cosméticos, esta contagem não deve ultrapassar 10^3 UFC/g ou mL (BRASIL, 1999). Para evitar a contaminação microbiológica o fabricante deve seguir as boas práticas de fabricação e monitorar toda etapa de produção, mesmo que sejam seguidos todos os passos de forma correta pode haver uma contaminação pela característica do produto não ser esterilizado. A RDC N° 48, de 25 de outubro de 2013, apresenta todas etapas das boas práticas de fabricação de cosméticos para se obter um produto final com a máxima qualidade possível (BRASIL, 2013).

A avaliação microbiológica para cosméticos é essencial durante o desenvolvimento do produto e em sua produção, permitindo a escolha do melhor sistema conservante, analisando se este interage com os componentes da formulação, prejudicando ou não sua eficácia (ANVISA, 2004).

1.5. Conservantes

Desde a antiguidade os produtos cosméticos apresentam em suas formulações ingredientes que eram obtidos da natureza, sendo estes de origem animal, vegetal e mineral. Com o passar do tempo e com o avanço tecnológico essas formulações sofreram algumas alterações que trouxeram a adição de muitas substâncias químicas sintéticas a esses produtos (CHORILLI *et al*., 2009).

Para evitar ou diminuir a possibilidade de contaminação, o fabricante adiciona ao produto sistemas conservantes. Vale destacar que deve-se utilizar uma quantidade moderada desses, uma vez que podem causar reações adversas, como alergias quando sua quantidade não é monitorada e seguida de acordo com a legislação. O recomendado é que sejam aplicados em sua concentração inibitória mínima, ou seja, deve-se promover a inibição do crescimento bacteriano utilizando-se a menor quantidade de conservante possível (GOMYO *et al.,* 2015).

Deve haver uma investigação do sistema conservante utilizado e quais suas concentrações, pois diversas empresas cosméticas buscam a manutenção da carga microbiana dentro dos padrões estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e assim os utilizam demasiadamente sem ponderar que existe uma toxicidade que pode ser oferecida ao usurário por esse tipo de produto (PINTO *et al.,* 2004).

Os métodos preconizados pela ANVISA para avaliação microbiológica de cosméticos são o Teste de Desafio do Sistema Conservante (*Challenge Test*) e a contagem microbiana (ANVISA, 2004). No teste referido, ocorre a contaminação proposital da amostra analisada com microrganismos selecionados. O objetivo desse procedimento é garantir que o produto cosmético possua uma formulação adequada que preserve o produto no período de uso pelo consumidor. Com isso pode-se verificar se a quantidade do sistema conservante utilizada é viável ao período de validade (RUSSELL, 2003).

Os conservantes utilizados em produtos cosméticos devem estar de acordo com a RDC N°29 de 2012, esta disponibiliza a quantidade e o nome de cada conservante permitido para uso no país. No Brasil existem 57 tipos de conservantes

que podem ser adicionados de acordo com essa resolução (ANVISA, 2012). Para ser estável os cosméticos devem manter esterilidade ou devem apresentar crescimento microbiano. Essa estabilidade é oferecida por conservantes, que garantem a eficácia do produto (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Com a variedade de condicionadores hidratantes capilares oferecidos pelas indústrias cosméticas, existe a preocupação sobre a qualidade do produto final, tanto para os produtores como para a agência regulatória e consumidores do mesmo.

O crescimento microbiológico em cosméticos, pode promover mudança nos princípios ativos presentes, sendo importante que não haja tal contaminação para que o produto final chegue até o consumidor e permaneça até o término do uso ou de sua data validade mantendo todas suas características originais. Para ter esse controle a formulação deve conter conservantes que possuam características preconizadas na legislação, impedindo assim o desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias que podem causar complicações maiores aos usuários.

Apesar do empenho da indústria na seleção do tipo e concentração ideal do conservante, não há grande divulgação da maneira correta de uso do produto, visando eliminar a contaminação feita pelo consumidor, por meio do uso incorreto. Em sua grande maioria, os cremes hidratantes capilares são acondicionados em potes de boca larga sem utensílio para que se faça a retirada do produto da embalagem evitando o contato com as mãos, que é uma possível fonte de contaminação.

Assim, de posse desse conhecimento observacional dos produtos condicionadores e de uma busca bibliográfica que não encontrou estudos empregando como alvo de estudo de controle de qualidade microbiológico a forma cosmética escolhida, optou-se por realizar essa pesquisa, uma vez que o produto é amplamente utilizado pela população brasileira e não há dados sobre a qualidade microbiológica dos produtos disponíveis no mercado durante o uso pelo consumidor.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiológicas e físico-químicas de cremes hidratantes capilares em uso.

3.2. Objetivos Específicos

- Coletar amostras de cremes hidratantes capilares em uso.
- Analisar o pH e características organolépticas das amostras.
- Analisar a qualidade microbiológica das amostras através da contagem total de bactérias mesófilas e fungos.
- Realizar o Teste de Desafio do Sistema Conservante
- Comparar os resultados com outros estudos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Os equipamentos listados foram utilizados durantes as análises físico-químicas e microbiológicas dos cremes hidratantes capilares comerciais:

- Medidor de pH digital (GEHAKA);
- Balança analítica (MARTE CIENTÍFICA);
- Balança semi-analítica (MARTE CIENTÍFICA);
- Estufa bacteriológica (FANEM);
- Refrigerador (CONSUL);
- Chapa de aquecimento com agitação (LOGEN);
- Autoclave (PRISMATEC);
- Micropipetas automáticas de 100 e de 1000 microlitros (LASANY).

4.2. Materiais

Os materiais listados foram utilizados durantes as análises físico-químicas e microbiológicas dos cremes hidratantes capilares comerciais:

- Béqueres (600 mL, 1000 mL);
- Tubos de ensaio;
- Erlenmeyers (250 mL);
- Tubos Falcon (15 mL e 50 mL);
- Ponteiras (0,1 mL e 1 mL);
- Placas de petri esterilizadas (90x15 mm);
- Espátulas esterilizadas;
- Alças bacteriológicas;
- Lâminas;
- Lamparina;
- Provetas (250 mL, 500 mL).

4.3. Reagentes

Os reagentes listados foram utilizados durantes as análises físico-químicas e microbiológicas dos cremes hidratantes capilares comerciais:

- Agar Padrão para Contagem – Agar PCA (KASVI): meio recomendado pela ANVISA para determinação de bactérias totais em amostras de alimentos e medicamentos.
- Agar Sabouraud Dextrose 4% - Agar SD (HIMEDIA): meio recomendado pela ANVISA para determinação de fungos totais em amostras de alimentos e medicamentos. Pode haver crescimento bacteriano devido o meio possuir a presença de nutrientes suficiente.
- Agar Três Açúcares e Ferro - Agar TSI (HIMEDIA): este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açucares do meio) tornando a base e a superfície do meio para cor amarela. Se o microrganismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo). Na ausência de fermentação não são produzidos ácidos, o que faz com que o meio permaneça na cor vermelha. Pode ser neste caso, *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria não fermentadora de açúcares e que não pertence à família das enterobactérias (ANVISA, 2010).
- Agar Salmonella Shigella - Agar SS (HIMEDIA): meio seletivo para enterobactérias, onde as colônias fermentadoras de lactose produzem ácidos e fazem o indicador de pH do meio (vermelho neutro) alterar a cor das colônias para cor rosa. As colônias não fermentadoras de lactose apresentam cor branca leitosa ou coloração negra devido à produção de sulfeto de ferro (ANVISA, 2010).

- Peptona bacteriológica (HIMEDIA): foi utilizada para o preparo de água peptonada 0,1% (p/v) que foi usada nos ensaios microbiológicos como caldo diluente.
- Caldo Luria-Bertani - Caldo LB (KASVI): usado para cultivos de rotina de microrganismos não particularmente exigentes e nas análises foi usado para o cultivo das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705.
- Reativos para coloração de gram (solução de violeta de metila, lugol, álcool etílico 99,5ºGL e solução de safranina ou fucsina)

4.4. Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas seis amostras de cremes hidratantes capilares comerciais abertos (em uso) e que estavam dentro do prazo de validade, sendo esses de marcas diferentes. As amostras obtidas foram levadas em sua embalagem original e permaneceram no laboratório de Controle de Qualidade da Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia, até o final das análises.

Para o preparo das amostras, pesou-se 10 g de cada creme em 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril. As amostras foram homogeneizadas em agitador magnético até total dissolução dos produtos, obtendo-se a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) até a diluição (10^{-3}).

Para realizar as diluições de (10^{-2}) a (10^{-3}), partindo da diluição 10^{-1} retirou-se 1 mL de amostra e transferiu-se para um tubo falcon contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril, homogeneizou-se e obteve-se, então, a diluição (10^{-2}) e por fim transferiu-se 1 mL dessa diluição para outro tubo falcon com 9 mL de água peptonada, obtendo-se a diluição (10^{-3}).

4.5. Análises de características organolépticas e determinação de pH

Foram realizadas análises dos aspectos visuais das amostras, tais como, cor, odor e aparência.

Para a realização da determinação de pH utilizou-se o pHmetro no qual foi medido diretamente submergindo o eletrodo no frasco de acondicionamento da amostra, esperando-se alguns segundos até a estabilização do medidor.

4.6. Contagem total de bactérias mesófilas para análise de contaminação presente nas amostras de cremes hidratantes

Para a contagem total de bactérias mesófilas, inoculou-se 1 ml de cada diluição das amostras de cremes hidratantes em placas estéreis vazias e verteu-se o meio de cultivo ágar PCA, utilizando-se da técnica de plaqueamento por profundidade. Esta técnica consistem em adicionar ao meio de cultura fundido, a amostra diluída em placa de Petri esterilizada, homogeneizando rapidamente em círculos e espera-se solidificar o meio de cultura. Após solidificação, as placas foram incubadas a 35ºC por 48 horas. Os resultados foram expressos como média de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

4.7. Contagem total de fungos para análise de contaminação inicial nas amostras de cremes hidratantes

Para a contagem total de fungos, inoculou-se 1 ml de cada diluição das amostras de cremes hidratantes em placas estéreis vazias e verteu-se o meio de cultivo ágar SD, utilizando-se da técnica de plaqueamento por profundidade. Após solidificação, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 7 dias. Os resultados foram expressos como média de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

4.8. Análises das bactérias presentes nas amostras contaminadas

As amostras de cremes analisadas que já possuíam contaminação por bactérias não participaram do teste do desafio conservante que foi realizado posteriormente e foram separadas para a contagem e determinação das bactérias existentes. Para a análise microscópica das colônias, produziram-se lâminas com esfregaços para coloração de Gram.

Posterior às análises microscópicas, as colônias gram negativas dos cremes contaminados foram semeadas através da técnica de estriamento simples em placas de petri contendo o meio de cultivo ágar SS, com incubação a 35°C por 48 horas. As colônias também foram semeadas em tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar TSI, que foi incubado a 35°C por 24 horas.

4.9. Teste do desafio do Sistema Conservante

O Teste do Desafio do Sistema Conservante de acordo com a *United State Pharmacopeia* (USP) consistiu na contaminação proposital dos cremes hidratantes com microrganismos específicos (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 *e Aspergillus niger* ATCC 22342) e determinação da carga sobrevivente nas amostras em intervalos de tempo definidos, com o objetivo de avaliar a eficácia do sistema conservante necessário à proteção dos produtos.

Para o preparo dos inóculos, as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 foram semeadas em caldo LB e incubadas a 35°C por 24 horas. Para determinar a carga bacteriana inserida nas amostras, transferiu-se 0,2 mL dos inóculos bacterianos para 20 mL de caldo LB, realizaram-se as diluições (10^{-1} a 10^{-4}) e semearam-se as diluições em placas de petri contendo o meio de cultivo ágar PCA através da técnica de semeadura em superfície, com incubação a 35ºC por 24 horas. Após isso foi realizada a contagem de colônias de *S. aureus* e de *K. pneumoniae*.

Para o preparo do inóculo de *Aspergillus niger* ATCC 22342, colocou-se 20 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril em erlenmeyer contendo o fungo crescido em meio ágar Sabouraud dextrose. Com auxilio de uma espátula esterilizada, foi realizada a raspagem dos esporos até a obtenção de uma solução de esporos fúngicos contendo 10^5 - 10^6 esporos/g.

A inoculação dos cremes foi realizada com as suspensões dos micro-organismos em separado, transferindo-se 0,2 mL de cada inóculo para 20 g dos cremes pesados em tubos falcon de 50 mL esterilizados. Uma vez realizada a inoculação, 1 mL de cada formulação foi diluída em tubos contendo 9 mL de água peptonada, homogeneizou-se obtendo a diluição (10^{-1}). Transferiu-se 1 mL da diluição (10^{-1}) para outro tubo contendo 9 mL de água peptonada, obtendo-se a diluição (10^{-2}) e assim fez-se sucessivamente até chegar a diluição (10^{-4}).

Alíquotas de 1 mL foram retiradas das diluições e transferidas para placas de petri vazias e esterilizadas e verteu-se o meio de cultivo ágar PCA para as amostras contaminadas com bactérias e meio de cultivo ágar SD para as amostras contaminadas com fungo, utilizando-se da técnica de plaqueamento por profundidade. Após solidificação dos meios, as placas contendo ágar PCA foram incubadas a 35ºC por 48 horas e as placas contendo ágar SD foram incubadas em

temperatura ambiente por 7 dias. Os resultados foram expressos como média de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

O procedimento do teste do desafio do sistema conservante foi repetido após 7 dias de contaminação dos cremes hidratantes, seguindo os mesmos parâmetros acima apresentados.

5. RESULTADOS

5.1. Características organolépticas e determinação de pH dos cremes hidratantes

Nenhuma das amostras apresentaram alterações de cor, odor e aparência.

Tabela 1 – Resultados das características organolépticas e da determinação de pH das amostras de cremes hidratantes

Amostras	Cor	Odor	Aparência	pH
1	Branco	Característico	Sem alterações	4,27
2	Branco	Característico	Sem alterações	4,35
3	Bege	Característico	Sem alterações	5,85
4	Branco	Característico	Sem alterações	6,16
5	Branco	Característico	Sem alterações	3,07
6	Bege	Característico	Sem alterações	6,23

Fonte: Própria Autora, 2016.

5.2 Análises microbiológicas

5.2.1 Análise de contaminação microbiana inicial nas amostras de cremes hidratantes

Considerando que neste estudo foram coletadas seis amostras de cremes hidratantes capilares comerciais abertos em uso, foi necessário verificar se as amostras já apresentavam contaminação microbiana inicial. A Tabela 2 e as figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam os resultados da presença de contaminação inicial de bactérias nas amostras de cremes hidratantes analisadas neste estudo. Observou-se que as amostras 3 e 6 apresentaram contaminação por bactérias que cresceram tanto no ágar PCA incubado por 48 horas a 35^{o}C quanto no ágar SD incubado por 5-7 dias em temperatura ambiente.

Tabela 2 – Resultados das análises de contaminação inicial de bactérias em meio de cultura ágar PCA e em meio de cultura ágar SD nas amostras de cremes hidratantes

Amostras	Bactérias (Agar PCA) UFC/g	Log UFC/g ± DP	Bactérias (Agar SD) UFC/g	Log UFC/g ± DP
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	$4,84x10^3$	3,47 ± 0,67	$2,61x10^3$	3,40 ± 0,14
4	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	$6,60 \times 10^3$	3,64 ± 0,50	$3,73 \times 10^4$	4,57 ± 0,03

Os resultados foram expressos como média de contagens das diferentes diluições; DP = desvio padrão; ND = não detectado. (Fonte: Própria Autora, 2016).

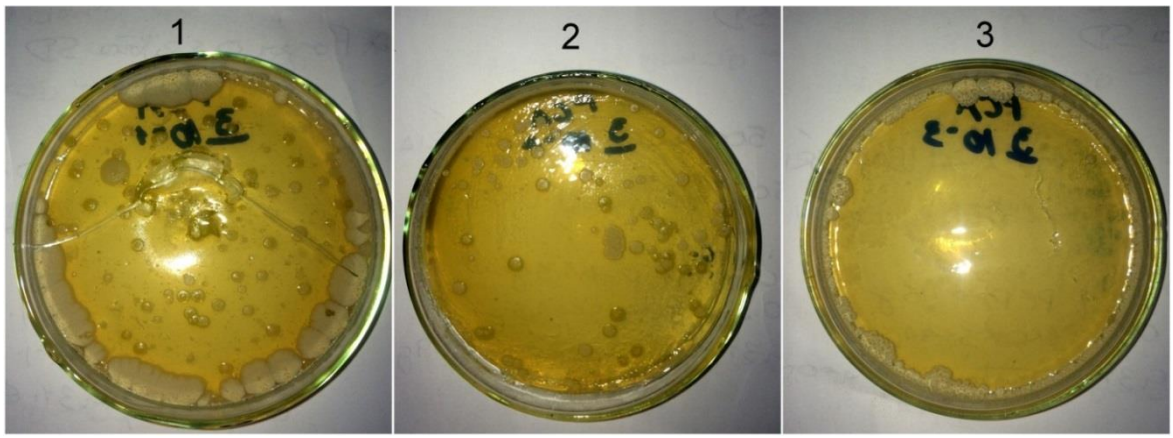


Figura 1 – Bactérias presentes na amostra 3 em meio de cultivo ágar PCA: 1-Amostra na diluição 10^{-1}; 2- Amostra na diluição 10^{-2}; 3- Amostra na diluição 10^{-3} (Fonte: Própria Autora, 2016).

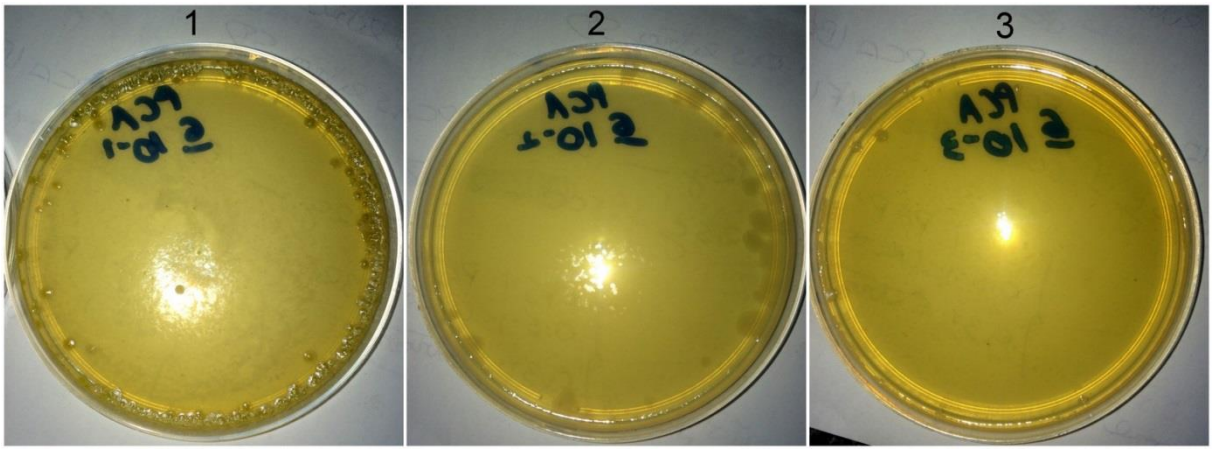


Figura 2 – Bactérias presentes na amostra 6 em meio de cultivo ágar PCA: 1-Amostra na diluição 10^{-1}; 2- Amostra na diluição 10^{-2}; 3- Amostra na diluição 10^{-3}. (Fonte: Própria Autora, 2016).

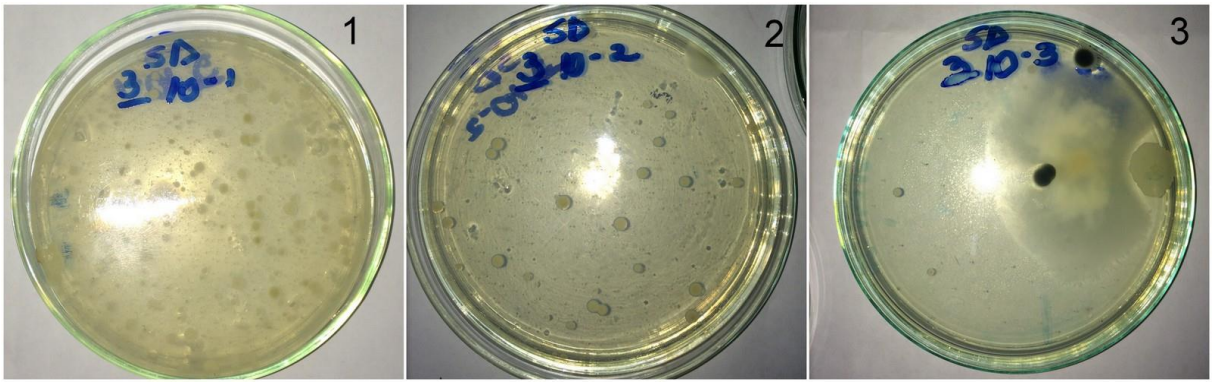


Figura 3 - Bactérias e fungos presentes na amostra 3 em meio de cultivo ágar SD: 1 - Amostra na diluição 10^{-1}; 2- Amostra na diluição 10^{-2}; 3- Amostra na diluição 10^{-3} (Fonte: Própria Autora, 2016).

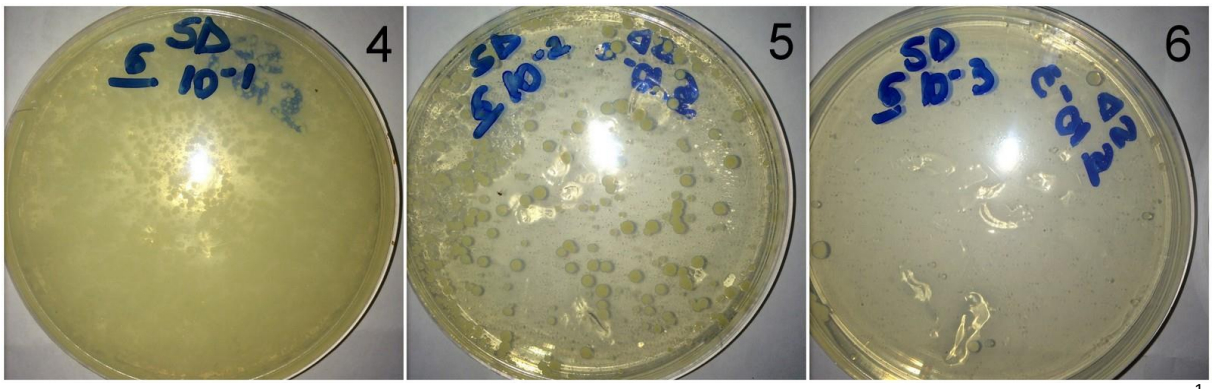


Figura 4 - Bactérias presentes na amostra 6 em meio de cultivo ágar SD: 4- Amostra na diluição 10^{-1}; 5- Amostra na diluição 10^{-2}; 6- Amostra na diluição 10^{-3} (Fonte: Própria Autora, 2016).

As amostras 3 e 6 apresentaram contagens de bactérias acima dos limites permitidos pela Farmacopeia Brasileira (2010) para produtos não estéreis que é de no máximo 1,0 x 10^3 UFC de bactérias/g (BRASIL, 1999). A RDC nº 481 que estabelece os parâmetros para controle microbiológico de produtos cosméticos limita a contagem de microrganismos totais a no máximo 5,0 x 10^2 UFC /g ou mL em cosméticos para uso infantil e produtos que entram em contato com olhos e mucosas. Assim, as amostras 3 e 6 foram descartadas para o teste do desafio sistema conservante.

A Tabela 3 e a figura 5 apresentam os resultados da presença de contaminação inicial de fungos nas amostras de cremes hidratantes analisadas neste estudo.

Tabela 3 – Resultados das análises de contaminação inicial de fungos

Amostras	Fungos (Agar SD) UFC/g	Log UFC/g ± DP
1	$1{,}00 \times 10^{2}$	1,65 ± 0,91
2	ND	ND
3	$5{,}50 \times 10^{1}$	1,50 ± 0,70
4	ND	ND
5	ND	ND
6	ND	ND

Os resultados foram expressos como média de contagens das diferentes diluições; DP = desvio padrão; ND = não detectado. (Fonte: Própria Autora, 2016).

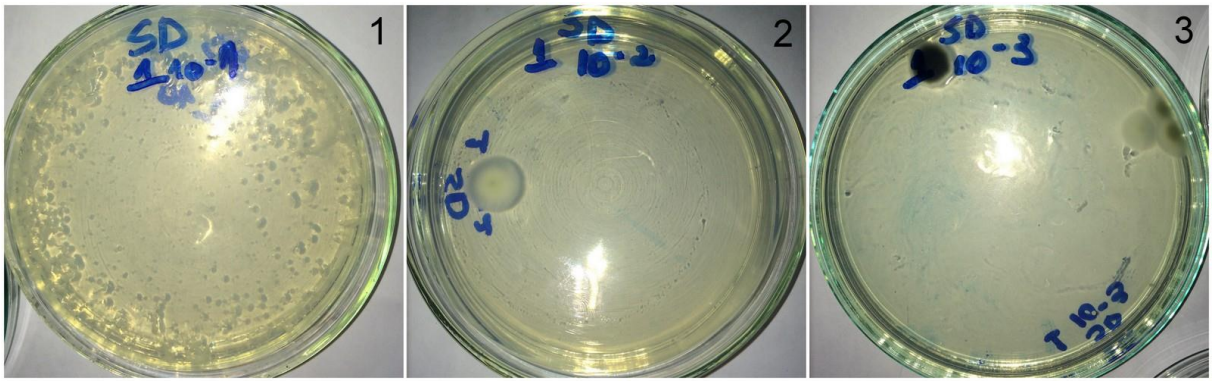


Figura 5 - Fungos presentes na amostra 1 em meio de cultivo ágar SD: 1- Amostra na diluição 10^{-1}; 2- Amostra na diluição 10^{-2}; 3- Amostra na diluição 10^{-3} (Fonte: Própria Autora, 2016).

A amostra 1 apresentou contagem de fungos dentro dos limites microbianos aceitáveis pela Farmacopeia Brasileira (2010) que estabelece no máximo $1{,}0 \times 10^{2}$ UFC de fungos/g para produtos não estéreis. Assim como a amostra 1, as amostras 2, 4 e 5 foram incluídas no teste do desafio sistema conservante dos cremes hidratantes.

5.2.2 Análises microscópicas das bactérias presentes nas amostras de cremes hidratantes contaminados

Algumas colônias de bactérias isoladas dos cremes hidratantes 3 e 6 que cresceram tanto no ágar PCA quanto no ágar SD foram submetidas a coloração de gram. As colônias amarelas (aspecto macroscópico) isoladas do ágar PCA e do ágar SD nas amostras 3 e 6, após a coloração de gram, apresentaram-se como bacilos gram negativos. Já as colônias esbranquiçadas e leitosas isoladas do ágar PCA na amostra 6 eram bacilos gram positivos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Aspectos das bactérias em meio de cultura ágar PCA presentes nos cremes contaminados

Amostras	Diluições	Aspecto Macroscópico das Colônias	Morfologia das colônias
3	10^{-1}	Amarela	Bacilos gram -
3	10^{-2}	Amarela	Bacilos gram -
3	10^{-1}	Branca	Bacilos gram -
6	10^{-1}	Esbranquiçada	Bacilos gram +
6	10^{-2}	Esbranquiçada leitosa	Bacilos gram +
6	10^{-3}	Esbranquiçada leitosa	Bacilos gram +

Fonte: Própria Autora, 2016.

Tabela 5 – Aspectos das bactérias em meio de cultura ágar SD presentes nos cremes contaminados

Amostra	Diluições	Aspecto Macroscópico das Colônias	Morfologia das colônias
3	10^{-1}	Amarela	Bacilos gram -
3	10^{-2}	Amarela	Bacilos gram -
6	10^{-2}	Amarela	Bacilos gram -

Fonte: Própria Autora, 2016.

5.2.3 Análises em meios seletivos das bactérias presentes nas amostras contaminadas

As colônias de bactérias que cresceram nas amostras de cremes hidratantes 3 e 6 e que após a coloração de gram apresentaram-se como bacilos gram negativos foram semeadas nos meios seletivos ágar SS e ágar TSI, foram selecionadas apenas algumas colônias para realização do teste. Conforme observado na Tabela 6 e Figura 6, as colônias que cresceram no ágar SS eram fermentadoras de lactose (colônias de cor rosa), sugerindo a presença de enterobactérias fermentadoras de lactose como *Klebsiella* sp ou *Escherichia coli*.

Tabela 6 – Análises das bactérias crescidas em Ágar SS

Identificação da colônia no SS	Amostras/ Diluições	Aspecto Macroscópico das Colônias	Morfologia das colônias
1	3 (10^{-1})	Rosa	Bacilo gram -
2	3 (10^{-2})	Rosa	Bacilo gram -
3	6 (10^{-1})	Rosa	Bacilo gram -

Fonte: Própria Autora, 2016.

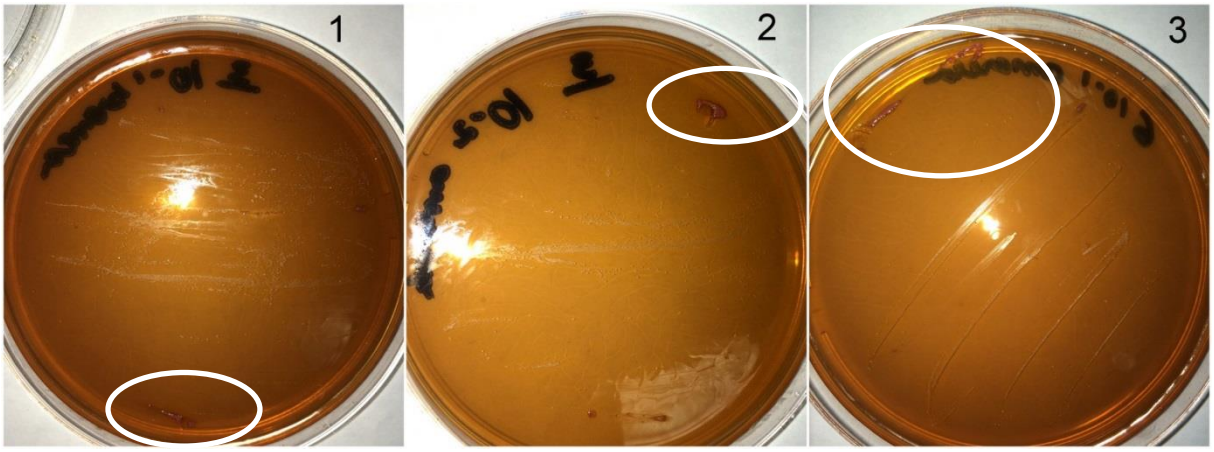


Figura 6 – Bactérias crescidas em Ágar SS: 1- Amostra 3 na diluição 10^{-1}; 2- Amostra 3 na diluição 10^{-2}; 3- Amostra 6 na diluição 10^{-1}. (Fonte: Própria Autora, 2016).

A Tabela 7 e Figura 7 apresentam os resultados das bactérias que foram semeadas no ágar TSI e identificadas como suspeitas de serem *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactéria fermentadora de lactose.

7 – Resultados das amostras semeadas em meio de cultivo ágar

Identificação da colônia no TSI	**Amostras e Diluições**	**Meio de Cultura**	**Resultado (cor do TSI)**	**Bactérias suspeitas**
1	3 (10^{-1})	SD	Rosa	*Pseudomonas aeruginosa*
2	3 (10^{-1})	SD	Rosa	*Pseudomonas aeruginosa*
3	3 (10^{-2})	SD	Laranja	Resultado indefinido
4	3 (10^{-2})	SD	Laranja	Resultado indefinido
5	6 (10^{-2})	SD	Laranja	Resultado indefinido
6	6 (10^{-2})	SD	Inalterado	Não houve crescimento
7	3 (10^{-2})	PCA	Amarelo	Enterobactéria fermentadora de lactose
8	3 (10^{-2})	PCA	Rosa	*Pseudomonas aeruginosa*
9	6 (10^{-1})	PCA	Inalterado	Não houve crescimento
10	6 (10^{-3})	PCA	Inalterado	Não houve crescimento

Fonte: Própria Autora, 2016.

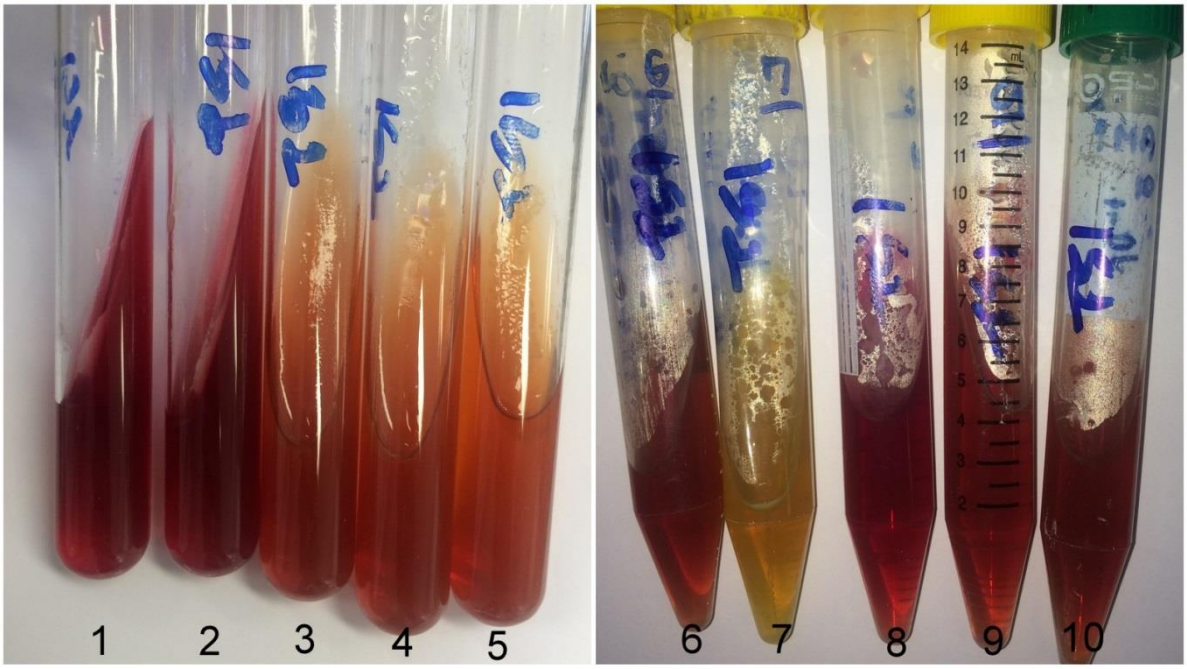


Figura 7 – Bactérias semeadas em meio de cultivo ágar TSI. (Fonte: Própria Autora, 2016).

5.3 Teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes

As amostras de cremes 3 e 6 que apresentaram contaminação por bactérias acima dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010) não participaram do teste do desafio conservante. A carga bacteriana inicial inserida nas amostras foi de 10^4 UFC/g de *S. aureus* e 10^6 UFC/g de *K. pneumoniae.* A Tabela 8 apresenta os resultados das contagens de *S. aureus* e de *K. pneumoniae* durante o teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes.

Tabela 8 - Resultados das contagens de *S. aureus* e de *K. pneumoniae* durante o teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes

Amostras	***S. aureus***			***K. pneumoniae***		
	Dia 0	**Dia 0**	**Dia 7**	**Dia 0**	**Dia 0**	**Dia 7**
	UFC/g	log UFC/g ± DP	UFC/g	UFC/g	log UFC/g ± DP	UFC/g
1	$2,45 \times 10^4$	4,08 ± 0,82	ND	$1,57 \times 10^4$	3,91 ± 0,61	ND
2	$1,05 \times 10^3$	2,65 ± 0,92	ND	$1,15 \times 10^3$	2,89 ± 0,58	ND
4	$2,02 \times 10^3$	2,45 ± 1,00	ND	$5,50 \times 10^1$	1,50 ± 0,70	ND
5	$2,75 \times 10^3$	3,20± 0,70	ND	ND	ND	ND

Os resultados foram expressos como média de contagens das diferentes diluições; DP = desvio padrão; ND = não detectado, não houve crescimento de colônias. (Fonte: Própria Autora, 2016).

A Tabela 9 e Figuras 8 e 9 apresentam os resultados das contagens de *A. niger* durante o teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes.

Tabela 9 - Resultados das contagens de *A. niger* durante o teste do desafio do sistema conservante dos cremes hidratantes

Amostras	**Dia 0** UFC/g	**Dia 0** log UFC/g ± DP	**Dia 7** UFC/g
1	$1,33 \times 10^4$	4,06 ± 0,34	ND
2	$1,22 \times 10^4$	3,97 ± 0,46	ND
4	$3,00 \times 10^3$	3,35 ± 0,49	ND
5	$1,35 \times 10^3$	3,07 ± 0,32	ND

Os resultados foram expressos como média de contagens das diferentes diluições; DP = desvio padrão; ND = não detectado, não houve crescimento de colônias (Fonte: Própria Autora, 2016).

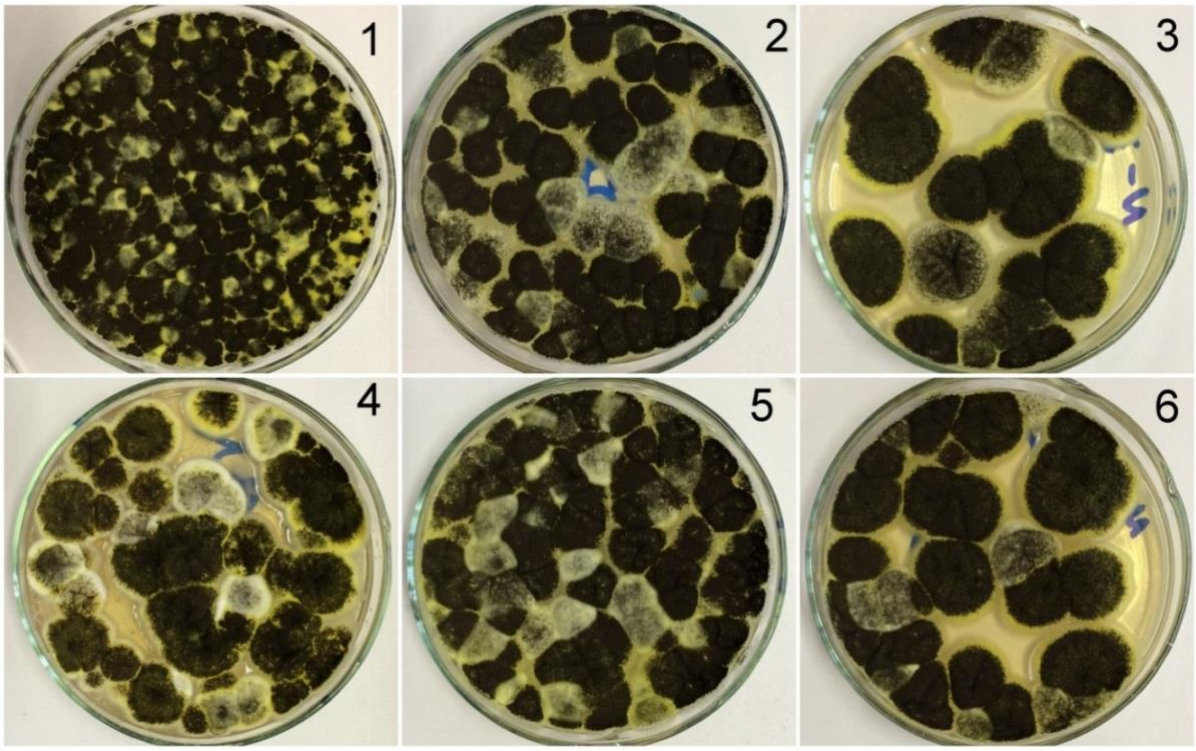


Figura 8 – Teste do desafio conservante no dia zero: 1- Amostra 1 na diluição 10^{-1}; 2- Amostra 1 na diluição 10^{-2}; 3- Amostra 1 na diluição 10^{-3}, 4- Amostra 2 na diluição 10^{-1}; 5- Amostra 2 na diluição 10^{-2}; 6- Amostra 2 na diluição 10^{-3}. (Fonte: Própria Autora, 2016).

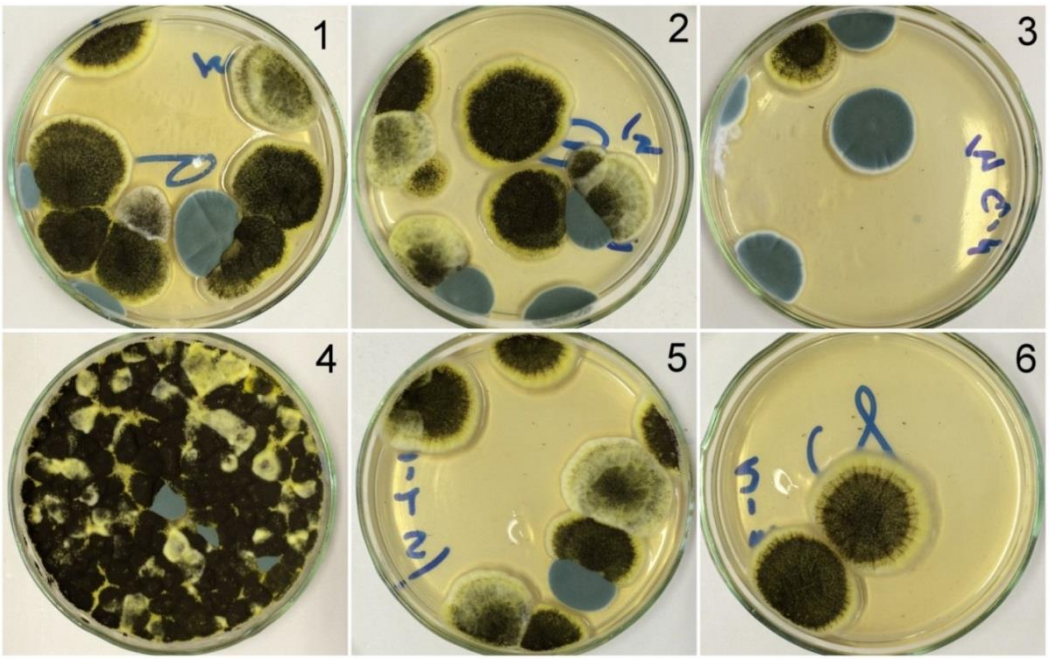


Figura 9 – Teste do desafio conservante no dia zero: 1- Amostra 4 na diluição 10^{-1}; 2- Amostra 4 na diluição 10^{-2}; 3- Amostra 4 na diluição 10^{-3}, 4- Amostra 5 na diluição 10^{-1}; 5- Amostra 5 na diluição 10^{-2}; 6- Amostra 5 na diluição 10^{-3}. (Fonte: Própria Autora, 2016).

A partir dos resultados obtidos no teste do desafio conservante verificou-se que todos os sistemas conservantes desafiados passaram no teste de eficácia, pois houve a inibição do crescimento microbiano a partir do sétimo dia de contaminação dos cremes.

5.4 Análises dos conservantes contidos nas amostras

Tabela 10 – Conservantes utilizados nas amostras escolhidas

Amostras	Nomes dos conservantes
1	*Methylisothiazolinone e Phenoxyethanol*
2	*Diazolidinyl urea*
3	*DMDM Hydantoin*
4	*Diazolidinyl urea*
5	*Methyparaben e DMDM Hydantoin*
6	*DMDM Hydantoin, Methylisothiazolinone e Methylchlorothiazolinone*

(fonte: própria autora, 2016).

6. DISCUSSÃO

6.1 Características organolépticas e determinação de pH

As amostras 3 e 6, mesmo apresentando contaminação bacteriana acima dos limites estabelecido pela RDC n°481 de 1999, não apresentaram alterações no odor, cor e aparência. Sendo este um fator negativo, visto que o consumidor leva apenas estes critérios em consideração quando realiza o uso do produto. Alterações aparentes seriam um possível motivo que limitariam o uso dos produtos contaminados.

Por outro lado as amostras 1, 2, 4 e 5 não apresentaram alterações nas características organolépticas, sendo um fator positivo, pois as características desejadas se mantiveram estáveis conforme o prazo de validade do produto.

O pH é um fator importante para condicionadores hidratantes capilares, que deve ser mais ácido e próximo ao pH capilar, que é levemente ácido. Uma limitação desse estudo foi a medição pontual do pH, realizada apenas uma vez durante a fase experimental do estudo, visto que a avaliação deste parâmetro durante todo o experimento daria resultados mais amplos sobre as variações deste fator e sua correlação com a estabilidade.

Todas as amostras apresentaram pH ácido ou levemente ácido, de acordo com o esperado para produtos que são utilizados nos cabelos após o xampu, numa faixa de pH 4 – 5 que está próxima ao pH do cabelo (OLIVEIRA, 2013).

6.2 Análises microbiológicas

Todos os cremes hidratantes estavam dentro do prazo de validade, porém as amostras 3 e 6 apresentaram contaminação bacteriana acima dos limites estabelecidos pela RDC n°481 de 1999. Uma das amostras apresentou possível contaminação por *Pseudomonas aeruginosas* que é uma bactéria patogênica para o ser humano. É importante que o produto permaneça com as características estáveis até a validade final, pois com a contaminação podem haver perdas ou alterações nos princípios ativos, além de ser indesejável a presença de bactérias devido ao perigo que trazem ao consumidor.

A pele possui uma microbiota natural que é caracterizada pela presença de bactérias transitórias e residentes (CUSTODIO *et al.,* 2009). Deve-se atentar para o uso manual de cosméticos, caso dos condicionadores vendidos em frascos de boca larga, pois as mãos são uma possível fonte de contaminação. Nenhuma das amostras apresentaram em sua embalagem original orientações ou sugestões de objetos para retirada do produto sem que haja o contato com as mãos. Seria interessante que os produtos viessem acompanhados de uma espátula ou orientações para fazer o uso correto visando um contato mínimo do produto com as mãos. O bom uso do produto conserva por mais tempo as suas características originais.

O fabricante deve garantir a qualidade final do produto, fazendo-se necessário a garantia de sua segurança e eficácia. Cosméticos possuem composição complexa, gerando um ambiente com nutrientes suficientes para crescimento de microrganismos indesejáveis, por isso deve-se seguir corretamente as etapas de boas práticas na fabricação para que tenha qualidade microbiológica e chegue até o consumidor com características aceitáveis para o uso (YAMAMOTO *et al.,* 2004).

Yamamoto e colaboradores (2004) demonstraram em estudo que 40% de empresas de cosméticos, produtos farmacêuticos e fitoterápicos apresentaram falha em relação a presença de contaminantes acima dos limites preconizados, apresentando microrganismos aeróbios viáveis e fungos. Em comparação com este estudo uma dessas amostras analisadas foi reprovada devido a presença de *Pseudomonas aeruginosas,* e também se observou contaminação bacteriana acima dos limites estabelecidos nas amostras.

Um dos danos que a *Pseudomonas aeruginosas* pode causar, são infecções que tem grande importância clínica devido a apresentação de múltipla resistência a antimicrobianos. Devido a essa característica de múltipla resistência, a eliminação da doença se torna mais difícil. (NEVES, *et al.*, 2011)

De acordo com Sutton (2006) a preocupação maior em relação a contaminação de cosméticos é a presença de agentes patogênicos que apresentam perigo a saúde. Podendo acarretar uma possível infecção ao usuário do produto. Nesse trabalho as possíveis bactérias presentes nas amostras 3 e 6 foram

Pseudomonas aeruginosas e Enterobactéria fermentadora de lactose. Essas bactérias são citadas pelo autor como frequentes contaminantes em cosméticos.

Pitt e colaboradores (2015) descrevem a presença de *Bacillus cereus* em cosméticos. Sabe-se que é uma bactéria beta hemolítica gram-positiva que possui algumas cepas prejudiciais aos seres humanos, sendo um fator negativo na segurança de produtos que tem contato com os olhos ou cosméticos faciais. Não se obteve nenhum relato na literatura de infecções causadas por esse agente em outros locais do corpo.

Outro estudo que verificou a presença de bactérias em amostras de cosméticos foi o de Soares e colaboradores (2015). Dentre os seis produtos analisados, houve crescimento bacteriano e fúngico em 75% das amostras manipuladas enquanto as industrializadas não apresentaram esse perfil. Enfatizando que é necessário um controle de qualidade na fabricação do produto para que haja uma qualidade final e o consumidor utilize com segurança.

Medeiros e colaboradores (2007) analisaram contaminantes microbiológicos presentes em cosméticos obtidos de farmácia de manipulação e apenas uma de nove amostras estava dentro dos padrões estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, demonstrando novamente o risco ao usuário dos produtos.

No estudo de Santos (2015) uma das três amostras de cosméticos analisadas apresentava contaminação acima do permitido pela RDC n°481 de 1999, a contagem atingiu valores acima de 10^3 UFC/g. Demonstrou também que nenhuma das amostras apresentou bactérias patogênicas apesar de indicar um crescimento microbiológico acima do permitido.

No ano de 2015, Rosa e colaboradores avaliaram xampu e condicionadores infantis, totalizando dez amostras de cada um. No estudo, 50% dos xampus e 30% dos condicionadores apresentaram crescimento bacteriano acima dos limites estabelecidos. Resultado semelhante ao encontrado para os condicionadores avaliados neste estudo, 33% das amostras apresentaram contaminação. Porém não foram encontrados microrganismos patogênico. Enfatizando novamente a importância das Boas Práticas de Fabricação para garantia de qualidade e segurança do produto ao consumidor.

6.3 Testes do desafio do sistema conservante e análises dos conservantes contidos nas amostras

A RDC n°29 de 2012, disponibiliza uma lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. De acordo com esse regulamento, apenas a amostra 6 apresentou uma substância que não está presente nessa lista, o *Methylchlorothiazolinone*. Os conservantes contidos nas outras amostras apresentaram-se de acordo com esse regulamento. É importante lembrar que cada sistema conservante deve estar nas concentrações permitidas para o uso em cosméticos, também disponíveis nessa resolução.

Pinto e colaboradores (2004) frisaram a importância do uso de conservantes dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA, pois esses produtos podem desenvolver toxicidade se utilizados de forma inadequada na fabricação. Indústrias buscam manter a carga microbiana dentro dos limites aceitáveis e assim podem, de alguma forma, utilizar substâncias não permitidas ou adicioná-las em concentrações excessivas, trazendo danos ao usuário do produto.

Por meio do Teste de Desafio do Sistema Conservante, as amostras analisadas obtiveram uma rápida resposta de inibição do crescimento microbiano, comprovando a efetividade dos conservantes presentes, zerando a carga microbiana a partir do sétimo dia da contaminação proposital. Pode-se levantar a possibilidade do uso em concentrações de conservantes maiores do que as permitidas, para que seja mantida ou eliminada a carga microbiana presente pelo fabricante.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a presença de microrganismos em produtos cosméticos acima da concentração máxima permitida pela legislação, por meio da RDC n°481 de 1999 que estabelece o limite de $5x10^3$ UFC/g ou mL para microrganismos mesófilos aeróbios totais. Também é definida a ausência de *Pseudomonas aeruginosa* em 1g ou mL de produto, devido à patogenicidade dessa bactéria, porém ela foi uma das possíveis bactérias encontradas nas amostras analisadas.

Por meio de vários estudos, pode-se notar a necessidade de vigilância rigorosa em indústrias de cosméticos, como também constatou-se a importância de que o fabricante siga cuidadosamente as Boas Práticas de Fabricação, visando um produto final eficaz e seguro ao consumidor. Devem ser realizados testes para o controle de qualidade microbiológico, visto que nas referências analisadas e também nesse presente trabalho foram encontradas contagens de microrganismos acima do permitido nas amostras.

Além das Boas Práticas de Fabricação, o consumidor deve ter conhecimento do uso correto dos produtos de higiene pessoal e cosméticos, pois o mau uso pode possibilitar a entrada de microrganismos e possíveis danos futuros com o uso de produtos contaminados. Uma boa opção para minimizar essa contaminação, para o produto analisado neste estudo, seria a presença de uma espátula adequada para retirada do produto da embalagem e também informações sobre a utilização correta, visto que nenhuma das embalagens dos cremes hidratantes analisados possuía esses fatores.

Existem duas vertentes de discussão, que é a possibilidade de contaminação devido a ineficácia dos conservantes e o produto apresentar alta eficácia pelo uso de conservanted inadequados ou acima das concentrações permitidas. Neste estudo quatro das seis amostras apresentaram boa eficácia no controle microbiológico. Devendo levar em consideração não apenas a qualidade microbiológica, mas também a qualidade dos sistemas conservantes que devem estar dentro das concentrações permitidas pela legislação. Essa concentração segura tem como objetivo a proteção ao usuários para que não ocorram reações adversas quanto ao uso de produtos com conservantes impróprios ou em concentrações que sejam potencialmente alergênicas ou tóxicas aos seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Manual de Microbiologia Clínica para Serviços de Saúde, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Módulo IV, Brasília, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA, 2004. 52p. (Séries Temáticas, v.1).

BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada nº 481 de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n° **211**, de 14 de Julho de 2005. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária Estabelece a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 jul. 2005.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n° 29, de 1 de Junho de 2012. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico Mercosul sobre "Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mai. 2012.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n° 48, de 25 de Outubro de 2013. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. **Diário** Oficial da União, Brasília, DF, 19 set. 2013.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n° 481, de 23 Setembro de 1999. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 set. 1999.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H.R.N. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 30(1): 19-30, 2009.

COLOMBERA, K. M.; Efeito de condicionadores comerciais nas propriedades mecânicas e nos processos de difusão de fibras capilares. 2004. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, São Paulo. 2004.

CURRY, J. C.; BRANNAN, D. K.; GEIS, P. A. History of cosmetic microbiology. In: GEIS, P. A. (Ed. 2). *Cosmetic Microbiology:* A Practial Approach. New York: Taylor & Francis group, 2006. p. 3-17.

CUSTODIO, J.; ALVES, J.F.; SILVA, F.M.; DOLINGER, E.J.O.V.; SANTOS, J.G.S.; BRITO, D.V.D. Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. **Revista Ciências Médica**, Campinas, 18(1): 7-11, 2009.

D'SOUZA, P.; RATHI, S. K.; Shampoo and Conditioners: What a Dermatologist Should Know? **Indian J Dermatol.** 60(3): 248-254, 2015.

DAL'PIZZOL, C.; PSCHEIDT, L. *História do penteado: uma revisão bibliográfica.* 2010. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Cosmetologia e Estética). Universidade do Vale do Itajaí, Balneário Camboriú, 2010.

DE OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONIB T. B.; BESSEGATO, G. G.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONIA, M. V. A Química e Toxicidade dos Corantes de Cabelo. **Quím. Nova**. 6, 1037-1046, 2014.

DE PAULA, C. M. S. S.; *Alterações na ultra-estrutura do cabelo induzidas por cuidados diários e seus efeitos nas propriedades de cor.* 2001. Tese de Doutorado (Instituto de Química – UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, 2001.

DE SOUZA, G. C.; *Relação entre a composição de condicionadores capilares e a formação de cristais líquidos.* 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Farmácia-Bioquímica). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, 2015.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

GOMYO, H.; OOKAWA, M.; OSHIBUCHI, K.; SUGAMURA, Y.; HOSOKAWA, M.; SHIONOIRI, N.; MAEDA, Y.; MATSUNAGA, T.; TANAKA, T. Evaluation of a Microbial Sensor as a Tool for Antimicrobial Activity Test of Cosmetic Preservatives. 2015. **Biocontrol Science.** 4, 247-253. 2015.

LERANOZ, S. Conservantes cosméticos. 2004. Dermofarmacia. 21(7), 74-78.

Medeiros ACD, Porto KL, Paiva AVR, Procópio JVV. Análise de contaminantes microbiológicos em produtos comercializados em farmácia de manipulação. **Rev Biol Farm.** 2007;1(1):1-12.

MOTTA, E. F. R. O.; Dossiê técnico: Fabricação de Produtos de Higiene Pessoal. REDETEC-Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2007.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N.; Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 47, n.4, 409-420. 2011.

OLIVEIRA, V. G.; *Cabelos: uma contextualização no ensino de Química.* Programa Institucional de Bolsas de Incentivo à Docência, subprojeto química. 2013.UNICAMP, São Paulo, 2013.

PINTO, T.J.A.; YAMAMOTO, C.H.; MEURER, V.M.; REZENDE, P. Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2, 2004, Belo Horizonte. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na zona da mata, MG. Anais. Belo Horizonte: UFJF, USP. p 1-7, 2004.

PITT, T. L.; MCCLURE, J.; PARKER, M. D.; AMEZQUITA, A.; MCCLURE, P. J. Bacillus cereus in personal care products: risk to consumers. **International Journal of Cosmetic Science**. 37, 165-174. 2015.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. Análise de Cabelo: Uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Quím. Nova**. 22(6), 1999.

REICH, C.; SU, D.; KOZUBAL, C.; LU, Z.; Hair Conditioners. In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACK, H. I. (Ed. 3). *Handbook of Cosmetic Science and Technolog.* New York: Informa Healthecare, p. 687-704, 2009.

ROSA, A. M.; CHANG, M. R.; SPOSITTO, F. L. E.; SILVA, C. G.; MIYAGUSKU, L.; SVERSUT, R. A.; AMARAL, M. S.; KASSAB, N. M. Análise microbiológica de xampus e cremes condicionadores para uso infantil. **Rev. Ciênc. Farm Básica Apl.** 36(1): 43-49. 2015.

RUSSELL, A. D.; Chalenge testing: principles and practice. Int. J. Cosmet. Sci. 25(3): 147-53. 2003.

SOARES, G. M.; DOS SANTOS, L. M.; ONOFRE, F. R.; SILVA, P. S.; FABIAO, C. D.; ROCHA, A. S. R. Microbiologic quality of hand creams in Pelotas, Brazil. 2015. Academic Journals. 9(18), 1275-1280. 2015.

SUENAGA, C.; LISBOA, D. C.; DA SILVA, M.S.; DE PAULA, V. B. *Conceito, beleza e contemporaneidade: fragmentos históricos no decorrer da evolução estética.* 2012. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Cosmetologia e Estética). Universidade do Vale do Itajaí, Unidade Ilha, Florianópolis, SC, 2012.

SUTTON, S. V. W. Antimicrobial preservative efficacy and microbial contente testing. In: GEIS, P. A. (Ed. 2). *Cosmetic Microbiology:* A Practial Approach. New York: Taylor & Francis group, 2006. p. 126-146.

UNITED STATES PHARMACOPEIA.USP 37 NF 32. 37ºed. 2014.

WAGNER, R. C. C.; *A estrutura da medula e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo.* 2006. Tese de Doutorado (Instituto de Química – UNICAMP), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

ZHANG, Y.; ALSOP, R. J.; SOOMRO, A.; YANG, F.C.; RHEINSTADTER, M. C.; Effect of shampoo, conditioner and permanente waving on the molecular structure of human hair. **PeerJ**. 3:e1296, 2015.