

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PAOLA BARBOSA SIRONI

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS SANEANTES  
DESTINADOS À LIMPEZA**

PORTO ALEGRE  
2009

PAOLA BARBOSA SIRONI

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS SANEANTES  
DESTINADOS À LIMPEZA**

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand

PORTO ALEGRE

2009

Nome: Paola Barbosa Sironi

Título: Avaliação Microbiológica de Produtos Saneantes Destinados à Limpeza

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Professor (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Professor (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand pela orientação neste trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade e por contribuir enormemente para minha formação.

Às professoras Marilise Brittes Rott e Marjo Cadó Bessa pela disponibilidade e contribuição como membros da banca examinadora deste trabalho.

Às colegas do Laboratório 164 de Microbiologia Ambiental pelo auxílio e pela amizade durante todo o tempo de convivência.

À empresa fabricante dos produtos saneantes pela parceria e por oportunizar a realização deste trabalho. Especialmente à Rita pela receptividade e atenção.

À minha família pelo apoio e incentivo. Especialmente aos meus pais por proverem as condições necessárias para meus estudos e pela valorização de minhas conquistas.

Ao Maurício pelo apoio incondicional e por vencer comigo mais esta etapa!

## RESUMO

São considerados saneantes todos os produtos utilizados na limpeza e conservação de ambientes como, por exemplo, detergentes, ceras, inseticidas, desinfetantes, amaciantes entre outros. Todos esses produtos devem ser registrados e as empresas autorizadas a produzi-los estão sujeitas à verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e Controle, conforme a Resolução RDC nº 184 de 22 de outubro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Dentro das Boas Práticas de Fabricação e Controle, a contaminação microbiana é um aspecto importante, pois pode comprometer a qualidade final do produto ou a segurança no seu uso, podendo trazer riscos de infecção para os consumidores. Avaliar a qualidade microbiológica dos saneantes é importante para verificar se os procedimentos de fabricação, estocagem e comercialização destes produtos estão adequados. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi realizar uma avaliação microbiológica de diferentes produtos de limpeza produzidos por uma empresa autorizada para esse fim visando à melhoria na qualidade final dos produtos e a segurança no uso dos mesmos. A metodologia empregada visou à quantificação dos microrganismos nos diferentes produtos de limpeza e a identificação, dentre os microrganismos encontrados, de patogênicos oportunistas. As amostras foram semeadas em diferentes meios de cultura seletivos e não seletivos e incubados a 37 °C por 24-48h. Dos produtos analisados, o amaciante de roupas e o detergente de louça foram os produtos mais propícios ao crescimento microbiano. Do total de amostras analisadas, 53,8% dos amaciantes e 62,5% dos detergentes apresentaram crescimento microbiano significativo. Na contagem do número de colônias de bactérias heterotróficas foi verificada populações variando de  $6,8 \times 10^4$  a  $8,9 \times 10^5$  UFC/mL no amaciante e  $2,2 \times 10^3$  a  $2,4 \times 10^5$  UFC/mL no detergente. Crescimento de fungos filamentosos e/ou leveduras foi verificado apenas no amaciante, com populações variando de  $4,9 \times 10^4$  a  $8,7 \times 10^5$  UFC/mL. Em termos quantitativos, a contaminação registrada em nosso estudo pode ser considerada alta. Entretanto, em termos qualitativos, não foi detectada a presença de microrganismos potencialmente patogênicos que pudessem trazer risco a saúde dos consumidores.

**Palavras-chave:** saneantes, contaminação microbiana, detergente, amaciante

## ABSTRACT

Sanitizing are considered as products used on general cleaning and on ambience upkeep, such as detergent, waxes, insecticide, disinfectant and fabric softener. This products must be registered and all authorized manufacturers are submitted to Good Manufacturing Pratices (GMP) according to resolution RDC #184 from october 22<sup>th</sup> 2001 of Sanitary Surveillance National Agency (ANVISA – Brazilian Health Ministry). Microbial contamination is an important issue considered on GMP as it could compromise the product final quality or usage safety, leading to infection risks for the consumers. Evaluation of sanitizing microbiological quality is important in order to verify if commerce, storage and fabrication procedures are adequated. Thereby, this work intends to perform microbiological evaluation of different sanitizing products manufactured by one company, aiming final quality and usage safety improvement. The applied methodology intent to quantify microorganisms in all tested sanitizing products and therefore check for opportunistic pathogenics among them. Samples were plated on different selective and non selective culture medium and incubated at 37°C during 24-48h. Fabric softener and dish detergent were the most propitious products for microbiological growth. Considering all analysed products 53,8% of the softeners and 62,5% of the detergents showed significant microbial growth. In relation to heterotrophic bacterias, population among  $6,8 \times 10^4$  to  $8,9 \times 10^5$  UFC/mL were checked in the softener and among  $2,2 \times 10^3$  to  $2,4 \times 10^5$  UFC/mL inside detergents. Filamentary fungi and yeast growth were observed only in the fabric softener. Population of such microorganisms vary from  $4,9 \times 10^4$  to  $8,7 \times 10^5$  UFC/mL. On quantitative standpoint this contamination found in this study can be considered high. Although, at qualitatively point of view none pathogenic microorganisms that could lead to risks for consumers health safety was found.

**Keywords:** Sanitizing, microbial contamination, detergent, fabric softener

**LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS**

<b>Quadro 1</b>	Principais componentes encontrados em saneantes domissanitários, suas funções e exemplos típicos	14
<b>Tabela 1</b>	Produtos analisados na primeira etapa do trabalho, período de abril – 2009	21
<b>Figura 1</b>	Produtos analisados na primeira etapa do trabalho: (A) amaciante de roupas, (B) detergente de louças, (C) lava-roupas líquido, (D) limpa-vidros, (E) água sanitária e (F) desinfetante de uso geral	22
<b>Tabela 2</b>	Formulação do meio de cultura Lethéen, utilizado na diluição dos produtos saneantes	22
<b>Figura 2</b>	Esquema das diluições seriadas realizadas para análise dos produtos saneantes	23
<b>Quadro 2</b>	Meios de cultura utilizados na primeira etapa do trabalho, período de abril – 2009	24
<b>Tabela 3</b>	Produtos analisados na segunda etapa do trabalho, período de maio – 2009	26
<b>Quadro 3</b>	Meios de cultura utilizados na segunda etapa do trabalho, período de maio – 2009	27
<b>Tabela 4</b>	Produtos analisados na terceira etapa do trabalho, período de julho – 2009	28
<b>Tabela 5</b>	Produtos analisados na quarta etapa do trabalho, período de julho – 2009	29
<b>Tabela 6</b>	Resultados obtidos na etapa inicial de análise de seis produtos saneantes produzidos pela empresa adquiridos no mercado, período de abril – 2009	30
<b>Tabela 7</b>	Resultados obtidos na segunda etapa de análise dos produtos saneantes: amaciante de roupas e detergente, período de maio – 2009	32
<b>Tabela 8</b>	Resultados obtidos na terceira etapa de análise dos produtos saneantes: amaciante de roupas e detergente contendo como conservante a isotiazolinona, período de julho – 2009	33
<b>Tabela 9</b>	Resultados obtidos na quarta etapa de análise de detergentes fabricados recentemente, período de julho – 2009	34

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	08
1.1 Objetivos .....	09
1.1.1 Objetivo geral.....	09
1.1.2 Objetivos específicos .....	09
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
2.1 Definições e legislação acerca de produtos saneantes .....	10
2.2 Histórico dos produtos saneantes .....	11
2.3 Principais componentes dos produtos saneantes .....	13
2.4 Contaminação microbiana: causas e conseqüências .....	16
2.5 Infecções decorrentes de produtos contaminados .....	18
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Etapa 1: Varredura da linha de produtos .....	21
3.1.1 Semeadura das amostras e isolamento bacterianos .....	23
3.1.2 Determinação do número mais provável de coliformes .....	25
3.2 Etapa 2: Análise do Amaciante e Detergente .....	26
3.3 Etapa 3: Análise de Amaciante e Detergente, com o mesmo conservante (isotiazolinona) .....	27
3.4 Etapa 4: Análise de Detergentes fabricação recente .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	30
4.1 Produtos analisados na etapa 1 .....	30
4.2 Produtos analisados na etapa 2 .....	31
4.3 Produtos analisados na etapa 3 .....	32
4.4 Produtos analisados na etapa 4 .....	33
<b>DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>CONCLUSÕES</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40



## INTRODUÇÃO

Este trabalho foi elaborado a partir da vontade de aproximar a Universidade da sociedade, tentando aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo da graduação no curso de Ciências Biológicas, em um contexto real e aplicado. Mais do que gerar dados e resultados, a intenção era que o Trabalho de Conclusão de Curso pudesse contribuir de alguma forma para melhorias no processo de produção e preparação dos produtos.

Este trabalho foi organizado em cinco partes. Na primeira, uma breve revisão bibliográfica abordando aspectos importantes acerca dos produtos saneantes como: definição, legislação, histórico e mercado atual, composição, contaminação microbiana e riscos de infecções associados a esses produtos. Na segunda parte, a descrição da metodologia utilizada nas diferentes etapas de análise desta pesquisa. Na terceira, uma apresentação dos resultados obtidos e a posterior discussão desses resultados na quarta parte. Finalmente, na última parte as conclusões e reflexões finais do tema deste trabalho.

O acesso facilitado e consentido à empresa de produtos saneantes foi o ponto de partida para pesquisa e estruturação deste projeto. A metodologia, embasada primeiramente na bibliografia, foi sendo adaptada a cada etapa da pesquisa. Os resultados obtidos em uma etapa determinavam os objetivos e a metodologia empregados nas etapas subseqüentes.

A empresa de saneantes que forneceu os produtos para esta pesquisa tem sede na cidade de Gramado, Rio Grande do Sul – Brasil. Fundada há mais de dez anos por iniciativa da proprietária, Engenheira química de formação, atualmente a empresa está presente em diversas cidades do Estado através de distribuidoras que comercializam seus produtos, principalmente para estabelecimentos prestadores de serviços como hotéis e restaurantes. Mais de dez produtos diferentes são produzidos pela empresa em apresentações variadas desde embalagens de 500mL até 5.000mL.

Microrganismos estão presentes nos mais diversos ambientes e produtos. A contaminação microbiana pode acarretar problemas como, por exemplo,

deterioração rápida dos compostos, ineficiência do produto, infecções aos usuários e por esse fato tem sido foco de estudo em diferentes ramos da indústria: alimentos, medicamentos, cosméticos e também produtos saneantes.

Avaliar a qualidade microbiológica dos saneantes é importante para verificar se os procedimentos de fabricação, estocagem e comercialização destes produtos estão adequados. Dependendo dos resultados desta avaliação, podemos inferir em que pontos do processo produtivo é necessário melhorar para minimizar os riscos de contaminação e garantir, com isso, um produto seguro e de qualidade para os consumidores.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a qualidade no que se refere ao controle microbiológico de diferentes produtos de limpeza produzidos por uma empresa específica visando à melhoria na qualidade final dos produtos e a segurança no uso dos mesmos.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Identificar, dentro da linha de produtos fabricados pela empresa, aqueles mais propícios ao crescimento de microrganismos, tornando-os foco da avaliação microbiológica.
- Verificar se existe diferença significativa no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nos produtos com maior ou menor tempo de prateleira disponíveis no mercado.
- Verificar se existe diferença significativa no número de UFC nos produtos com a troca do conservante formol por isotiazolinona.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Definições e legislação acerca de produtos saneantes

A Resolução RDC nº 184 de 22 de outubro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde define *Produtos Saneantes Domissanitários e afins*, como “todas as substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção, desinfestação, desodorização, odorização de ambientes domiciliares, coletivos e/ou públicos”. Todos esses produtos utilizados na limpeza e conservação de ambientes como, por exemplo, detergentes, ceras, inseticidas, desinfetantes, amaciantes, devem ser registrados levando-se em conta a avaliação e o gerenciamento do risco. Na avaliação do risco, são considerados parâmetros como: a toxicidade das substâncias do produto, a finalidade de uso, as condições de uso, a população provavelmente exposta etc.

Os fabricantes destes produtos devem seguir uma série de normas legais e técnicas e obter a autorização do Ministério da Saúde para comercializar os saneantes. Estas empresas estão sujeitas também à verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF e C), através de inspeções por autoridades sanitárias (BRASIL, 2001).

A ANVISA também estabelece as diretrizes para a implementação das BPF e C para Indústrias de Saneantes Domissanitários através da Portaria nº 327 de 30 de julho de 1997, visando garantir com isso a qualidade e a segurança no uso desses produtos. Os itens básicos apontados por esta portaria para as BPF e C são: materiais (matéria-prima e materiais de embalagem), processo e produto acabado. Dentro de cada item há a descrição das práticas e cuidados necessários.

Recentemente, a ANVISA revisou os conservantes permitidos para produtos saneantes na Resolução RDC nº 35 de 03 de junho de 2008. O conservante formaldeído, comumente utilizado nos produtos de limpeza foi banido das formulações devido sua reconhecida carcinogenicidade e atual classificação toxicológica pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). As empresas tiveram um prazo de 360 dias para se adequar e uma lista com as substâncias de

ação conservante permitidas e suas respectivas concentrações foi fornecida na mesma resolução. A empresa fornecedora dos produtos analisados neste trabalho modificou o conservante a partir de janeiro de 2009, substituindo o uso do formaldeído pelo conservante isotiazolinona.

Além de estabelecer as regras para fabricação e comercialização de produtos saneantes e fiscalizar as empresas produtoras, a ANVISA desenvolve campanhas alertando a população para os perigos dos produtos clandestinos. Uma destas iniciativas da ANVISA, em parceria com a Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza e Afins (ABIPLA) e outras entidades do setor industrial foi a confecção de uma cartilha intitulada *Orientações para os consumidores de Saneantes* (2003). Este material traz informações acerca dos riscos do uso de produtos clandestinos, como queimaduras, problemas respiratórios, irritações e graves intoxicações. Além disso, destaca aspectos importantes relacionados à compra, as informações obrigatórias nos rótulos, o acondicionamento adequado e os procedimentos em caso de intoxicação com produtos saneantes.

O uso inadequado de um produto saneante, seja ele clandestino ou não, pode causar casos de intoxicação. No ano de 2007 foram registrados 12.551 casos de intoxicação humana por agentes domissanitários, ficando atrás somente de casos de intoxicação por medicamentos, 34.068 no mesmo ano, conforme dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX) vinculado ao Ministério da Saúde. Esses dados reforçam a necessidade do trabalho regulador e fiscalizador dos órgãos do governo, a responsabilidade das empresas produtoras de saneantes e a necessidade de esclarecimento da população consumidora destes produtos.

## **2.2 Histórico dos produtos saneantes**

Segundo reportagem da revista *Cosméticos e Perfumes* (2001), as origens da higiene pessoal datam dos tempos pré-históricos. Escavações da antiga Babilônia demonstram que a fabricação de sabão ou algo bem parecido, já era conhecida em 2.800 a.C. Antigos egípcios e gregos banhavam-se freqüentemente. O médico grego Claudio Galeno (131-201) recomendava o sabão como agente terapêutico e de

limpeza. Após a queda do Império Romano, em 476, houve um declínio dos hábitos de banho principalmente na Europa, contribuindo juntamente com as condições de vida insalubres, para as grandes epidemias de pestes da Idade Média. Desde o início da Idade Média a fabricação de sabão era uma atividade bem estabelecida e os segredos de fabricação muito bem guardados. As gorduras animais e vegetais eram tratadas com cinzas de plantas e no conjunto adicionavam-se fragrâncias. Gradualmente começaram a aparecer variedades: sabão para barbear e lavar o cabelo, sabão para o banho e para lavar louça. Até boa parte do século XIX, o sabão era um artigo de luxo taxado pesadamente, e somente quando essas taxas foram suprimidas o produto tornou-se acessível a toda população.

O primeiro grande passo para produção em larga escala de sabão foi a descoberta em 1791 do processo de fabricação de carbonato de sódio ou barrilha, componente alcalino que se mistura as gorduras no preparo do sabão. Na metade do século XIX, a invenção do processo de amônia reduziu ainda mais os custos de produção da soda. No início do século XX, começaram a aparecer os sabões de toalete, os sabões em escamas e os produtos em pó. A produção de detergentes domésticos começou na Europa na década de 30, mas foi somente depois da Segunda Guerra Mundial que a indústria se desenvolveu (COSMÉTICOS E PERFUMES, 2001).

Por volta de 1916, surge o primeiro surfactante de síntese na Alemanha. Mais conhecidos hoje como tensoativos, os surfactantes, do inglês *surfactants* (*Surface Active Agents*) são componentes essenciais para limpeza que modificam as propriedades da água, diminuindo sua tensão superficial, facilitando assim o processo de lavagem. Em 1946 surge, nos Estados Unidos, o primeiro detergente reforçado, contendo um surfactante e um adjuvante destinado a lavagem de toda a roupa. Diversas pesquisas seguiram, desenvolvendo diferentes formas e apresentações dos produtos (COSMÉTICOS E PERFUMES, 2001).

O mercado de domissanitários se ampliou consideravelmente na América Latina, sobretudo no Brasil na década de 90 (CORRÊA, 2005). O setor de produtos de limpeza faturou, no ano de 2006, R\$10,13 bilhões, representando um crescimento de 6% em relação ao ano anterior. Em 2007 o setor fechou o ano com crescimento de mais de 7% em valor e 10% em volume de vendas. Crescimento

novamente acima do PIB brasileiro foi registrado em 2008, com faturamento de R\$11,4 bilhões (6,5% acima do registrado em 2007) e aumento de 8% em volume de produtos vendidos. Atualmente o mercado de produtos saneantes é bem estabelecido e tem penetração em quase 100% dos lares brasileiros (ABIPLA, 2009).

Conforme Pinto et al. (2003) uma tendência observada em vários ramos industriais nos últimos tempos, por exigência dos países importadores, da legislação e/ou dos consumidores, é a busca por certificações internacionais de qualidade como ISO (*International Organization for Standardization*) e a implementação de ações regulatórias que garantam confiabilidade no processo produtivo como as BPF e C, por exemplo. Dentro das BPF e C, a contaminação microbiana é um aspecto importante e tem sido foco de estudo em diferentes áreas: alimentos, fármacos, cosméticos e, mais recentemente, em produtos saneantes.

### **2.3 Principais componentes dos produtos saneantes**

Conforme Correia (2005), os agentes de limpeza são utilizados em grande quantidade ao redor do mundo, para tornar possível e facilitar a remoção de contaminantes de superfícies.

Hoje em dia, os produtos comerciais são compostos de diversos agentes químicos com diferentes funções, e alguns destes componentes podem ser conferidos no Quadro 1. Muitos destes agentes provocam fortes impactos ambientais e sérios danos à saúde. Por essas razões vem aumentando, principalmente em países europeus, a busca por produtos que empregam ingredientes “ecologicamente corretos”, sendo biodegradáveis e de toxicidade mínima aos organismos vivos (CORREIA, 2005).

**Quadro 1** – Principais componentes encontrados em saneantes domissanitários, suas funções e exemplos típicos

<b>COMPONENTES</b>	<b>PRINCIPAIS FUNÇÕES</b>	<b>EXEMPLOS TÍPICOS</b>
Abrasivos	Conferem uma ação de polimento e raspagem	Calcita, feldspato, quartzo, areia
Ácidos	Neutralizam os outros ingredientes ou ajustam sua alcalinidade	Ácido acético, cítrico, clorídrico, fosfórico, sulfúrico
Adjuvantes de produção	Conferem características importantes tais como fluidez, viscosidade, solubilidade, estabilidade correta e densidade uniforme	Argilas, polímeros Silicatos e sulfatos de sódio Solventes
Agentes antimicrobianos	Matam ou impedem a multiplicação de microrganismos patogênicos ou que provocam odores desagradáveis	Resina de pinho Amônios quaternários Hipoclorito de sódio Bactericidas
Agentes anti-redeposição	Impedem as sujeiras de redepositar-se uma vez removidas pela limpeza	Carboximetilcelulose, policarboxilato, polietilenoglicol, silicato de sódio
Agentes de branqueamento	Branqueiam, clareiam e removem manchas	Hipoclorito de sódio Perborato de sódio Percarbonato de sódio
Álcalis	Neutralizam os outros componentes ou ajustam sua acidez Aumentam a eficiência dos surfactantes e dos adjuvantes Aumentam a alcalinidade	Amoníaco Etanolamina Carbonato de sódio Soda cáustica Silicato de soda
Amaciantes	Propiciam suavidade as roupas e reduzem a eletricidade estática	Amônios quaternários
Branqueadores óticos	Fixam-se nos tecidos para criar um efeito de brancura ou de brilho suplementar quando estão a luz do dia	Compostos fluorescentes incolores
Corantes	Dão ao produto um aspecto particular	Pigmentos ou corantes

**Quadro 1** – Principais componentes encontrados em saneantes domissanitários, suas funções e exemplos típicos (continuação)

COMPONENTES	PRINCIPAIS FUNÇÕES	EXEMPLOS TÍPICOS
Conservantes	Protegem o produto dos efeitos naturais de envelhecimento tais como degradação, descoloração, oxidação e ataque pelos microrganismos	Seqüestrantes Antioxidantes Agentes antimicrobianos
Controladores de espuma (estabilizantes)	Mantém o nível de espuma elevado quando é bom indicador do poder de limpeza	Amidas de alquila Óxidos de amina
Controladores de espuma (supressores)	Mantém o poder espumante sob controle quando a espuma pode interferir na ação de limpeza	Fosfatos de alquila Silicones Sabões
Enzimas	Proteínas classificadas em função do tipo de sujeira que quebram em elementos mais simples que o detergente pode remover	Amilase Lipase Protease Celulase
Hidrotrópicos	Impedem a separação dos produtos líquidos em várias camadas, assegurando assim a homogeneidade do produto	-----
Inibidores de corrosão	Protegem as partes metálicas dos equipamentos, motivos decorativos nas porcelanas, utensílios metálicos etc	Silicatos de sódio
Opacificantes	Reduzem a transparência do produto Produzem efeitos luminosos especiais	Polímeros Óxido de titânio
Perfumes	Mascaram o odor original dos outros componentes e das embalagens; cobrem o cheiro das sujeiras; caracterizam o produto; deixam um odor final agradável na roupa e na casa	Misturas de substâncias odoríferas
Solventes	Impedem a deterioração ou a separação dos ingredientes nos produtos líquidos Dissolvem as sujeiras orgânicas Limpam sem deixar resíduos	Etanol Isopropanol Etilenoglicol

**Fonte:** Adaptado de COSMÉTICOS E PERFUMES (2001). A perfumaria funcional: sabão em pó, amaciante e detergente. **Cosméticos e perfumes**, São Paulo, nº11, mar/abr. p.25-26



## 2.4 Contaminação microbiana: causas e conseqüências

Segundo Block (1991), a degradação e deterioração dos materiais podem ser causadas por agentes físicos, químicos ou por microrganismos, merecendo este último grande destaque. Os microrganismos são onipresentes, encontrados em diversos locais da Terra, vivendo e se propagando nas mais variadas condições. Isso se deve a grande diversidade incluindo bactérias, fungos, algas e protozoários, e também a habilidade que esses seres vivos têm de se adaptar a uma gama de diferentes condições de sobrevivência. Sabendo disso, podemos esperar a presença de microrganismos em produtos não-estéreis como detergente de louça, amaciante de roupas, hidratantes, batons etc.

Conforme Pinto et al. (2003), os produtos submetidos à vigilância sanitária como medicamentos, fitoterápicos, insumos farmacêuticos, cosméticos, saneantes e outros, devem respeitar limites microbianos que garantam a segurança necessária para seu uso ou consumo. Dependendo do tipo de produto, o limite microbiano pode se constituir em ausência absoluta de formas viáveis (estéreis) ou em presença de grandezas definidas (não-estéreis). No caso de produtos não-estéreis, como os cosméticos, por exemplo, são definidos valores máximos de contaminantes aceitáveis, desde que não haja a presença de determinadas cepas microbianas. Dessa forma, é necessário comprovar a ausência de microrganismos patogênicos e determinar o número de microrganismos viáveis. O controle de produtos não estéreis visa assegurar que a carga microbiana (qualitativa e quantitativa) presente no produto não comprometa sua qualidade final e a segurança do usuário.

Os contaminantes microbianos presentes no produto final podem ser oriundos das matérias-primas, dos equipamentos e ambientes produtivos, dos operadores envolvidos e dos materiais de embalagem (PINTO et al., 2003).

Conforme Pinto et al. (2003), contaminantes, especialmente, bactérias Gram negativas podem se multiplicar em espaços mortos como juntas e válvulas onde ocorrem acúmulo de água e de produto ocasionando contaminação persistente e de difícil eliminação. Contaminantes ambientais de paredes secas compreendem principalmente bacilos Gram positivos, cocos e fungos. Em áreas úmidas da produção como pias e drenos, ocorrem acúmulos e proliferação de *Pseudomonas* e

*Acinetobacter*. Além disso, a própria água utilizada no processo pode ocasionar contaminações no produto. O ar também pode ser fonte de contaminações, através de partículas de poeira e escamas de pele que são veículos de esporos bacterianos e cocos.

A contaminação derivada dos operadores também é significativa, devido à grande perda de escamas da pele (na ordem de 10<sup>4</sup> por minuto) que transportam contaminantes da microbiota normal como *Staphylococcus aureus* e dependendo da higiene dos operadores *Salmonella* e *Escherichia coli*. Outro tipo de contaminação, difícil de prever, é a contaminação pós-fabricação, ocasionada durante o uso ou estocagem do produto (PINTO et al., 2003).

Além da introdução de microrganismos no produto durante a fabricação, estocagem ou uso, outros fatores estão envolvidos na sobrevivência e no crescimento dos microrganismos. Conforme Pinto et al. (2003), uma série de fatores físico-químicos são fundamentais para que ocorra a proliferação dos contaminantes: a faixa de pH do produto, a atividade de água, a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, a pressão osmótica e a tensão superficial dos produtos são alguns dos fatores que podem dificultar e até mesmo impedir o crescimento microbiano.

O processo de deterioração de um produto depende da capacidade do microrganismo produzir enzimas degradativas adequadas. Sabe-se da extrema versatilidade dos caminhos bioquímicos dos microrganismos e dependendo das características do produto e natureza das moléculas que o compõem, o processo degradativo pode levar horas, meses ou anos. Açúcares, aminoácidos e glicerol são degradados pelas rotas metabólicas primárias. Já a quebra de proteínas, polissacarídeos e lipídeos exigem enzimas específicas. Conservantes como, por exemplo, clorexidina, cetrimida, fenólicos e ácido benzóico também podem ser susceptíveis a degradação. Diversos adjuvantes que surgiram no mercado nos últimos 30 anos mostram-se excelentes substratos para o crescimento microbiano. Meios considerados anteriormente como não metabolizáveis, como a parafina líquida, apresentam microrganismos capazes de sobreviver. Até mesmo preparações de antissépticos para pele permitem a sobrevivência de microrganismos (PINTO et al., 2003).

Cargas microbianas elevadas podem também comprometer a estabilidade do produto. A atividade microbiana pode resultar na produção de toxinas, na degradação do sistema conservante, na redução da eficiência e potência do produto, na formação de pigmentos e odores etc. Mesmo a ausência de alterações sensoriais evidentes, não descarta a possibilidade da presença de microrganismos, de acordo com Pinto et al. (2003).

## **2.5 Infecções decorrentes de produtos contaminados**

Tradicionalmente, o controle microbiológico era associado à fabricação de produtos estéreis. Entretanto, a experiência mostrou que a contaminação microbiana pode acarretar problemas em uma série de produtos não-estéreis aumentando a necessidade de controle e monitoramento do processo de produção (PINTO, 2003).

Segundo Pinto et al. (2003), o risco de infecção com o uso de produtos contaminados depende de fatores como: aspectos quantitativos e qualitativos do microrganismo, resistência do hospedeiro e via de administração (no caso de medicamentos), para saneantes podemos considerar a área corporal de contato com o produto.

De acordo com Fassihi (1991), para determinar se um microrganismo contaminante é perigoso, ou seja, oferece risco, devemos considerar a natureza do produto e seu uso, o provável estado de saúde do usuário e informações clínicas sobre a frequência e severidade das infecções causadas pelo microrganismo em questão.

Fassihi (1991) cita que os contaminantes isolados de produtos farmacêuticos vão desde verdadeiros patógenos como *Clostridium tetani*, patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* a muitos outros microrganismos de vida livre. Dentre os microrganismos isolados de produtos farmacêuticos, citados por Pinto et al. (2003), os mais frequentes são patogênicos oportunistas como *Pseudomonas*, enterobacteriáceas e espécies de *Flavobacterium* e *Staphylococcus*. Menos frequentes são espécies que apresentam limitada possibilidade de sobrevivência fora do corpo como *Escherichia coli*, *Proteus* e algumas espécies de *Klebsiella*.

Sharpell e Manowitz (1991) destacam uma lista formidável de microrganismos identificados em cosméticos em diferentes estudos. Entretanto, apontam que sem dúvida, o grupo das Pseudomonadas é o mais freqüentemente identificado e o mais difícil de controlar. Os autores afirmam que provavelmente a maior responsável por problemas microbiológicos em cosméticos, tanto os de uso tópico como ocular, é a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Essa espécie é conhecida também como um contaminante notório de colírios e sérios problemas de infecções oftalmológicas e em alguns casos perda da visão já foram relatados (FASSIHI, 1991 apud BRUNCH 1972<sup>1</sup>, WILSON e AHEARN, 1977<sup>2</sup>).

Bugno et al. (2003), avaliaram 104 amostras de diferentes produtos saneantes, no Programa de Monitoramento de Saneantes Notificados – PROMOSAN, coordenado pela ANVISA. Do total de produtos analisados, 41% apresentaram crescimento microbiano sendo o amaciante de roupas e o detergente para lavar louças os produtos com maior proporção de amostras contaminadas. Esse estudo verificou a presença de bactérias Gram negativas não fermentadoras, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp e *Staphylococcus* spp coagulase (-).

De acordo com Pinto et al. (2003), colonização e infecção por *Pseudomonas aeruginosa* podem se originar de detergentes, desinfetantes e medicamentos tópicos contaminados.

Conforme Pinto et al. (2003) a literatura é conflitante no que diz respeito à quantidade de microrganismos necessários para induzir uma infecção e certamente isso depende de uma série de fatores, entre eles, a espécie microbiana em questão. A pele intacta representa uma barreira eficiente contra infecções, entretanto o risco aumenta para peles lesadas (FASSIHI, 1991). Em estudos com voluntários, preparações tópicas com inóculos de  $10^6$  foram necessários para a produção

---

<sup>1</sup> BRUNCH, C. 1972. *Objectionable microorganisms in nonsterile drugs and cosmetics*. Drug. Cosmet. Ind., 111 (4), 51-54, 150-156.

<sup>2</sup> WILSON, L. A.; AHEARN, D. G. 1977. *Pseudomonas-induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascaras*. Am. J. Ophthalmol., 84, 113-119.

de pus, mas apenas  $10^2$  foram suficientes quando a pele estava traumatizada (PINTO et al., 2003). Segundo Fassihi (1991) apud Ringertz and Ringertz (1982)<sup>1</sup>, é inofensivo o uso de preparações tópicas que apresentem um pequeno número de microrganismos (menos de  $100 \text{ g}^{-1}$ ) desde que patógenos estejam ausentes.

---

<sup>1</sup> RINGERTZ, O.; RINGERTZ, S.H. 1982. The clinical significance of microbial contamination in pharmaceutical products. In: *Advances in Pharmaceutical Sciences*. Vol 5. Editado por H. S. Bean; A. H. Beckett; J. E. Carless. Londres, Academic Press. p. 202-22

## MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada nas análises microbiológicas visou à quantificação dos microrganismos nos diferentes produtos de limpeza e a identificação, dentre os microrganismos encontrados, de patogênicos oportunistas. Para atingir os objetivos propostos no trabalho, quatro etapas de análises foram realizadas e a metodologia foi adaptada aos objetivos específicos de cada etapa.

### 3.1 Etapa 1: Varredura da linha de produtos

Os produtos analisados nesta primeira etapa podem ser observados na Tabela 1 e Figura 1. Os produtos foram adquiridos em mercados, obedecendo ao seguinte critério: o exemplar mais antigo na prateleira, que não estivesse vencido ou muito próximo ao vencimento.

**Tabela 1** - Produtos analisados na primeira etapa do trabalho, período de abril- 2009

Produto	Data de Fabricação	Validade	Composição Química <sup>1</sup>	pH padrão <sup>1</sup>
Água sanitária	Fev. 2009	6 meses	Veículo e hipoclorito de sódio	12,0 a 13,0
Amaciante de roupa	13. Fev. 2009	12 meses	Cloreto de dialquil imidazolina, essência, veículo e corante	7,5 a 8,5
Desinfetante	Fev. 2009	24 meses	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio, tensoativo não-iônico, fragrância, veículo, corante, solvente e quaternário de amônio	6,5 a 7,0
Detergente	13. Fev. 2008	24 meses	Veículo, trietanolamina, linear alquil benzeno sulfonato de sódio, conservante, lauril éter sulfato de sódio, sulfato de magnésio, neutralizante, corante e espessante	7,0 a 7,5
Lava-roupa líquido	06. Fev. 2009	24 meses	Veículo, base perolizante, lauril éter sulfato de sódio, dietanolamina de ácido graxo de coco, coco amido propil betaína, emoliente, espessante, fragrância, corante e formaldeído	8,5 a 9,5
Limpa-vidros	Out. 2007	24 meses	Veículo, trietanolamina, linear alquil benzeno sulfonato de sódio, tensoativo não-iônico, alcalinizante, hidróxido de amônio e corante.	9,5 a 10,5

<sup>1</sup> Informações baseadas na literatura técnica disponível no site da empresa.



**Figura 1** – Produtos analisados na primeira etapa do trabalho: (A) amaciante de roupas, (B) detergente de louças, (C) lava-roupas líquido, (D) limpa-vidros, (E) água sanitária e (F) desinfetante de uso geral

As amostras passaram por diluições seriadas em caldo Letheen, preparado conforme Höfling et al. (1988). A composição deste meio de cultura pode ser conferida na Tabela 2. A lecitina e *tween* 80 adicionados a este caldo atuam como neutralizantes de agentes químicos antimicrobianos tais como os compostos fenólicos e de amônio quaternário, presentes em produtos como desinfetantes, conforme Höfling et al. (1988). Este caldo é recomendado pela *Food and Drug Administration* (FDA) no *Bacteriological Analytical Manual* (1998) para análise de contaminação microbiana em produtos cosméticos, devido à presença de conservantes nestes produtos, que devem ser pelo menos parcialmente inativados durante o plaqueamento.

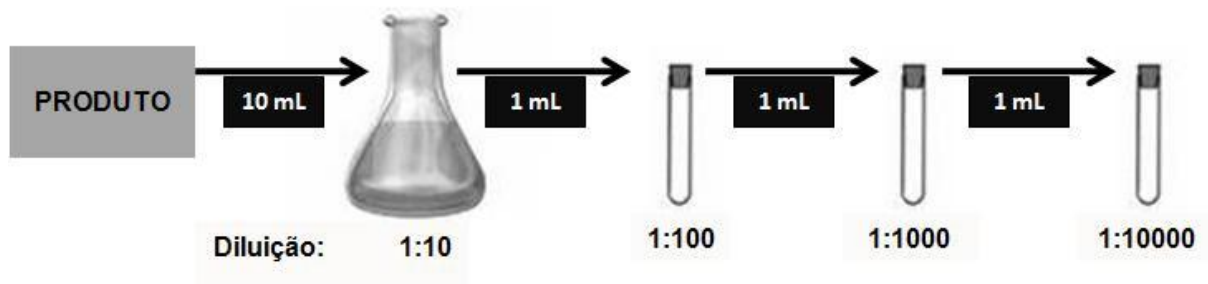
**Tabela 2** – Formulação do meio de cultura Letheen, utilizado na diluição dos produtos saneantes

Formulação do Caldo Letheen	
Extrato de carne	5,0g
Peptona	10,0g
NaCl	5,0g
Lecitina	0,7g
Tween 80	5,0g
Água destilada	1000mL

**Fonte:** HÖFLING J. F.; SANT'ANNA, M. F.; CORRÊA, I. Avaliação da ação neutralizadora do caldo Letheen, preparado com lecitina de soja não purificada, sobre os desinfetantes à base de formol e de amônio quaternário. *Caldo Letheen*, 2(1), p. 7 – 14, 1 sem. 1988.

### 3.1.1 Semeadura das amostras e isolamento bacterianos

A primeira diluição foi realizada com 10mL do produto saneante em 90mL do diluente (caldo Letheen), totalizando 100mL. As diluições subseqüentes, quando necessário, foram realizadas com 1mL da diluição anterior em 9mL de diluente, totalizando 10mL (Figura 2).



**Figura 2** – Esquema das diluições seriadas realizadas para análise dos produtos saneantes

As diluições foram semeadas conforme o método de semeadura em superfície utilizando a alça de Drigalski, em diferentes meios de cultura seletivos e não seletivos (Quadro 2). As placas foram incubadas a 37° por 24-48h e aquelas que não apresentavam crescimento em 48h eram incubadas até 120h. As semeaduras foram realizadas em triplicata.

Após o período de incubação, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas de contagem (PCA e ágar Sabouraud) e a análise do crescimento de colônias características nos demais meios de cultura. O número final de UFC/ mL foi obtido através da multiplicação do número de colônias na placa pelo índice de diluição da amostra, conforme Tortora et al. (2005).



**Quadro 2 – Meios de cultura utilizados na primeira etapa do trabalho, abril – 2009**

Meios de cultura	Finalidade	Colônias características
Ágar padrão de contagem (PCA) <sup>1</sup>	Ágar padrão utilizado para contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios	----
Ágar Sabouraud <sup>2</sup>	Meio com nutrientes e pH mais baixo (5,6) que favorece o crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos.	Caracterização macroscópica para fungos filamentosos (colônia gigante)
Ágar Leethen	Mesma formulação do caldo Lethen, com a adição de 1,5% de ágar	----
Ágar Sangue <sup>2</sup>	Meio de base rica que favorece o crescimento da maioria dos microrganismos. A presença de halos de hemólise ao redor das colônias facilita a identificação e diferenciação de espécies de <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> spp.	Ausência de halo (sem hemólise) exemplo: <i>Enterococcus faecalis</i> Presença de halo transparente (lise total dos eritrócitos) exemplo: <i>Streptococcus pyogenes</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> Presença de halo esverdeado (lise parcial dos eritrócitos) exemplo: <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Ágar Mac Conkey <sup>3</sup>	Meio seletivo para o isolamento de salmonelas e bactérias coliformes. Os sais biliares e cristal violeta inibem o crescimento de Gram positivas. Permite também verificar a degradação da lactose presente no meio, evidenciada pela presença de um indicador de pH.	Colônia vermelha a púrpura, com halo de precipitação de bile (lactose + como <i>Escherichia coli</i> , por exemplo)
Ágar Cetrimida <sup>3</sup>	Meio seletivo contendo brometo de sal de amônio quaternário de cetiltrimetilamonio (cetrimida) com notável inibição sobre microrganismos distintos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Colônias esverdeadas devido a produção do pigmento verde piocianina, com aspecto fluorescente ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )

<sup>1</sup> **Fonte:** JACKSON, G.J.; MERKER, R. I.; BANDLER, R. (Coord.) *Bacteriological Analytical Manual*, 8. ed., Revisão A, 1998.

<sup>2</sup> **Fonte:** Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos – Módulo IV. In: BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

<sup>3</sup> **Fonte:** PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2003.

### 3.1.2 Determinação do número mais provável de coliformes

Nesta primeira etapa, realizou-se também a determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais pela técnica de tubos múltiplos, adaptada do Manual Prático de Análise de Água (BRASIL, 2006).

Para a determinação dos coliformes totais é realizado primeiro o Teste Presuntivo e se necessário, o Teste Confirmativo. No Teste Presuntivo, a primeira diluição de cada produto (1:10) foi inoculada em 15 tubos de ensaio distribuídos de 5 em 5, sendo:

- 5 tubos contendo 10mL de caldo lactosado de concentração dupla onde se inoculou 10mL do produto;
- 5 tubos contendo 10mL de caldo lactosado de concentração simples onde se inoculou 1mL do produto;
- 5 tubos contendo 10mL de caldo lactosado de concentração simples onde se inoculou 0,1mL do produto.

Os tubos foram incubados em banho a 35°C durante 24-48h. O teste presuntivo é positivo quando ocorre crescimento e a formação de gás dentro do tubo de Durham e neste caso, faz-se o Teste Confirmativo. Caso não ocorra a formação de gás, a análise termina nesta fase sendo o resultado final negativo.

O teste confirmativo consiste na inoculação com a alça de platina de amostras dos tubos positivos da primeira etapa em tubos contendo meio de cultura verde brilhante bile a 2%. Estes são então incubados durante 24-48h a 35°C. O teste é considerado positivo para coliformes totais quando houver crescimento microbiano e formação de gás no tubo de Durham.

Para a análise de coliformes fecais (termotolerantes), as amostras positivas no Teste Presuntivo são inoculadas com a alça de platina em tubos de caldo EC (caldo *Escherichia coli*). Estes são incubados a 44,5°C durante 24h. Se houver crescimento e formação de gás, indica a presença de coliformes termotolerantes de origem fecal.

Os resultados são expressos em N.M.P (Número Mais Provável) / 100mL de amostra, verificando-se a combinação de tubos positivos e consultando as tabelas disponíveis no Manual (BRASIL, 2006).

### 3.2 Etapa 2: Análise do Amaciante e Detergente

Nesta segunda etapa, os produtos que apresentaram maior crescimento na etapa anterior foram foco da análise microbiológica (Tabela 3). Foram analisados três exemplares mais antigos, comprados diretamente no mercado e três exemplares de fabricação recente obtidos diretamente na empresa.

**Tabela 3** – Produtos analisados na segunda etapa do trabalho, período de maio – 2009

Produto	Data de Fabricação	Validade (a partir da data de fabricação)	Obtenção do produto
Amaciante de roupas	11. Dez. 2008	12 meses	Mercado
Amaciante de roupas	11. Dez. 2008	12 meses	Mercado
Amaciante de roupas	11. Dez. 2008	12 meses	Mercado
Amaciante de roupas	14. Abr. 2009	12 meses	Empresa
Amaciante de roupas	14. Abr. 2009	12 meses	Empresa
Amaciante de roupas	14. Abr. 2009	12 meses	Empresa
Detergente	Ago. 2007	24 meses	Mercado
Detergente	Ago. 2007	24 meses	Mercado
Detergente	Ago. 2007	24 meses	Mercado
Detergente	23. Abr. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	23. Abr. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	23. Abr. 2009	24 meses	Empresa

As amostras foram diluídas em caldo Lethen e semeadas em superfície nos meios de cultura descritos no Quadro 3. As semeaduras foram realizadas em triplicata, incubadas a 37°C por 24-48h.

Após o período de incubação, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas de contagem (PCA e agar Sabouraud) e a análise do crescimento de colônias características nos outros meios de cultura conforme descrito no item 3.1.1.

**Quadro 3 – Meios de cultura utilizados na segunda etapa do trabalho, maio – 2009**

Meios de cultura	Finalidade	Colônia característica
Ágar padrão de contagem (PCA) <sup>1</sup>	Ágar padrão utilizado para contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios	----
Ágar Sabouraud <sup>2</sup>	Meio com nutrientes e pH mais baixo (5,6) que favorece o crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos.	Caracterização macroscópica para fungos filamentosos (colônia gigante)
Ágar tripticaseína de soja (TSA) <sup>1</sup>	Meio nutritivo para uma grande variedade de microrganismos.	----
Ágar eosina-azul de metileno (EMB) <sup>3</sup>	Usualmente empregado na identificação de <i>E. coli</i> . Meio rico em corantes que inibem o crescimento de Gram positivas.	Colônias vermelho escuras, com brilho metálico esverdeado ( <i>E. coli</i> )

<sup>1</sup> **Fonte:** JACKSON, G.J.; MERKER, R. I.; BANDLER, R. (Coord.) *Bacteriological Analytical Manual*, 8. ed., Revisão A, 1998.

<sup>2</sup> **Fonte:** Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos – Módulo IV. In: BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

<sup>3</sup> **Fonte:** PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2003.

### 3.3 Etapa 3: Análise de Amaciante e Detergente, com o mesmo conservante (isotiazolinona)

Na terceira etapa do trabalho, o amaciante e o detergente foram novamente os produtos investigados, comparando-se os produtos de fabricação mais antiga com os de fabricação mais recente (Tabela 4). Entretanto nesta etapa, todos os exemplares foram fabricados a partir de janeiro de 2009 e continuam em sua composição o mesmo conservante, a isotiazolinona.

Não foram encontrados no comércio, detergentes fabricados entre janeiro e abril de 2009. Os amaciantes fabricados em janeiro de 2009, foram obtidos no mercado e os demais produtos foram fornecidos diretamente pela empresa.

Nesta terceira etapa os produtos foram diluídos em caldo Letheen e semeados pelo método de superfície nos meios de contagem: PCA e Sabouraud

(em triplicata). Após 24-48h de incubação à 37°C, foi realizada a contagem das UFC e o cálculo para obtenção do número de UFC / mL.

**Tabela 4** – Produtos analisados na terceira etapa do trabalho, período de julho – 2009

<b>Produto</b>	<b>Data de Fabricação</b>	<b>Validade (a partir da data de fabricação)</b>	<b>Obtenção do produto</b>
Amaciante de roupas	13. Jan. 2009	12 meses	Mercado
Amaciante de roupas	13. Jan. 2009	12 meses	Mercado
Amaciante de roupas	13. Jan. 2009	12 meses	Mercado
Amaciante de roupas	14. Abr. 2009	12 meses	Empresa
Amaciante de roupas	14. Abr. 2009	12 meses	Empresa
Amaciante de roupas	14. Abr. 2009	12 meses	Empresa
Amaciante de roupas	22. Jun. 2009	12 meses	Empresa
Amaciante de roupas	22. Jun. 2009	12 meses	Empresa
Amaciante de roupas	22. Jun. 2009	12 meses	Empresa
Detergente	23. Abr. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	23. Abr. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	23. Abr. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	06. Jul. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	06. Jul. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	06. Jul. 2009	24 meses	Empresa

#### **3.4 Etapa 4: Análise de Detergentes de fabricação recente**

Os produtos analisados nesta quarta etapa podem ser conferidos na Tabela 5. Todos os exemplares foram obtidos diretamente na empresa.

**Tabela 5** – Produtos analisados na quarta etapa do trabalho, período de julho – 2009

<b>Produto</b>	<b>Data de Fabricação</b>	<b>Validade (a partir da data de fabricação)</b>	<b>Obtenção do produto</b>
Detergente	07. Jul. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	07. Jul. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	07. Jul. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	Pós 07. Jul. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	Pós 07. Jul. 2009	24 meses	Empresa
Detergente	Pós 07. Jul. 2009	24 meses	Empresa

Os produtos foram diluídos em caldo Lethen e semeados em superfície no meio de contagem PCA (em triplicata). Após incubação à 37°C por 24-48h realizou-se a contagem e o cálculo para obtenção do número de UFC / mL.

## RESULTADOS

### 4.1 Produtos analisados na etapa 1

Os resultados obtidos na análise inicial de seis produtos de limpeza podem ser conferidos na Tabela 6. O teste de coliformes totais e fecais foi negativo para todos os produtos logo na etapa inicial (teste presuntivo).

**Tabela 6** – Resultados obtidos na etapa inicial de análise de seis produtos saneantes produzidos pela empresa adquiridos no mercado, período de abril – 2009

Sigla	Produto	Coliformes totais e fecais	Crescimento bacteriano – UFC/mL (PCA)	Crescimento de fungos e leveduras – UFC/mL (Sabouraud)	Crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos (Cetrimide, Mac Conkey e Ágar Sangue)
AS1	Água sanitária	Negativo	NS <sup>1</sup>	NS	Negativo
AM1	Amaciante de roupas	Negativo	8,9 x 10 <sup>5</sup>	8,7 x 10 <sup>5</sup>	Negativo
DS1	Desinfetante	Negativo	NS	NS	Negativo
DET1	Detergente	Negativo	1,5 x 10 <sup>4</sup>	NS	Negativo
LR1	Lava-roupas líquido	Negativo	NS	NS	Negativo
LV1	Limpa-vidros	Negativo	NS	NS	Negativo

<sup>1</sup> NS = Não significativo, crescimento inferior a 30 unidades formadoras de colônia (UFC).

O lava-roupas líquido, o desinfetante, a água sanitária e o limpa-vidros não apresentaram crescimento significativo em nenhum meio de cultura de contagem (PCA e ágar Sabouraud) após 120h de incubação. Também não houve crescimento

de colônias características nos meios de cultura seletivos, que pudessem indicar a presença de algum microrganismo potencialmente patogênico nestes produtos.

O detergente apresentou crescimento significativo no meio PCA de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL e presença de crescimento visível após 48h nos meios Mac Conkey e Cetrimide. Entretanto, em nenhum destes meios foi detectada a presença de microrganismos potencialmente patogênicos.

O amaciante de roupas foi o produto com maior crescimento microbiano,  $8,9 \times 10^5$  UFC/mL no meio PCA, aparecendo colônias nos diferentes meios de cultura. Apesar do maior crescimento, visível já em 24h, a presença de colônias características, que pudessem indicar a presença de patógenos potenciais neste produto não foi detectada. Foi constatada a presença de microrganismos Gram-negativos não fermentadores de lactose no amaciante e no detergente.

## 4.2 Produtos analisados na etapa 2

Os resultados da segunda etapa de análise podem ser conferidos na Tabela 7. Registrou-se crescimento não significativo em ágar de contagem e ausência de crescimento em Sabouraud para todas as amostras de detergente (recentes e antigas). Houve crescimento em meio TSA e pouco crescimento em EMB. Nas placas de EMB não foi detectada a presença de colônias características de *Escherichia coli*.

As amostras de amaciante de roupas fabricadas em abril de 2009 não apresentaram crescimento significativo em nenhum dos meios de cultura. Já os produtos fabricados em dezembro de 2008 apresentaram crescimento em todos os meios. Foram  $6,8 \times 10^4$  UFC/mL em PCA e  $4,9 \times 10^4$  UFC/mL em ágar Sabouraud.



**Tabela 7** – Resultados obtidos na segunda etapa de análise dos produtos saneantes: amaciante de roupas e detergente, período de maio – 2009

Sigla	Produto	pH	Obtenção do produto	Data de Fabricação	Crescimento bacteriano – UFC/mL (PCA)	Crescimento de fungos e leveduras – UFC/mL (Sabouraud)	Crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos (EMB)
AM2	Amaciante	7,55					
AM3	Amaciante	7,60	Mercado	11. Dez. 2008	$6,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	Negativo
AM4	Amaciante	7,38					
AM5	Amaciante	7,71					
AM6	Amaciante	7,66	Empresa	14. Abr. 2009	NS <sup>1</sup>	NS	Negativo
AM7	Amaciante	7,72					
DET2	Detergente	5,28					
DET3	Detergente	5,18	Mercado	Ago. 2007	NS	NS	Negativo
DET4	Detergente	5,16					
DET5	Detergente	6,47					
DET6	Detergente	6,87	Empresa	23. Abr. 2009	NS	NS	Negativo
DET7	Detergente	6,86					

<sup>1</sup>NS = Não significativo, crescimento inferior a 30 unidades formadoras de colônia (UFC).

### 4.3 Produtos analisados na etapa 3

Na terceira etapa do trabalho houve novamente um crescimento não significativo em ágar de contagem e ágar Sabouraud para todas as amostras de amaciante fabricadas em abril e junho de 2009. Já os exemplares fabricados em janeiro de 2009 apresentaram crescimento microbiano:  $9,7 \times 10^4$  UFC/mL em PCA e  $1,2 \times 10^5$  UFC/mL em ágar Sabouraud.

As amostras de detergentes fabricadas em abril de 2009 não apresentaram crescimento significativo em nenhum dos meios de cultura. Já os produtos de fabricação mais recente, de 06 de julho de 2009 apresentaram crescimento de  $3,4 \times 10^3$  UFC/mL apenas em ágar de contagem. Os resultados desta terceira etapa podem ser conferidos na Tabela 8.

**Tabela 8** – Resultados obtidos na terceira etapa de análise dos produtos saneantes: amaciante de roupas e detergente contendo como conservante a isotiazolinona, período de julho – 2009

Sigla	Produto	pH	Obtenção do produto	Data de Fabricação	Crescimento bacteriano – UFC/mL (PCA)	Crescimento de fungos e leveduras – UFC/mL (Sabouraud)
AM8	Amaciante	7,20				
AM9	Amaciante	7,16	Mercado	13. Jan. 2009	$9,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
AM10	Amaciante	7,30				
AM5	Amaciante	7,71				
AM6	Amaciante	7,66	Empresa	14. Abr. 2009	NS <sup>1</sup>	NS
AM7	Amaciante	7,72				
AM11	Amaciante	7,40				
AM12	Amaciante	7,51	Empresa	22. Jun. 2009	NS	NS
AM13	Amaciante	7,51				
DET5	Detergente	6,74				
DET6	Detergente	6,87	Empresa	23. Abr. 2009	NS	NS
DET7	Detergente	6,86				
DET8	Detergente	7,03				
DET9	Detergente	7,10	Empresa	06. Jul. 2009	$3,4 \times 10^3$	NS
DET10	Detergente	7,10				

<sup>1</sup>NS = Não significativo, crescimento inferior a 30 unidades formadoras de colônia (UFC).

#### 4.4 Produtos analisados na etapa 4

Na quarta e última etapa de análise, os detergentes fabricados em 07 de julho de 2009 apresentaram novamente um crescimento de  $2,2 \times 10^3$  UFC/mL em ágar de contagem. Os produtos fabricados após o dia 07 de julho de 2009 apresentaram um crescimento ainda maior atingindo  $2,4 \times 10^5$  UFC/mL. Os resultados desta etapa são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Resultados obtidos na quarta etapa de análise de detergentes fabricados recentemente, período de julho – 2009

<b>Sigla</b>	<b>Produto</b>	<b>pH</b>	<b>Obtenção do produto</b>	<b>Data de Fabricação</b>	<b>Crescimento bacteriano – UFC/mL (PCA)</b>
DET11	Detergente	6,71		07. Jul. 2009	
DET12	Detergente	6,69	Empresa	07. Jul. 2009	$2,2 \times 10^3$
DET13	Detergente	6,72		07. Jul. 2009	
DET14	Detergente	7,21		Pós 07. Jul. 2009	
DET15	Detergente	7,22	Empresa	Pós 07. Jul. 2009	$2,4 \times 10^5$
DET16	Detergente	7,22		Pós 07. Jul. 2009	

## DISCUSSÃO

A análise inicial realizada em seis produtos produzidos pela empresa apontou o detergente de louça e o amaciante de roupas como os produtos mais propícios ao crescimento microbiano. Apesar da presença de conservantes nestes produtos, a composição orgânica dos mesmos permite a sobrevivência e o desenvolvimento de alguns microrganismos. Conforme Pinto et al. (2003) alguns conservantes e diversos adjuvantes presentes em produtos são excelentes substratos para o crescimento microbiano e até meios considerados não-metabolizáveis anteriormente apresentam microrganismos capazes de sobreviver.

Bugno et al. (2003) realizaram estudo com produtos saneantes comercializados em São Paulo, e das amostras que apresentaram microrganismos contaminantes, o amaciante de roupas e o detergente de louças foram os produtos com maior proporção de amostras contaminadas, 40% e 30% respectivamente.

Neste presente estudo, foram analisados no total, 13 exemplares de amaciante de roupas. Destes, 7 apresentaram crescimento microbiano (bactérias heterotróficas, fungos filamentosos e leveduras) representando 53,8%. A data de fabricação variou de dezembro de 2008 a junho de 2009 e o pH apresentou pouca variação, entre 7,16 à 7,72. Todos os exemplares que apresentaram crescimento de microrganismos foram obtidos no mercado. Nenhum dos exemplares obtidos diretamente na empresa apresentou crescimento significativo. Este resultado pode evidenciar uma contaminação pós-fabricação. O transporte, o armazenamento e a manipulação inadequada podem contribuir para a contaminação dos produtos. Além disso, uma prática muito comum nos supermercados e mercados é a abertura dos recipientes pelo consumidor para conferir o cheiro e aparência do produto. Essa prática, favorecida pela ausência de lacre nas embalagens de amaciantes de roupas, por exemplo, pode estar relacionada à contaminação encontrada nos exemplares oriundos do comércio, representando uma provável contaminação cruzada e, portanto não na linha de produção do produto.

Foram analisados 16 exemplares de detergente de louça e destes, 10 apresentaram crescimento microbiano (bactérias heterotróficas), representando

62,5%. A fabricação dos detergentes variou de agosto de 2007 a julho de 2009. Tanto os exemplares obtidos no comércio, como os exemplares retirados diretamente na empresa apresentaram crescimento microbiano. Destaca-se na análise deste produto, a grande variação nos valores de pH registrados: de 5,16 a 7,22, indicando uma maior instabilidade do detergente em comparação ao amaciante de roupas. Possivelmente, a contaminação registrada provém do processo de fabricação do produto, de fontes diretas como: matéria prima, água, recipientes de armazenamento; ou indiretas: manipulação e equipamentos. Este produto se mostrou mais instável quanto as suas propriedades e esse fator pode favorecer a contaminação, ou ser resultado dela.

Não existe legislação que estabeleça a qualidade microbiológica dos produtos saneantes destinados à limpeza, determinando a carga microbiana máxima permitida nestes produtos. A Resolução nº 481 de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde estabelece os parâmetros de Controle Microbiológico para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. De acordo com essa resolução, o limite máximo de microrganismos mesófilos totais aeróbios nos produtos cosméticos é de  $5 \times 10^3$  UFC/g ou mL. Os limites são ainda mais rígidos para os produtos infantis ou cosméticos que entram em contato com mucosas:  $5 \times 10^2$  UFC/g ou mL.

Apesar dos saneantes analisados não se destinarem a higiene pessoal, estes parâmetros podem servir como base para comparação. Dos produtos analisados neste estudo, que apresentaram crescimento microbiano, a maioria apresentou valores acima de  $5 \times 10^3$  UFC/g ou mL, chegando à contagem de bactérias heterotróficas de  $8,9 \times 10^5$  UFC/mL, por exemplo. Bugno et al. (2003), em estudo com saneantes verificaram na maior parte das amostras analisadas populações microbianas superiores a este valor, registrando crescimento de até  $1,9 \times 10^6$  UFC/g ou mL no caso de bactérias heterotróficas e  $1,5 \times 10^5$  UFC/g ou mL no caso de fungos. Os autores ainda registraram em suas análises a presença de coliformes em 5% das amostras que apresentaram contaminação. As populações de coliformes variaram de  $3 \times 10^0$  a  $2,1 \times 10^5$  NMP/g ou mL, sendo a maioria registrada nos detergentes destinados a lavar louças. Em duas amostras de detergente, o estudo registrou também a presença de coliformes fecais. Os isolados dos amaciantes de

roupas foram em sua maioria bactérias Gram negativas não fermentadoras e também *Enterobacter* spp. Já nos detergentes, além de bactérias Gram negativas não fermentadoras e *Enterobacter* spp, registraram a presença de *Klebsiella* spp e *Pseudomonas* spp.

A ausência de coliformes totais e fecais, e aparente ausência de microrganismos potencialmente patogênicos em nosso estudo, podem indicar que a empresa que fabricou os produtos analisados possui boas práticas de fabricação. Em visita a empresa, pode ser observado aspectos que apontam estes cuidados no processo de produção: os funcionários trabalham de uniforme, luvas e touca, o local é organizado, limpo e bem estruturado. As matérias primas estão acondicionadas adequadamente e a água utilizada na produção é tratada. Os produtos são armazenados em local adequado até o transporte para o comércio.

Em termos quantitativos, a contaminação registrada em nosso estudo pode ser considerada bastante alta. Entretanto, em termos qualitativos, não foi detectada a presença de microrganismos potencialmente patogênicos que pudessem trazer risco a saúde dos consumidores. As colônias observadas nas placas sempre apresentaram pouca variação morfológica sugerindo uma pequena diversidade microbiana nos saneantes.

Conforme Pinto et al. (2003), cargas microbianas elevadas podem comprometer a estabilidade do produto, reduzir sua eficiência, alterar sua aparência etc. Sendo assim, não podemos descartar a possibilidade de alteração em alguma propriedade do produto, levando a diminuição da sua eficiência, por exemplo, devido aos altos valores de contagem registrados em alguns exemplares, o que se poderia inferir ao detergente já que este apresentou variações consideráveis em seu pH.

Certamente, alguns aspectos podem ser melhorados, principalmente no processo de produção do detergente visando diminuir a carga microbiana e aumentar a estabilidade do produto. Para os amaciantes, seria interessante a utilização de embalagens vedadas que dificultem a contaminação pós-fabricação, além da conscientização dos consumidores para não abrir os produtos no mercado.

Simplificando, podemos considerar que o processo de degradação de qualquer composto orgânico é uma questão de tempo. Conhecemos o importante papel ecológico desempenhado pelos microrganismos na ciclagem dos nutrientes e

a deterioração é parte fundamental para continuidade da vida no planeta. Produtos industrializados como alimentos, detergentes, amaciantes, cosméticos, pomadas, papéis, tecidos, entre tantos outros, são compostos de moléculas orgânicas de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Dessa forma, é de se esperar que esses produtos também sejam alvos de deterioração servindo como substrato para o desenvolvimento de outros seres vivos.

O grande desafio para a indústria é retardar o processo de degradação de seus produtos seja por fatores químicos, físicos ou microbiológicos, justificando com isso o uso, muitas vezes até excessivo, de compostos estabilizantes, conservantes, biocidas etc. Além do uso destes compostos, medidas de controle e monitoramento ao longo de toda a cadeia produtiva são fundamentais para diminuir as fontes diretas e indiretas de contaminação, garantindo os níveis adequados de qualidade microbiana dos produtos.

## CONCLUSÕES

A ausência de bactérias nos produtos saneantes analisados neste trabalho não era um resultado esperado, uma vez que é sabido que produtos de limpeza não são estéreis. Além disso, a degradação desses compostos é importante considerando que resíduos de amaciante, detergente, desinfetante escoam diariamente pelos ralos chegando às estações de tratamento de esgoto ou diretamente aos rios.

Encontrar bactérias ou fungos num produto pode indicar que as matérias-primas utilizadas, os procedimentos adotados na fabricação e/ou a manipulação foram inadequados. Mas podemos considerar isso um problema, a partir do momento que esta contaminação altera as propriedades do produto fazendo com que ele não desempenhe mais sua função, por exemplo, ou ofereça risco à saúde dos consumidores. E neste caso, dados como a quantidade e, sobretudo a qualidade dos microrganismos encontrados no produto são fundamentais.

Neste trabalho, a aparente ausência de microrganismos potencialmente patogênicos nos produtos analisados é um indicativo de qualidade no processo de produção da empresa. Os resultados quantitativos obtidos neste estudo podem servir para direcionar algumas melhorias na produção, principalmente do detergente de louça, visando aumentar sua estabilidade e garantir sua eficiência.

Estudos de contaminação microbiana são importantes, pois nem sempre conseguimos perceber uma contaminação, que pode não se manifestar de forma aparente. Além disso, os órgãos fiscalizadores do nosso país não conseguem atender toda a demanda do território nacional, deixando nas mãos das empresas, a responsabilidade pela segurança dos consumidores. Levando em conta esses aspectos, a Universidade através de suas pesquisas tem um papel fundamental, podendo contribuir com a sociedade. Estudos como este, foram e são fontes de conhecimentos importantes que podem elucidar, esclarecer, informar, estabelecer padrões e procedimentos adequados facilitando o trabalho das empresas, embasando a legislação e, sobretudo, garantindo a segurança de todos nós, consumidores.



## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS DE LIMPEZA E AFINS (ABIPILA). Disponível em: <<http://www.abipla.org.br/>> Acesso em: 10 nov. 2009

BLOCK, S. S. Preservatives for Industrial and Miscellaneous Products. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. Cap. 52, p. 901-947.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 2. ed. rev. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006. 146p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Orientações para os consumidores de Saneantes**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.327, de 30 de julho de 1997. **Determina a todos os estabelecimentos produtores de Saneantes Domissanitários, o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelos Regulamentos Técnicos – Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPC e C)**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=294&word=#>> Acesso em: 02 mar. 2009

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.481, de 23 de setembro de 1999. **Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme anexo desta resolução**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=259&word>> Acesso em: 29 set. 2009

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.184, de 22 de outubro de 2001. **Procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários e outros de natureza e finalidade idênticas**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2001/184\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2001/184_01rdc.htm)> Acesso em: 02 mar. 2009

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.35, de 03 de junho de 2008. **Dispõe sobre conservantes permitidos para produtos saneantes.** Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=31270&word>> Acesso em: 10 nov. 2009

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX).** Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/tab03\\_brasil\\_2007.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab03_brasil_2007.pdf)> Acesso em: 10 nov. 2009.

BRUNCH, C. 1972. **Objectionable microorganisms in nonsterile drugs and cosmetics.** Drug. Cosmet. Ind., 111 (4), 51-54, 150-156.

BUGNO, A.; BUZZO, A. A.; PEREIRA T. C. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Produtos Saneantes Destinados à Limpeza. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 39, n. 3, jul./set. 2003.

CORRÊA, L. M. L. **Saneantes domissanitários e saúde: um estudo sobre a exposição de empregadas domésticas.** Rio de Janeiro: UFRJ, 2005.

COSMÉTICOS E PERFUMES (2001). A perfumaria funcional: sabão em pó, amaciante e detergente. **Cosméticos e perfumes**, São Paulo, nº11, mar/abr. p.16-33. Disponível em: <<http://www.abipla.org.br/cep/perfunc.htm>> Acesso em: 08 nov. 2009

Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos – Módulo IV. In: BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

FASSIHI, R. A. Preservation of medicines against microbial contamination. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. Cap. 50, p. 871-866.

HÖFLING J. F.; SANT'ANNA, M. F.; CORRÊA, I. Avaliação da ação neutralizadora do caldo Letheen, preparado com lecitina de soja não purificada, sobre os desinfetantes à base de formol e de amônio quaternário. **Caldo Letheen**, 2(1), p. 7 – 14, I sem. 1988.

JACKSON, G.J.; MERKER, R. I.; BANDLER, R. (Coord.) **Bacteriological Analytical Manual**, 8. ed., Revisão A, 1998. Disponível em:  
<<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/>> Acesso em: 11 nov. 2009

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

RINGERTZ, O.; RINGERTZ, S.H. 1982. The clinical significance of microbial contamination in pharmaceutical products. In: **Advances in Pharmaceutical Sciences**. Vol 5. Editado por H. S. Bean; A. H. Beckett; J. E. Carless. Londres, Academic Press. p. 202-22

SHARPELL, F.; MANOWITZ, M. Preservation of cosmetics. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. Cap. 51, p. 887-900.

WILSON, L. A.; AHEARN, D. G. 1977. **Pseudomonas-induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascaras**. Am. J. Ophthalmol., 84, 113-119.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.