UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Qualidade Microbiana: Influência de Corantes e Pigmento
no
Método de Bioluminescência

Angela Franco Mattos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora
Profa. Dra Telma Mary Kaneko

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011088

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Mattos, Angela Franco
M444q Qualidade microbiana : influência de corantes e pigmento
no método de bioluminescência / Angela Franco Mattos. --
São Paulo, 2005.
145p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kaneko, Telma Mary

1. Microbiologia farmacêutica 2. Droga : Controle biológico
de qualidade I. T. II. Kaneko, Telma Mary, orientador

615.1 CDD

ANGELA FRANCO MATTOS

**Qualidade Microbiana: Influência de Corantes e Pigmento no Método de
Bioluminescência**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Produção e Controle Farmacêuticos.

Área de concentração: Produção e Controle
Farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo

2005

Angela Franco Mattos

**Qualidade Microbiana: Influência de corantes e Pigmento no
Método de Bioluminescência**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
orientador/presidente**

**Profa Dra. Maria Elena Santos Taqueda
1º. examinador**

**Profa Dra Ana Campa
2º. examinador**

05/09/2005

DEDICATÓRIA

A Deus por permitir encontrar pessoas certas que ajudaram no meu crescimento e por sempre estar do meu lado, mesmo quando eu perdi as esperanças.

Ao meu marido Carlos Roberto de Mattos Filho pela infinita paciência e pela força por mostrar-me que sou capaz de alcançar todos os meus objetivos e vencer.

Aos meus pais pelo carinho infinito e por mostrar-me que apenas com muito esforço e trabalho conseguimos atingir nossas metas.

A minha irmã e amiga Rosangela por todo apoio me dado, por ouvir meus problemas com carinho e sempre estar do meu lado.

Ao meu querido tio Ivan meu segundo pai que muitas vezes foi a minha válvula de escape e sempre esteve pronto a me ouvir.

Aos meus maravilhosos amigos Alber e Floripes por todo apoio me dado, pelo incentivo e carinho.

A Telma, a minha orientadora mãe, com a sua incansável dedicação, amiga e colaboradora, obrigada pelo carinho, pelo incentivo, pelos puxões de orelha, por acreditar em mim e ajudar no meu crescimento, que Deus proteja você e que tenha sempre sucesso orientações.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Maria Valéria Robles Velasco de Paola, por gentilmente ter corrigido a Revisão de Literatura, esclarecendo dúvidas, sugerindo soluções e pelo incentivo para a conclusão do trabalho.

À Professora Dra Maria Elena Taqueda do Departamento de Engenharia Química, da Poli, por gentilmente ter colaborado na execução do planejamento estatístico referente ao experimento.

À professora Terezinha de Jesus, pelo apoio e incentivo para a realização de um bom trabalho.

Ao José de Souza Sobrinho, que esteve sempre disposto a colaborar.

A Débora, Juliano, Satiko e Miriam pelo incentivo e pela ótima convivência no laboratório.

A Leila Bonadio, bibliotecária do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, pela pronta revisão das referências bibliográficas.

Ao Jorge e a Elizabeth, funcionários do Departamento de Pós-Graduação pela pronta ajuda e informações durante todo o período do trabalho.

A Colgate Palmolive, a Sra Nilza Shimorihao, Gerente de Microbiologia da América Latina, por permitir a flexibilidade de horário para que pudesse cursar as disciplinas do curso de pós-graduação e o uso do equipamento após o expediente de trabalho, permitindo a realização do experimento.

A Débora Hiramatsu, companheira de trabalho que me auxiliou nos experimentos após expediente na Colgate Palmolive.

A Embrarad® por gentilmente ter realizado a irradiação das amostras de pigmento e corantes, utilizadas no trabalho.

A Carmem Romero da Celsis®, representante da empresa fabricante do equipamento, pelo carinho e atenção durante o experimento.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 Reação de bioluminescência.....	22
Figura 2.2 Reação de bioluminescência no equipamento.....	51
Figura 2.3 Reagentes usados no equipamento.....	52
Figura 2.4 Equipamento Celsis Optcomp Advance.Im., parte externa e dispositivo para amostras.....	53
Figura 2.5 Planilha programa no qual são inseridos os dados de leitura das amostras.....	54
Fluxograma 1.0 Etapas do experimento realizado.....	74
Figura 4.1 Parte interna do Aparelho Celsis Advanced. Im.....	77
Diagrama 1 Etapas do teste Efeito da Amostra.....	78
Diagrama 2 – Padronização das cepas para preparo do inóculo.....	82
Diagrama 3 – Limite de Detecção (recuperação de microrganismos) nos métodos 1 e 2 para o Pigmento <i>Green Nº7</i> e para os Corantes <i>Blue Covanor</i> e <i>FD&C Nº5</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Exemplos de nomenclatura empregada nos EUA para os corantes usados em alimentos, drogas e cosméticos.....	12
Tabela 4.1. Matriz de ensaio do experimento utilizado no ensaio Efeito da Amostra.....	86
Tabela 4.2. Matriz de ensaio do experimento utilizado no ensaio Limite de Detecção, para os microrganismos: <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 e <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	87
Tabela 5.1. Carga microbiana dos corantes e pigmento antes (<i>bioburden</i>) e após a descontaminação por radiação.....	89
Tabela 5.2. Valores de URL (Unidade Relativa de Luz) do branco do equipamento (<i>background</i>) e do reagente ATP reconstituído (controle positivo) no teste de eficiência do equipamento.....	91
Tabela 5.3. Leitura de URL (Unidade Relativa de Luz) da reação de bioluminescência dos meios de cultura usados nos ensaios realizados nos métodos 1 e 2.....	92
Tabela 5.4. Leitura de URL (Unidade Relativa de Luz) da reação de bioluminescência para a suspensão de pigmento/ corantes na concentração de 1% (p/v) em meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para Método 1...	94
Tabela 5.5. Leitura de URL (Unidade Relativa de Luz) da reação de bioluminescência para a suspensão de pigmento/ corantes na concentração de 1% (p/v) em meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para Método 2.....	95

Tabela 5.6. Análise de variância dos valores de URL para a suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método, no ensaio Efeito da Amostra, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*..96

Tabela 5.7. Comparação das médias dos valores de URL para a suspensão de pigmento/ corantes, no teste Efeito da Amostra , pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.....97

Tabela 5.8 . Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio Efeito da Amostra, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher),do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.....98

Tabela 5.9. Comparação das médias dos valores de URL dos métodos 1 e 2, no ensaio do Efeito da Amostra , pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.....100

Tabela 5.10. Porcentagem de inibição da reação de bioluminescência para suspensão de pigmento/ corantes , na concentração de 1% (p/v), em três diferentes meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para o Método 1.....101

Tabela 5.11. Porcentagem de inibição da reação de bioluminescência para suspensão de pigmento/ corantes, concentração de 1% (p/v), em três diferentes meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para o Método 2.....102

Tabela 5.12. Valores de URL do teste Limite de Detecção microbiana da suspensão de pigmento/ corantes, após inoculação e incubação dos microrganismos <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 , <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, nos diferentes meios de culturas pelo método 1.....	104
Tabela 5.13. Valores de URL do teste Limite de Detecção microbiana da suspensão de pigmento/ corantes, após inoculação e incubação dos microrganismos <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 , <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 em diferentes meios de culturas pelo método 2.....	105
Tabela 5.14. Comprovação da sensibilidade no teste Limite de Detecção microbiano por UFC/mL da suspensão de pigmento/ corantes após contaminação e incubação dos microrganismos <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 , <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, nos diferentes meios de culturas para o Método 1.....	107
Tabela 5.15. Comprovação da sensibilidade no Limite de Detecção microbiano por UFC/mL da suspensão de pigmento/ corantes após contaminação e incubação dos microrganismos <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 , <i>Candida albicans</i> ATCC 10231,nos diferentes meios de culturas para o Método 2.....	108
Tabela 5.16. Análise de variância dos valores de URL suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método no ensaio do Limite de Detecção microbiano da <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416, do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	110

Tabela 5.17. Comparação das médias dos valores de URL das suspensões de pigmento/ corantes no teste Limite de Detecção para <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416 , pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento.....	111
Tabela 5.18. Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no teste Limite de Detecção para <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416 , pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	112
Tabela 5.19. Comparação das médias dos valores de URL dos métodos 1 e 2, no teste Limite de Detecção para <i>Burkholderia cepacea</i> ATCC 25416 , pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	113
Tabela 5.20. Análise de variância dos valores de URL suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método no ensaio do Limite de Detecção para a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	114
Tabela 5.21. Comparação das médias dos valores de URL da suspensão de pigmento/ corantes no teste de Limite de Detecção para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	115

Tabela 5.22. Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio no teste de Limite de Detecção para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	116
Tabela 5.23. Comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no teste Limite de Detecção para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	117
Tabela 5.24. Análise de variância dos valores de URL para método, meio de cultura e amostra no ensaio do Limite de Detecção microbiano para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	118
Tabela 5.25. Comparação das médias dos valores de URL da suspensão pigmento/ corantes no teste de Limite de Detecção para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	119
Tabela 5.26. Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio no teste de Limite de Detecção para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	120

Tabela 5.27. Comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no ensaio teste de Limite de Detecção para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	121
Tabela 5.28. Análise de variância dos valores de URL suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método de no teste Limite de Detecção microbiano para a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	122
Tabela 5.29. Comparação das médias dos valores de URL das suspensões de pigmento/ corantes no teste de Limite de Detecção para a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	123
Tabela 5.30. Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no teste de Limite de Detecção para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	124
Tabela 5.31. Comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no teste Limite de Detecção para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo <i>three-way</i>	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ADP- adenoquinase
- AMP –adenosina monofosfato
- ANVISA- Agência de Vigilância Sanitária
- ATCC-American Type Culture Collection
- ATP – adenosina trifosfato
- B.cepacia – Burkholderia cepacia – Denominação microrganismo
- BPF - Boas Práticas de Fabricação
- C.albicans – Candida albicans- Denominação microrganismo
- CI – (Colour Index) - Órgão dos EUA, responsável pela classificação dos corantes e pigmentos de acordo com as classes químicas a que pertencem e com as aplicações a que se destinam
- CIP (Cleaning In Place) – Limpando no Local, trata-se de limpeza empregada em equipamentos industriais.
- CTFA (The Cosmetic , Toiletry and Fragrance Association)
- DE- Dey Engly Neutralization Broth – Denominação do meio de cultura
- DNA- ácido desoxoribonucléico
- D&C – (Drug and Cosmetic) – Classificação de corantes certificáveis que podem ser usados em medicamentos e cosméticos
- E.coli- Escherichia coli- Denominação microrganismo

- Ext D&C – (Drug and Cosmetic) – Classificação de corantes certificáveis que podem ser usados em medicamentos e cosméticos que não entram em contato com as membranas mucosas ou são ingeridos.
- FDA – (Food and Drug Administration) – Órgão regulatório responsável por medicamentos e alimentos nos EUA
- FD&C – (Food, Drug and Cosmetic) – Classificação de corantes certificáveis que podem ser usados em alimentos, medicamentos e cosméticos
- GMP – (Good Manufacturing Practices)– Boas Práticas de Fabricação
- HACCP (Hazard Analysis Control Point) - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
- H.pylori- Helicobacter pylori - Denominação microrganismo
- LB- Lethen Broth - Denominação do meio de cultura
- MLA – Modified Lethen Agar – Meio de cultura Lethen Agar Modificado
- PCR – (Polymerase Chain Reaction) – Reação de Polimerase em Cadeia
- PDA – (Parenteral Drug Association) – Associação Drogas Parenterais
- Ppi - Fósforo que participa da reação de bioluminescência
- QI- Qualificação de Instalação - etapa qualificação do equipamento
- QO – Qualificação de Operacional – etapa qualificação do equipamento
- QP- Qualificação de Projeto - etapa qualificação do equipamento
- Rbroth – Denominação do meio de cultura
- RNA- ácido ribonucléico

- SAGEP (Société Anonyme de Gestion de Eaux de Paris) – Sociedade Anônima de Gestão de Água de Paris-França
- S.aureus – Staphylococcus aureus – Denominação microrganismo
- TAT – Tryptone Azolectin Tween - Denominação do meio de cultura
- TBC – (Total Bacterial Count) – Contagem total de bactéria
- TSB - (Tryptic Soy Broth) – Meio de cultura - Caldo Caseína Soja
- TRS – Denominação de microrganismos termorresistentes (resistentes à temperatura)
- UFC – Unidade Formadora de Colônia
- USP- (United States Pharmacopeia) – Farmacopéia Americana
- URL – Unidade Relativa de Luz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 HISTÓRICO DOS PRODUTOS COSMÉTICOS	4
2.2 INTRODUÇÃO DE CORANTES E PIGMENTOS EM COSMÉTICOS	8
2.2.1 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO	10
2.2.2 APLICAÇÕES	13
2.2.3 FATORES INFLUENTES NA ESCOLHA	13
2.2.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	15
2.3 QUALIDADE MICROBIANA	17
2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS	19
2.5 MÉTODO DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA	22
2.6 APLICAÇÕES DO MÉTODO DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA	25
2.6.1 USO DO MÉTODO PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL E CONTROLE DE LIMPEZA E SANITIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS	27
2.6.2 MÉTODO ATP-BIOLUMINESCÊNCIA PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS	31
2.6.3 USO DO MÉTODO PARA DIAGNÓSTICOS E HOSPITAIS	38
2.6.4 USO DO MÉTODO EM PROGRAMAS DE QUALIDADE	39
2.6.5 OUTRAS APLICAÇÕES DA TÉCNICA	40
2.6.6 ADAPTAÇÕES DO MÉTODO DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA	44
2.7 MÉTODO DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA UTILIZANDO O EQUIPAMENTO CELSIS® OPTCOMP ADVANCE.IM	49

2.7.1 QUALIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO	54
2.7.2 TESTES PRELIMINARES PARA O USO DO MÉTODO DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA	55
2.7.3 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO	56
2.7.4 EFEITO DA AMOSTRA	58
2.7.5 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA	59
2.7.6 LIMITE DE DETECÇÃO (RECUPERAÇÃO DOS MICRORGANISMOS)	60
2.7.7 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	61
2.7.8 TESTE DE EFICIÊNCIA DE CONSERVANTES OU DESAFIO	62
2.7.9 TESTE PARALELO	62
2.7.10 PLANO DE VALIDAÇÃO	64
2.7.11 ÓRGÃOS REGULATÓRIOS	66
3 OBJETIVOS	70
4 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1 MATERIAL	71
4.1.1 MATERIAL OBJETO DE ESTUDO	71
4.1.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	72
4.1.3 EQUIPAMENTOS	73
4.2 MÉTODO	73
4.2.1 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PIGMENTO E CORANTES	74
4.2.2 MÉTODOS USADOS (1 E 2)	75
4.3 – PREPARO DO EQUIPAMENTO	76
4.4- EFEITO DA AMOSTRA	77
4.5 - LIMITE DE DETECÇÃO	80

4.6. DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO (TESTES PARALELOS)	84
4.7 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DO EXPERIMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS	85
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS	133

1. INTRODUÇÃO

Na avaliação da qualidade microbiana de produtos cosméticos admite-se a presença de carga microbiana, no entanto deve-se comprovar a ausência de microrganismos patogênicos e determinado o número de microrganismos viáveis, em função dos tipos de utilização do produto, não comprometendo a sua eficácia e a segurança ao consumidor.

Aspecto quantitativo, a presença de cargas microbianas elevadas de microrganismos saprófitas, propicia a ação de agentes infectantes oportunistas e coloca em risco a saúde do consumidor e adicionalmente, pode comprometer a estabilidade física e química do produto.

A análise da qualidade microbiana de matérias-primas e de produtos por meio da técnica convencional de contagem de microrganismos exige demanda elevada de trabalho e fornece resultados em período de tempo não compatível com o desenvolvimento da tecnologia e informática. Atualmente, os processos de fabricação encontram-se cada vez mais automatizados e rápidos, tornando necessário desenvolvimento de técnicas de análise microbiológica inovadoras, compatíveis com o ritmo da produção industrial (OHARA et. al, 1996).

A indústria de produtos cosméticos necessita de testes alternativos rápidos para a avaliação microbiológica dos produtos, a fim de propiciar benefícios como a redução do tempo de trabalho, de material, a obtenção de limites de detecção menores e a possibilidade de automação. Adicionalmente, existe a tendência

mundial em aceitar esses métodos e por este motivo, têm sido desenvolvidos programas de avaliação. Essas mudanças significativas trouxeram melhorias, principalmente para empresas de grande porte que necessitam de liberação rápida de seus produtos, considerando suas características intrínsecas e a manutenção da qualidade em todos aspectos maior rotatividade de estoques e maior lucratividade (JIMENEZ,2001).

Para os microbiologistas a maior preocupação está na comparação dos métodos rápidos em relação aos tradicionais, considerando a confiabilidade nos resultados. Os métodos rápidos devem manter as mesmas características dos métodos tradicionais, porém um tempo menor para realização (LERANZO et.al,2001).

Existem vários métodos microbiológicos para a liberação rápida de matérias-primas e de produtos cosméticos e entre eles o do método de bioluminescência, técnica baseada no fenômeno da geração de luz por organismos vivos. Para que isto ocorra é necessária a presença de ATP (adenosina trifosfato) que ocorre em todas as células vivas, da luciferina e da enzima luciferase . A bioluminescência irá quantificar a adenosina trifosfato (ATP) dos microrganismos, principal composto armazenador de energia. O método pode detectar quaisquer tipos de microrganismos (MORRIS, 1998).

Essa técnica é amplamente utilizada em vários países e tem aprovação de órgãos regulatórios como o *FDA (Food and Drug Administration)* dos Estados Unidos, *PDA (Parenteral Drug Association)* da Europa para bebidas, produtos

cosméticos e farmacêuticos não estéreis e deve ter suas metodologias validadas, comprovando a reprodutibilidade dos resultados (CELSIS,1998). A vantagem do método de bioluminescência é propiciar a liberação da matéria prima ou do produto em até vinte e quatro horas, enquanto que a metodologia tradicional pode necessitar até mais de uma semana. Existem vários fatores que podem influenciar a precisão e a exatidão dos resultados quando o método é empregado na análise da qualidade microbiana de produtos cosméticos, como os componentes da formulação, tais como: tensoativos, corantes, perfumes e conservantes podem interferir na atividade da enzima luciferase. Particularmente, as colorações produzidas pelos pigmentos e corantes podem influenciar a sensibilidade de leitura do equipamento. Assim, na validação do método existe a necessidade de verificar por meio do ensaio de Efeito da Amostra, a possível interferência da matéria prima e/ou tipo de produto, na leitura do equipamento. Deve ser também realizado o teste para verificar a sensibilidade do método pelo ensaio de Limite de Detecção, onde quantidades conhecidas de microrganismos são inoculadas nas amostras e observada sua capacidade de recuperação (CELSIS, 1998). Adicionalmente, como as análises da qualidade microbiana da matéria-prima e do produto acabado requerem reagentes biológicos, o tipo das espécies de microrganismos e o meio de cultura utilizado poderão, também, influenciar no método de bioluminescência. Portanto, a proposta do trabalho foi analisar a influência de pigmento e corantes no método de ATP-bioluminescência, em diferentes meios de cultura e com auxílio do equipamento Optcomp Advance.im.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico dos produtos cosméticos

O uso dos produtos cosméticos teve início com os homens da pré-história que pintavam o corpo e se tatuavam, utilizando o mesmo material para gravações em rochas e cavernas.

Nos livros dos egípcios existem citações que demonstravam os cuidados dos homens com a higiene pessoal e o uso de produtos cosméticos: “Depois de se levantar pela manhã e satisfazer suas necessidades fisiológicas, o chefe da família deve lavar os dentes, aplicar no corpo uma quantidade limitada de ungüentos e perfumes, colírio para as pálpebras e os olhos, pintar os lábios com alactaka...”. Baseados nesses documentos existem indícios que os egípcios foram os primeiros usuários de produtos cosméticos. Os pigmentos relatados eram o “Kohl”, minério de antimônio ou manganês, o verde de malaquita, minério de cobre, e o “cinabre”, minério de sulfeto de mercúrio, foram usados como sombras de olhos e “rouge”. Foram utilizados, também, extratos vegetais, como a “henna”. No sarcófago de Tutankamon (1400 a.C.) foram encontrados cremes e incenso de potes de azeite usados na decoração e para tratamento de beleza (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

Relatos da antiga Índia, China e Egito mostraram que os gregos e os romanos foram os povos que desenvolveram e aperfeiçoaram o creme dental. Com a queda

do Império Romano, a evolução e o desenvolvimento tornaram-se obscuro e pouco se conhece sobre as mudanças ocorridas após a chegada de Cristo até o ano 100 dC. Alguns relatos indicaram que a civilização Persa também desenvolveu o creme dental incluindo partes de animais secos (em pó), ervas, mel e minerais (JUNGERMAN; SONNTAG, 1991).

Durante a dominação Grega na Europa, 400 a.C., os cosméticos estavam menos relacionados aos ritos religiosos e direcionados aos cuidados da saúde como dieta, exercícios físicos e higiene. Na era Romana, por volta de 180 d.C., o médico grego Claudius Galen realizou pesquisa científica sobre a manipulação de produtos cosméticos, iniciando assim a era Galênica dos produtos químicos e farmacêuticos. Deve-se a esse pesquisador o desenvolvimento do *Unguentum Refrigerans*, o famoso “cold cream”, baseado em cera de abelha e bórax (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

Nessa época, os cosméticos estavam, também, relacionadas à alquimia, ciência oculta que utilizava formulações cosméticas para os atos de magia e ocultismo. Ovídio escreveu um livro voltado à beleza da mulher, que a ensinava a cuidar de sua beleza por meio de receitas caseiras. No Kama-Sutra, livro escrito pelo estudante de religião “Vatsyayana” considerando uma publicação de auto – ajuda, que descrevia os cuidados que o indivíduo devia tomar para tratar de sua vida material, espiritual e sexual, por meio de ensinamentos como aplicação de essências na pele e nos cabelos e colorir os fios de cabelos, unhas, corpo, dentes e até as roupas (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

A Idade Média trouxe a clausura para a ciência cosmética, período em que o rigor religioso do Cristianismo reprimiu o culto à higiene e à exaltação da beleza, impondo vestimentas recatadas. Com o desaparecimento do uso destes produtos na Europa, essa época foi conhecida como “500 anos sem banho” (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

No Renascimento e com o descobrimento da América, no século XV, começou novamente a busca pelo embelezamento. Os pintores retrataram os costumes e hábitos de vida da época como, por exemplo, em Mona Lisa de Leonardo da Vinci, foi retratada uma mulher sem sobrancelhas, face ampla e alva e pele suave e delicada. Porém, devido à falta de higiene, os perfumes foram criados para mascarar o odor corporal.

Durante a Idade Moderna, séculos XVII e XVIII, foi observado crescente evolução dos cosméticos e da utilização de perucas cacheadas. Em Paris, na Rua Saint Honoré eram vendidos produtos cosméticos, depilatórios, pomadas, azeites, águas aromáticas, sabonetes e outros artigos de beleza. Neste período, ainda persistiam os costumes de não tomar banho regularmente, o que propiciou o crescimento da produção de perfumes, tornando-se de grande importância para a economia francesa, desde o reinado de Luiz XIV. Contudo, a evolução do uso dos perfumes se deve a Giovanni Maria Farina, em 1725, que se estabeleceu em Colônia, Alemanha e inventou a famosa “água de colônia” (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

Em 1770, os puritanos liderados por Oliver Cromwell , trouxeram outro período, no qual o uso de cosméticos e perfumes ficou em segundo plano. O parlamento inglês estabeleceu que: “Qualquer mulher que se imponha, seduza e traia no matrimônio qualquer um dos súditos de sua Majestade, por utilizar perfumes, pinturas, cosméticos, produtos de limpeza, dentes artificiais, cabelos falsos, etc, irá incorrer nas penalidades previsto pela Lei contra a bruxaria e o casamento considerado nulo e sem validade” (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002)

Na Idade Contemporânea, século XIX, período Vitoriano na Inglaterra, Isabelina na Espanha e dos déspotas esclarecidos na França pós Napoleão, os cosméticos retomaram a popularidade. Foi um período propício para o surgimento de novas matérias-primas para os cosméticos e os produtos de higiene nos Estados Unidos, França, Japão, Inglaterra e Alemanha. Nessa época, ocorreu o reinício do mercado de cosméticos e produtos de higiene no mundo.

No início do século XX, os produtos cosméticos deixaram de ser produzidos de forma artesanal e começaram a ser produzido industrialmente. Contribuíram para essa evolução vários pioneiros, entre eles, uma jovem polonesa que chegou a Melbourne, na Austrália, em 1902. Ela trazia consigo alguns frascos contendo cremes para a pele, preparados com receitas da família. A pele das mulheres australianas sofria efeitos do calor, do clima seco e impressionada por isso, Helena Rubinstein abriu seu primeiro salão de beleza. Mais tarde foi para os Estados Unidos e se tornou a principal força no desenvolvimento da indústria de beleza. Outro pioneiro, Charles Revlon, estabeleceu sua empresa inicialmente com verniz de unha, que posteriormente veio a ser denominado esmalte de unha. Max Factor começou

sua produção com a maquiagem para teatro, na costa oeste dos Estados Unidos, mas rapidamente percebeu o potencial do mercado doméstico de consumo (MYDDLETON, 1963).

David McConnell vendia livros de porta em porta, incluindo a Bíblia, e adotou a estratégia de presentear seus clientes com pequenas amostras de perfume para cada venda. Rapidamente percebeu que seus clientes estavam mais interessados nos perfumes do que nos livros e desta estratégia resultou o surgimento da empresa Avon (MYDDLETON, 1963).

Existem muitas definições do que é cosmético. Conforme a legislação brasileira a definição de cosmético: “Cosméticos, Produtos de Higiene e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (BRASIL, Resolução nº 79 de 28 de agosto de 2000).

2.2 Introdução de Corantes e pigmentos em cosméticos

A adição de cor dos produtos cosméticos é uma prática antiga. Há séculos, tem sido empregada grande variedade de materiais naturais, como carvão, minério de cobre, “henna”, açafrão, e outros minerais e derivados de plantas. No final do século XIX, fabricantes de corantes sintéticos estabeleceram-se na Inglaterra,

França e Suíça. Até o século XX, existiam poucas limitações nos tipos de corantes que podiam ser usados em produtos de cuidados pessoais ou em alimentos. A Legislação Americana, do ano 1880, permitia o uso de certos corantes orgânicos em alimentos, como para tingir a manteiga de amarelo. Porém, existiam lacunas nessa legislação, pois muitos componentes que proporcionavam coloração brilhante continham complexos de metais tóxicos. No decorrer do século, ocorreram doenças e mortes nos Estados Unidos que foram atribuídos aos produtos formulados com corantes perigosos. Foram relatadas mortes de mulheres que ingeriram pickles coloridos com sulfato de cobre; e um fornecedor usou arsenito de cobre num pudim verde, que resultou em duas mortes (RUSH,1997).

Frente a essas tragédias, o “Food and Drug Act” estabeleceu uma lista de aditivos corantes aprovados em 1906. As restrições para corantes usados em cosméticos foram só adicionadas à legislação em 1938, com a aprovação do “Food,Drug and Cosmetic Act”, versão mais completa da lei de 1906. Esta legislação estabelecia que cada lote de fabricação do corante, deveria ser confirmada se estava de acordo com os padrões estabelecidos pela Lei, para ser considerada aprovada.

Apesar dos esforços de salvaguardar a população dos corantes perigosos, nos anos de 1950, várias crianças ficaram doentes após ingerir pipocas e balas que continham níveis elevados de corantes, o que resultou na aprovação do “Color Additives Amendments” de 1960. O *FDA* “Food and Drug Administration” estabeleceu limitações na quantidade dos corantes para assegurar que níveis nocivos não seriam utilizados. Isto resultou na exigência para que os fabricantes de

corantes apresentassem laudos de testes rígidos que garantisse a segurança destes. Assim, com essa preocupação, nos últimos 40 anos ocorreu diminuição drástica do número de novos corantes aprovados. Em 1959, 116 corantes foram certificados e em 1996, apenas 34. (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

2.2.1 Conceito e classificação

Corantes e pigmentos orgânicos podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando ao ser aplicada a um material, conferem cor. Os corantes são retidos no material por adsorção, solução, retenção mecânica ou por ligações químicas iônicas ou covalentes. Os pigmentos, por serem, geralmente, insolúveis em água, são usualmente aplicados por meio de veículos (excipientes líquidos), podendo ser o próprio substrato.

Os corantes são classificados como orgânicos ou inorgânicos, dependendo da sua origem química. Os primeiros foram originalmente denominados de corantes de “carvão de hulha” ou “anilina”, pois eram derivados de fontes de carvão. A segunda categoria substituiu os corantes derivados de carvão, disponíveis em várias tonalidades como vermelho, azul, verde, amarelo, laranja, violeta, e também podem ser solúveis ou insolúveis em água e em óleo. A forma insolúvel é conhecida como “laca” de corante, preparada pela precipitação de um corante solúvel em um substrato insolúvel (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

Tendo em vista que corantes e pigmentos são compostos complexos, muitas vezes é impossível representá-los por uma fórmula química, pois alguns são

misturas de vários compostos e outros não possuem estrutura química definida. Por esse motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, preferindo-se utilizar os nomes comerciais.

Para facilidade de referência, alguns países adotaram sistemas de nomenclatura para esses compostos. Os Estados Unidos designaram na publicação da *American Association of Textile Chemistry na British Society of Dyers and Colorists* uma lista organizada com as colorações aprovadas como *FD&C*, *D&C* ou *Ext D&C* (Tabela 2.1), enquanto que a União Européia (UE) empregou a denominação de *Colour Index* (CI) para identificação, atribuídos a estrutura química conhecida.

A classificação dos corantes e pigmentos pode ser feita de acordo com as classes químicas a que pertencem e com as aplicações a que se destinam. O *Colour Index*, classificou os corantes e pigmentos em 26 tipos, segundo os critérios das classes químicas conhecidas, e em 20 tipos, além de algumas subdivisões, do ponto de vista das aplicações. Alguns exemplos da classificação de corantes e pigmentos como a acridina, aminocetona, azóicos, xantenos, oxazina e outros (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2004) Disponível em <<http://www.abiquim.org.br/canais.asp?id=15>>. Acesso em 02 out. (2004)

Tabela 2.1. Exemplos de nomenclatura empregada nos EUA para os corantes usados em alimentos, medicamentos e cosméticos (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002)

Tipo de Corante	Definição
Alimentos, medicamentos e cosméticos (FD&C)	Corantes certificáveis para uso em coloração de alimentos, medicamentos e cosméticos,
Medicamento e cosmético (D&C)	Corantes certificáveis para o uso de coloração de medicamentos e cosméticos, incluindo aqueles que permanecem em contato com as membranas mucosas e os ingeridos,
Medicamento e cosméticos – externo (Ext.D&C)	Corantes certificáveis para o uso na coloração de medicamentos e cosméticos, que não entram em contato com as membranas mucosas ou são ingeridos.

2.2.2 Aplicações

Os pigmentos possuem como característica funcional, o fornecimento de cor e por esse motivo sua aplicação é extremamente difundida em diferentes materiais. Possuem origem orgânica são obtidos por síntese química e possuem uma aplicação ampla em indústrias de cosméticos, sabões, detergentes, fertilizantes, têxteis, tintas e vernizes, plásticos e polímeros e couros. Como características favoráveis, possuem opacidade, poder de cobertura elevado, facilidade de uso e ótima relação custo x benefício. Os pigmentos sintéticos normalmente usados são óxidos com possibilidade elevada de ser adicionado a produtos micronizados, com absorção de óleo, teor de impurezas reduzido e rendimento elevado (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2004) Disponível em <<http://www.abiquim.org.br/canais.asp?id=15>>. Acesso em 02 out. 2004).

2.2.3 Fatores influentes na escolha

Muitos fatores determinam a escolha do corante apropriado, incluindo limitações da legislação, propriedades físicas e químicas da formulação, estabilidade química do corante em relação aos demais componentes da fórmula e, naturalmente, a coloração desejada. O tipo de produto que será colorido e em que parte do corpo será utilizada determinará qual a classe do corante, para uso de acordo com a legislação em vigor.

Nos EUA, nos cosméticos tópicos que não entram em contato direto com a área ao redor dos olhos ou membranas mucosas são permitidos o uso de corantes FD&C, D&C ou Ext.D&C. São usados em produtos como xampus, condicionadores e loções para a pele. Para aqueles empregados na cavidade oral, como creme dental e enxaguatório bucal, devem usar corantes FD&C ou corantes D&C especificamente aprovados, pela possibilidade de ingestão acidental (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002).

Para selecionar um corante, o formulador deve estar ciente dos fatores que podem afetar sua estabilidade, pois dependem dos componentes que compõem a preparação como:

- Exposição à luz ou ao calor. Produtos em materiais de acondicionamento com coloração clara, quando expostos à luz, podem desestabilizar ou ter a perda de coloração. *FD&C Blue № 1* é um exemplo nesse aspecto.

- Valor de pH extremamente elevado ou reduzido. Alguns corantes são mais ou menos estáveis em meios ácidos ou alcalinos. Outros podem ter tons completamente diferentes em valor de pH específico.

- Concentração. Corantes usados a concentrações reduzidas conferem a impressão de desbotamento, quando comparados com concentrações mais elevadas.

- A presença de componentes como tensoativos, agentes redutores ou oxidantes, aldeídos e principalmente os perfumes podem modificar a cor.

- Contaminação microbiana. Alguns corantes podem ser degradados por bactérias. Essa é uma preocupação quando são envolvidos corantes para cosméticos e alimentos, pois a degradação pode alterar o desempenho deste na formulação e trazer problemas aos produtos.

A maioria dos corantes é fornecida sob a forma de pó concentrado e, normalmente, são utilizados em concentração reduzida na formulação.

Tendo em vista a natureza dos corantes, o formulador deve estar atualizado para aqueles aprovados, incluindo os que têm uso restrito, dependendo da legislação do país. As técnicas analíticas modernas podem detectar contaminações reduzidas que podem ter efeitos deletérios para a saúde; ocasionando sua remoção da lista de corantes permitidos.

2.2.4 Legislação brasileira

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) que é o órgão responsável pelo uso de corantes & pigmentos em produtos cosméticos, por meio da Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000 no Anexo III, menciona a "Lista de Substâncias Corantes Permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e

Perfumes, definindo os tipos de produtos e suas respectivas aplicações e a concentração máxima para uso” (BRASIL, Resolução nº79 de 28 de agosto de 2000).

Conforme a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), os corantes deverão obedecer às especificações de identidade e pureza estabelecidas pelos organismos internacionais de referência, para ser utilizados em produtos cosméticos de higiene pessoal e perfumes. As impurezas máximas de metais permitidas para os corantes orgânicos artificiais são mencionadas a seguir:

- bário solúvel em ácido clorídrico 0,001N (expresso em cloreto de bário) - 500 ppm; - arsênico (expresso em As_2O_3) - 3 ppm;
- chumbo (expresso em Pb- sal de chumbo) - 20 ppm;
- metais pesados (outros além do Pb) - 100 ppm (BRASIL, Resolução nº79 de 28 de agosto de 2000).

As lacas insolúveis de bário, estrôncio e zircônio, sais e pigmentos destas substâncias corantes, podem também ser permitidos, desde que seja comprovada sua insolubilidade empregando teste apropriado. A relação de corantes aprovados para o uso em produtos cosméticos, higiene pessoal e perfumes envolve o campo de aplicação :

- Substâncias corantes permitidas para todos os tipos de produtos.
- Substâncias corantes permitidas para todos os tipos de produtos, exceto aqueles que são aplicados na área dos olhos.

- Substâncias corantes permitidas exclusivamente em produtos que não entram em contato com mucosas.
- Substâncias corantes permitidas exclusivamente em produtos que tenham breve tempo de contato com a pele e cabelos.

2.3 Qualidade microbiana

Após trinta anos da implementação da GMP (*Good Manufacturing Practices*) ou das BPF (Boas Práticas de Fabricação), procedimentos utilizados para adequar a fabricação de produtos desde a compra da matéria-prima até o envase do produto final. A USP (*United States Pharmacopeia*), mencionou o Teste Limite Microbiano para a determinação da contagem de microrganismos totais para bactérias e fungos em matérias-primas e produtos. Em adição à contagem microbiana, a análise microbiológica geralmente determina a segurança do produto através da ausência de microrganismos indicadores, considerado um risco para os consumidores e indicativo de contaminação (JIMENEZ, 2001a).

A contaminação microbiana ainda é a primeira das maiores causas de recolhimento de produtos cosméticos do comércio no mundo. JIMENEZ, 2000 concluiu que os microrganismos mais comuns encontrados em produtos de higiene pessoal e farmacêutico ao redor do mundo são: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* e a *Burkholderia cepacea*. A USP (*United States Pharmacopeia*) e a Farmacopéia Européia, indicaram que as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, podem ser encontradas em amostras de cremes dentais, produtos tópicos, xampus, soluções orais, medicamentos e desinfetantes. Esta contaminação ocorre

pela presença de microrganismos em matérias-primas, água e ausência das Boas Práticas de Fabricação dos produtos durante sua produção (JIMENEZ, 2000).

A *Burkholderia cepacea* tem sido um dos principais microrganismos contaminantes de produtos cosméticos devido à elevação de sua resistência aos sistemas conservantes antimicrobianos convencionais. Uma das causas dessa resistência ocorre quando a conservação dos produtos está inadequada e às condições de fabricação que favorecem sua adaptação e seu crescimento (JIMENEZ, 2000).

As técnicas analíticas químicas evoluíram nos últimos anos e novas técnicas foram introduzidas no controle de qualidade das indústrias farmacêuticas e cosméticas para a análise das matérias-primas em até 48 horas. Os processos de fabricação encontram-se cada vez mais automatizados e rápidos. Assim, existe a necessidade das indústrias de automatizar testes rápidos que auxiliam na verificação da qualidade microbiana em intervalo de tempo menor (OHARA et al., 1996).

Na análise microbiológica devemos considerar as amostras, os erros de metodologia distribuídos, as células morfológicas e atividade metabólica. Diferentes das análises químicas, quando é possível maior precisão, a própria preparação do inóculo bacteriano não apresenta consistência quanto ao número de células conhecidas por unidade de volume. Por meio de estudos realizados com diferentes microrganismos, concluiu-se que apenas 95% dos inóculos possuem limite confiável o que significa um erro de contagem em placa, na ordem de $\pm 0,3$ log de diferença (WILLS, 2000).

Considerando todos esses fatores e a necessidade de automação, o método microbiológico deve ser confiável, reprodutível e manter o objetivo de avaliar a qualidade microbiana em menor tempo (JIMENEZ, 2003).

2.4. Métodos alternativos

Com esse enfoque, métodos alternativos, conhecidos como métodos microbiológicos rápidos e automatizados, têm sido propostos para sua aplicação nas indústrias cosméticas. O desenvolvimento destas técnicas tem sido fundamentado em diversos princípios, entre os mais adequados para o controle da qualidade microbiana dos cosméticos temos filtração associada a epifluorescência, impedância, microcalorimetria, biosensores e/ou a bioluminescência (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003).

No método da filtração associado a epifluorescência os microrganismos provenientes da amostra são filtrados através de membrana, posteriormente são corados com solução de alaranjado de acrilamida. O princípio do método baseia-se nas reações do corante com DNA e RNA das células viáveis revelando fluorescência amarelo esverdeado e coloração vermelha, respectivamente, resultando fluorescência alaranjada. As limitações do método envolvem a necessidade de filtração da amostra e o nível de detecção de microrganismo é de 10^3 microrganismos / mL no mínimo (REYES; FLORES, 2000).

O método elétrico se fundamenta na detecção das alterações elétricas provocadas pelo metabolismo dos microrganismos que se multiplicam em determinado meio de cultura. Existe a transformação dos substratos com carga elétrica reduzida, como carboidratos, proteínas e lipídios em substâncias como ácidos e aminas. Estas alterações são avaliadas através de parâmetros, como:

- impedância;
- condutância;
- capacitância e resistência (REYES; FLORES, 2000).

Na impedância ou resistência ao fluxo da corrente, as amostras são transferidas para compartimentos ou células de um módulo contendo meio de cultura, que entra em contato com os eletrodos através dos quais se aplica voltagem constante. A corrente resultante depende da impedância proveniente do crescimento microbiano no meio utilizado, relacionado com o metabolismo que origina as substâncias eletricamente carregadas.

A condutância depende do número e da natureza das substâncias eletricamente carregadas na solução, dos microrganismos presentes que podem converter substâncias de carga elétrica reduzida como carboidratos, proteínas e lipídeos em substâncias com mais cargas elétricas, como ácidos e aminas (OHARA et al., 1996).

A capacitância é a característica de um elemento armazenar energia em um campo elétrico, sem dissipá-la. Assim, quanto maior for a impedância (resistência ao fluxo da corrente) menor será a condutância (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003).

Para a medida de carga microbiana da amostra, é definido como o tempo de detecção o intervalo de tempo necessário para alcançar o nível de 10^7 UFC / mL. Este é o ponto no qual a aceleração pode ser analisada na curva de impedância. Como vantagem, apresenta menor custo operacional, pois é possível realizar acima de 100 ensaios simultâneos. As limitações decorrentes do método envolvem a necessidade de conhecimento do tempo de geração do microrganismo e de execução do teste, que é próximo ao do método convencional de contagem (REYES ; FLORES, 2000).

O método de ATP-bioluminescência é considerado alternativo, pois possuem como característica a liberação rápida de resultados, podendo ser usado para matérias-primas, cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Com a diluição da amostra em meio de cultura e incubação por 24 horas é possível verificar se existe a presença do ATP microbiano, podendo ser utilizado na rotina após validação analítica (JIMENEZ, 2001a).

O outro método difundido é o *PCR (Polymerase Chain Reaction)* ou Reação de Polimerase em Cadeia. Existem pesquisas onde se verifica o uso dessa técnica nas indústrias de cosméticos e farmacêuticas na rotina do controle de qualidade para identificação de bactérias e fungos (bactérias e leveduras). Entretanto, a possibilidade do *PCR* detectar diferentes tipos de microrganismos encontrados nos produtos, ainda está sendo recentemente estudada (JIMENEZ, 2001b).

Stewart, 1997 relatou que as perspectivas de técnicas moleculares são desafios para a análise microbiológica. Os tópicos importantes que devem ser considerados pelos microbiologistas envolvem a viabilidade bacteriana; as células bacterianas injuriadas; o método de detecção de bactérias; o estudo *in vivo* de bactérias sobreviventes em alimentos e seu crescimento, acompanhado do controle dessas bactérias. A partir dos resultados obtidos é possível iniciar o uso de um método molecular e sua possível validação.

A aplicação em particular de um método, vai depender da natureza ou da composição do produto. (MORRIS, 1998).

2.5 Método de ATP-bioluminescência

A bioluminescência é o processo de emissão de luz fria visível por organismos vivos. Este processo é uma modalidade de quimioluminescência funcional catalisada por enzimas denominadas luciferases. Para que ocorra esse fenômeno são necessárias a presença do ATP (adenosina trifosfato) e da enzima óxido-redutase (designação geral luciferase) e da luciferina (substrato das reações). O ATP é a medida de energia livre dos sistemas biológicos e é o principal composto armazenador de energia em todos os tipos de célula (JIMENEZ, 2000).

Reação de bioluminescência :

Luciferase

E= enzima luciferase

LH2=luciferina

E-LH2-AMP= complexo luciferase-luciferina-AMP,

PP= pirofosfato

O conhecimento das reações químicas envolvidas no fenômeno de bioluminescência em insetos, principalmente em vagalumes adultos família *Lampyridae*, conhecido como lampirídeo auxiliou no desenvolvimento e aplicação de ensaios analíticos (REYES;FLORES,2000).

Os conhecimentos da luminescência desses vagalumes atribuíam a emissão de luz a presença de fósforo ou componentes derivados. Outros estudos foram realizados envolvendo o ATP nesta reação e a primeira luciferina e luciferase de insetos purificadas foram as dos lampirídeos norte-americanas em 1957. A partir daí grandes avanços foram realizados e aplicabilidades dessas purificações estenderam-se as áreas de bioquímica, microbiologia clínica e biologia celular (WILSON,1995).

A luciferina de lampirídeos é um composto benzotiazólico de peso molecular 280. Em água, estes compostos apresentam típica fluorescência verde-amarelada independente do pH, devido ao sítio ativo da luciferase ocorrer a transferência de próton do grupo fenólico da espécie excitada para um resíduo básico durante a bioluminescência. A luciferirase de lamperídeos catalisa a oxidação da luciferina por

oxigênio, ativada por MgATP. Na primeira etapa da catálise enzimática, a luciferase atua como adenil-transferase, adenilando a luciferina a partir de ATP (WOOD, 1995).

Kyriakides et.al (1998), citou as principais fontes de ATP, como o ATP livre que está suspenso no meio ou resíduos biológicos, o ATP ligado que está unido a agregados de proteínas fora da célula (ex. micelas de caseína em leite ou em glóbulos de gordura), o ATP somático que está inserido nas células não microbianas (ex. células epiteliais) e o ATP microbiano que está dentro das células (bactérias, leveduras, fungos, esporos).

A sensibilidade elevada da enzima luciferase e a detecção de luz na presença do ATP, permitem o uso deste sistema para verificar a contaminação microbiana. Cada microrganismo contém comparativamente um número de moléculas de ATP, que ao reagir com a luciferase emite luz, indicando os níveis de contaminação na amostra em análise (REYES; FLORES, 2000).

A adenoquinase é outra enzima que existe na natureza. O controle essencial para sua manutenção é o balanço entre ATP: ADP: AMP para a regulação própria de glicosídeo e outros sistemas de energia. A enzima catalisa a reação:

A adenoquinase é empregada pelo microrganismo para ampliar a concentração de ATP na presença do excesso ADP. Após tempo de incubação reduzido de aproximadamente dez minutos, o ATP geralmente aparece no ensaio da

reação de bioluminescência convencional. Quanto maior a formação de ATP, maior a sensibilidade e reprodutibilidade do ensaio (REYES; FLORES, 2000).

2.6 Aplicações do método de ATP-bioluminescência

Devido à facilidade de obtenção dos resultados e a sensibilidade dos métodos, as aplicações analíticas e clínicas das reações bioluminescentes são extensas. Com simples fotômetros dotados de fotomultiplicadores comerciais, acoplados a computadores de pequeno porte, é possível desenvolver métodos práticos de medidas de luz (CAMPA; COLEPICOLO, 1995).

Em microbiologia para a verificação do ATP microbiano, um reagente de liberação química é usado para elevar a permeabilidade da membrana celular, permitindo a liberação de ATP no ambiente. A enzima que foi purificada é então adicionada na reação com ATP para produção de luz, que geralmente indica a presença de vida bacteriana e está relacionada com a quantidade de ATP presente, que dependerá do número de organismos vivos na amostra. A luz é detectada por um luminômetro, ou instrumento designado especialmente para medir o aumento do nível de luz medida e reportada em URL (Unidade Relativa de Luz) (NIELSEN; VAN, 1989).

O valor de 1 URL (Unidade Relativa de Luz) é somente significativo quando relacionado à concentração de ATP. Essa relação deve ser estabelecida para cada análise da enzima luciferina-luciferase e comparada com o padrão (NIELSEN; VAN,

1989). A reação é simples podendo detectar uma contagem de aproximadamente 10^4 UFC/ml ou g do produto (REYES; FLORES, 2000).

Inicialmente, o método de ATP-bioluminescência foi previamente usado para indicar a viabilidade de microrganismos e a biomassa em estudo ambiental, conforme pesquisa realizada por JIMENEZ (2001a). O método é amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, medicamentos e cosméticos. Entre os inúmeros usos destacam-se a avaliação de limpeza em equipamentos, superfícies industriais; análises da qualidade microbiana de matérias-primas e produtos, assim como ferramenta que auxilia na prevenção de riscos e segurança dos produtos alimentícios APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) conhecida como HACCP (*Hazard Analysis Control Point*).

Existem atualmente instrumentos analíticos automatizados para a enumeração/indicação de microrganismos e testes comerciais para identificação de patógenos, usados principalmente na avaliação da qualidade de alimentos, e que tem substituído o método convencional. Com embasamento semelhante ao método tradicional, são usados para a detecção rápida e identificação de grupos de microrganismos indicadores, microrganismos patogênicos, toxinas e micotoxinas, bacterianas e de fungos. Os testes atendem requisitos como precisão, sensibilidade, especificidade, oferecendo resultados em até 24 horas, facilidade de aplicação e rapidez. Também oferecem a possibilidade de acoplamento com computador, redução de custo e recuperação rápida do investimento (ZEE; VELD, 1997).

A aplicação de métodos rápidos para avaliação de contagem de microrganismos viáveis pelo método de bioluminescência reduz não somente o tempo de teste mas também o volume de trabalho, diminuindo custos e trazendo benefícios para empresas que necessitam de liberação rápida de seus produtos, podendo representar a substituição dos métodos clássicos com confiabilidade (JIMENEZ, 2001b ; MORRIS,1998).

2.6.1 Uso do método para monitoramento ambiental e controle de limpeza e sanitização de equipamentos

Existem equipamentos de bioluminescência que podem ser usados para determinar a carga microbiana após a limpeza e sanitização na indústria. Odebrecht et al (2000) avaliaram sistemas de bioluminescência empregados em diferentes etapas de sanitização em *CIP* "Cleaning In Place", onde a quantidade e a temperatura da água, o tempo de sanitização e a concentração do sanitizante foram controlados nos tanques de fermentação de uma cervejaria. Verificaram se existia possível correlação da bioluminescência com as contagens microbiológicas e a matéria orgânica, e analisaram se essa metodologia poderia ser recomendada na avaliação da eficiência no processo *CIP*. Após os estudos, concluíram que não é possível observar a correlação entre a bioluminescência e a quantidade de microrganismos, ou seja, não houve correlação entre o aumento da UFC/ml (Unidade Formadora de Colônias) e a URL (Unidade Relativa de Luz). A bioluminescência empregada pode ser utilizada para monitorar a sanitização em termos de matéria orgânica no *CIP*, embora não seja possível inferir o nível de

contaminação microbiana pelo número de URL (Unidade Relativa de Luz) obtidos (ODEBRECHT; SCHMIDT; FRANCO, 2000). Para monitoração de equipamentos, esse método pode ser usado após a limpeza e a sanitização como uma medida de verificação de contaminação microbiana e de produtos orgânicos residuais que dificultam a ação dos sanitizantes. Portanto, é possível verificar antes do uso, se os equipamentos estão dentro dos padrões de limpeza estabelecidos e quais são os procedimentos necessários (ORTH ;1998).

A razão para encontrar a correlação entre a Unidade Relativa de Luz e Unidade Formadora de Colônia está na limitação do método em medir o ATP, podendo ser de diversas origens; embora seja realizado um controle do teste para detecção do mesmo, pode-se medir o ATP de microrganismos mortos ou organismos maiores. Outra razão é a existência do limite máximo de quantificação microbiano de 10^4 UFC/ 100mL portanto, se existir uma contaminação maior que esse valor, não será possível fazer a correlação entre a contagem microbiana e as medidas de URL (Unidade Relativa de Luz) (LARSON, et.al., 2003).

Esses monitoramentos, são também usados em indústria de alimentos, no processamento de embutidos, carnes e leite. A eficiência dos procedimentos de higienização das superfícies dos equipamentos, utilizados no processamento de embutidos foi avaliada por meio da técnica de ATP-bioluminescência, mediante emprego de conjuntos de reativos e contagem global de microrganismos em placas, de acordo a "American Public Health Association". Oliveira et al (1998) selecionaram oito equipamentos utilizados na rotina: mesa de manipulação, serra elétrica (superfície horizontal), carro de transporte de carnes, cuba plástica, moedor,

misturador, semi-embutadeira e embutadeira. As amostras foram coletadas após a higienização e antes de iniciar o trabalho nos oito equipamentos. Os procedimentos de limpeza incluíram a remoção de resíduos com detergentes clorados, seguidos de enxágüe simples com água à temperatura ambiente. O monitoramento foi realizado com swabs amostradores e um luminômetro portátil, fácil de operar e transportar, utilizado diretamente na planta processadora. O swab foi aplicado na superfície a ser amostrada e posteriormente, introduzido dentro de um tubo contendo os reativos necessários para o teste. Após alguns minutos, a intensidade de luz produzida foi determinada no luminômetro (FRANCO, 1999).

O potencial de transmissão da *Escherichia coli* O157:H7 em equipamentos usados para trituração de carnes e a inativação das células durante a limpeza e sanitização foi pesquisada, por meio da inoculação de *E.coli* O157 nas mesmas quantidades, em amostras de carnes que sequencialmente foram trituradas em equipamentos de aço inox. Estes foram limpos manualmente com detergente neutro e após enxágüe foram sanitizados com diferentes sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético em iguais concentrações. As amostras foram analisadas por meio da técnica de plaqueamento por profundidade e o enriquecimento foi realizado em meio de Caldo Caseína Soja (*TSB = Tryptic Soy Broth*). Foram detectados crescimentos por meio das duas técnicas (plaqueamento por profundidade e ATP-bioluminescência) após a limpeza e a sanitização dos equipamentos, indicando que as células de *E.coli* O157 mesmo em contato com diferentes sanitizantes, permanecem na superfície dos equipamentos. Os resultados indicaram que os procedimentos para limpeza e sanitização devem ser revistos, a concentração do agente sanitizante deverá ser elevada e posteriormente deverá ser realizada nova

validação para estabelecer os critérios de uso dos equipamentos seguros (OTERO,1998).

Na indústria cervejeira o método é usado para monitoração rápida de limpeza e sanitização de equipamentos, principalmente de tanques de armazenamento e enchedoras. Os resultados permitem uma ação rápida e uma melhor escolha do agente sanitizante. Conforme o *European Council Directive 92/46*, a validação do sistema para verificar a limpeza e a desinfecção na indústria cervejeira e de leite devem ser validados e um dos métodos autorizados é o de ATP-bioluminescência (ORTH, 1998).

Após a comparação da técnica de bioluminescência e de contagem em placas, ambas podem ser utilizadas para a avaliação da eficiência da higienização de equipamentos (OLIVEIRA et.al, 1998). Larson et.al (2003), assim como outros autores; mencionaram que o método de ATP pode ser amplamente usado para a medida total do nível de limpeza dos equipamentos, presença de material orgânico, mas não é possível correlacionar com o número de microrganismos da contaminação microbiana UFC/cm² com URL/cm².

Na última década, o uso da ATP-bioluminescência para monitoração de superfícies após limpeza e sanitização foi amplamente difundido, por ser um método que promove em tempo real, o total estimado da contagem de microrganismos para superfícies de equipamentos, incluindo a presença de material orgânico e contaminação microbiana. A habilidade em obter resultados em alguns minutos, oposto ao teste tradicional de plaqueamento que demora dias trouxe melhorias e

adequação, indicando o uso desse método como monitoração dentro do programa de gerenciamento da qualidade, auxiliando a validação do método de limpeza e sanitização. Verificou-se que em alguns equipamentos, principalmente em indústrias de alimentos, podem conter resíduos iniciais, com carga inicial (*bioburden*); devendo assim ser considerado para medida de controle o intervalo de valores e os limites críticos, especialmente quando existe a tendência de aumentar os valores esperados (DAVIDSON et.al, 1999).

Taverna et al. (1998) mencionaram que o método de ATP-bioluminescência é uma técnica promissora para o controle rápido de limpeza e sanitização dentro dos programas de melhoramento de qualidade higiênica resultando em uma mudança do sanitizante usado, melhor direcionamento de treinamentos de operadores e melhoria de tempo no processo .

2.6.2 Método ATP-bioluminescência para análise microbiológica de alimentos

As indústrias de alimentos precisam de um método mais rápido para a determinação da carga microbiana nos produtos alimentícios. Microbiologistas de alimentos examinam alimentos para determinar o número ou indicadores de esporos, microrganismos que indicam a qualidade do produto no tempo de prateleira e a ausência de organismos patogênicos para garantir a segurança do consumidor. Baseados neste princípio, a demora dos resultados convencionais, e a exigência de muito trabalho para o preparo, tempo prolongado e custo elevado promoveram o estímulo para desenvolvimento de técnicas alternativas (ZEE; VELD, 1997).

Como o método de ATP-bioluminescência tem sido usado por ser rápido e preciso e um recurso para medida de carga microbiana durante e após processamento de alimentos e bebidas, ideal para monitoração de produtos que necessitam de liberação rápida, principalmente aqueles que podem trazer maior risco quanto à segurança do consumidor (SIRAGUSA et al., 1996) .

No processamento de aves e carnes a preocupação para a indústria é a segurança microbiológica desses produtos, onde são usados métodos tradicionais para a identificação dos níveis de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes e coliformes fecais e a incidência de espécies de bactérias patogênicas. Esses testes requerem de 16 a 36 horas para obtenção dos resultados. Todavia, a contagem da carga microbiana em carne de animal e carcaça de aves durante processo em tempo real é uma medida proativa para correção de desvios, resultando em tomadas de ações que garantam a segurança desses alimentos (SIRAGUSA et al., 1996).

Ukuku (2001) utilizou a técnica para estimar a contagem total da microflora na superfície de frutas (melões tipo *cantaloupe*) após o tratamento com antimicrobianos e comparou a reação de bioluminescência com a contagem através de plaqueamento por profundidade. Os melões foram lavados com água e tratados com solução de hipoclorito de sódio (1.000 mg/litro) ou peróxido de hidrogênio (5%) por 5 minutos. Os resultados indicaram diferenças dos níveis de detecção de ATP por cm² após a lavagem com água e após o tratamento com as duas soluções, verificando que havia aumento de ATP, resultante da contaminação existente nas frutas. Esses resultados foram comparados com obtidos em plaqueamento por meio

da técnica de *pour plate* e foi verificada uma correlação linear ($r^2=0.995$) antes da lavagem e do tratamento e após este valor passou ($r^2=0.990$). Foram submetidos à estocagem nas temperaturas de 20 °C e 4 °C por 120 horas, para medição de ATP e os resultados apresentados foram correspondentes ao anterior. A detecção limiar estabelecida usando a método de ATP-bioluminescência foi de $3 \log_{10}/\text{mL}$ que corresponde a $4 \log_{10}$ UFC/mL para plaqueamento. O método indicou ser eficiente por estimar rapidamente a carga microbiana total nos melões e em outras frutas, onde a população esperada pode exceder o limiar de segurança para consumo.

Takahashi et.al (2000) usaram o método de ATP-bioluminescência com a técnica de membrana filtrante, empregando a foto contagem com o método da microscopia fluorescente. Foi desenvolvida uma quantificação rápida de microrganismos contaminantes em produtos alimentícios, através da filtração, baseado no método de ATP-bioluminescência. Como a técnica não permitiu a identificação dos microrganismos, foram combinados outros métodos para descrever as espécies contaminantes. Foi observado que o sistema apresentou uma rápida detecção da morfologia das células dos microrganismos em curto período de tempo, porém não discriminou as microcolônias de outras partículas de tamanho reduzido, sendo fisicamente impossível observar várias amostras utilizando uma membrana filtrante de 47mm-diâmetro. Os autores consideraram que o método foi efetivo para a observação da morfologia dos microrganismos dentro dos limites mencionados. Para a validação da técnica descrita foram analisados fungos (bolores e leveduras) suspensos em água esterilizada com o volume padronizado e suspensão, contendo aproximadamente 20 células de cada microrganismos e procedeu-se à filtração através da técnica da membrana filtrante. As células filtradas foram medidas com o

equipamento de ATP-bioluminescência e após 24 horas, verificou-se a resposta em U.R.L (Unidades Relativas de Luz) e com auxílio da microscopia foram detectadas treze UFC/mL de fungos (bolores e leveduras). Devido à dificuldade de detecção rápida de fungos foi possível observar que não é possível usar a técnica de ATP-bioluminescência sem o auxílio da microscopia de fluorescência, que possuiu sensibilidade elevada e confere maior confiabilidade aos resultados. Esse sistema está sendo amplamente usado devido à observação direta das microcolônias.

Foram conduzidos estudos para a análise de hambúrgueres resfriados e congelados. Oitenta e uma amostras de hambúrgueres foram avaliadas pelo método ATP-bioluminescência, em comparação com a contagem por plaqueamento em profundidade. Os resultados apresentados estavam entre o intervalo de 10^4 a 10^9 UFC/g. O método de ATP apresentou resultados adequados e após ter sido validado foi a técnica escolhida, pois além de liberar os produtos em tempo menor, apresentou confiabilidade e reprodutibilidade de resultados, quando comparados com o método de plaqueamento (ABDULLAH et.al, 1992).

Wilkes (1991) descreveu a necessidade de monitoração no método asséptico de tomates processados para garantir a qualidade dos produtos. As indústrias necessitavam de monitoração rápida, pois são produzidos 3.600 galões de massa por hora. O método de ATP-bioluminescência foi usado para avaliar produtos em processo e produtos finais, garantindo resultados rápidos. Após quatro ou cinco horas foi possível obter um resultado parcial das massas antes do envase garantindo a segurança dos consumidores.

O método foi usado para estimar a quantidade de ATP proveniente de microrganismos em alimentos contaminados incluindo quinze espécies de bactérias Gram negativas, sete de bactéria Gram positivas e uma levedura; usando um equipamento para realizar a medição. Foi realizada a correlação entre URL (Unidades Relativas de Luz) provenientes da leitura no equipamento com solução salina e meio de cultura "Nutriente Broth". Os picogramas das leituras do equipamento de ATP-bioluminescência foram calculados baseados na curva padrão dos microrganismos em solução salina para as diluições seriadas das culturas em caldo nutriente. Após 24 horas, a relação linear foi obtida entre a quantidade de ATP e o número de microrganismos avaliados. Para as bactérias Gram negativas houve uma detecção elevada de *Escherichia coli* ATCC 11775. Com esse estudo foi concluído que o método de ATP-bioluminescência é rápido e útil para estimar o número total de microrganismos em alimentos, mas as floras das amostras devem ser identificadas posteriormente para verificação da existência de patógenos. Para a pesquisa de esporos bacterianos devem-se ter cuidados como por exemplo aumentar o tempo de incubação para posterior identificação (KODAKA, et.al, 1996).

Durante o processamento de leite e derivados, a concentração indesejável de microrganismos e outros metabólitos (lactose, nitrato e outros compostos) podem aumentar a contaminação dos equipamentos. Existem os microrganismos denominados de termoresistentes como o gênero *Streptococcus* (TRS) que atacam a superfície dos equipamentos em concentração de até 10^7 por cm^2 . Os TRS como são denominados não são completamente eliminados por meio do tratamento de pasteurização e crescem em equipamentos a temperaturas de 30-50 °C. Esses,

estão presentes no leite *in natura* e usado como matéria-prima para o leite pasteurizado e outros produtos. A temperatura ótima de crescimento desses microrganismos está no intervalo de 40-45 °C, no tempo de 10-15 minutos para regeneração. Um dos fatores que influenciaram a aderência e o crescimento desses microrganismos nos equipamentos foi às condições do processo como fluxo e temperatura.

Por meio da medida direta da concentração de microrganismos durante a produção, verificou-se onde e quando estava ocorrendo o aumento de contaminação, determinando a necessidade de limpeza e sanitização do equipamento. Para reduzir a monitoração dos *TRS* empregou-se o método de ATP-bioluminescência para verificação rápida dos resultados, que permitiu a detecção de níveis baixos de microrganismos, após a pasteurização de 10 segundos à temperatura de 65 °C. Embora o aumento de concentração de *TRS* foi observado pelo método de contagem por plaqueamento, não foi possível usá-lo para controle de processo, pois os resultados demoravam no mínimo 24 horas, enquanto que no da ATP-bioluminescência obtiveram-se os resultados em até 15 minutos. Outra vantagem da última técnica foi à medição da massa bacteriana ou partes de células, células vivas e/ou recentemente mortas em uma concentração de até 10⁵ UFC/ml, em 15 minutos (GIFFEL et.al,2001).

Ribeiro et.al (2000) por meio da comparação de técnicas para monitoração microbiológica da qualidade de leite, verificaram que o método de ATP-bioluminescência pode ser usado juntamente com controle de temperatura durante transporte e estocagem do mesmo, para verificação rápida na contagem total de

bactérias (*TBC*) e determinação e liberação de equipamentos após a limpeza e a sanitização. Os autores analisaram 348 amostras por meio da extração e medida de ATP bacteriano retido em um filtro após a filtração do leite (Protocolo A) e pela quantificação de bactérias presentes no leite pelo método de ATP, depois da extração anterior e da destruição de células somáticas após aquecimento (Protocolo B). Os resultados foram expressos em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) para *TBC*, e respectivamente, para medida de ATP, onde a Unidade Relativa de Luz (URL) foi transformada em logaritmo, para análise estatística de resultados, possibilitando uma possível correlação. Os resultados indicaram que o Protocolo A apresentou resultados mais precisos do que o Protocolo B, onde a introdução da filtração permitiu que a separação física do método entre bactérias e outras interferências físicas e químicas. A técnica foi então implementada para monitoração de rotina, baseada na rapidez e na facilidade do manuseio de equipamento, embora quanto à correlação feita, os autores mencionados que obtiveram resultados satisfatórios, pois o método permitiu a detecção de até 10^5 UFC/ml, limite determinado pela *Comissão do Codex Alimentarius (1997)*.

Considerando outros fatores, a indústria de bebidas lácteas necessita de liberação rápida dos produtos e garantir sua qualidade durante o prazo de validade ou tempo de prateleira (*shelf-life*). Por meio de um protocolo de validação, foi verificado que existia a correlação entre o método tradicional de plaqueamento e o método de ATP-bioluminescência para a pesquisa de psicotróficos e formação de esporos. Os resultados indicaram que após seis semanas de teste foi possível realizar a correlação entre os métodos, dentro de parâmetros verificados. Para a pesquisa dos esporos, o tempo de análise foi superior e, por este motivo, o método

foi empregado somente para a detecção de microrganismos psicotróficos (CORBITT,2000).

2.6.3 Uso do método para diagnósticos e hospitais

O *H.pylori* é um patógeno envolvido com problemas gástricos em humanos como úlcera no duodeno e gastrite. A dificuldade de detecção deste patógeno está relacionada com as mudanças da morfologia celular, metabolismo e a tendência de crescimento acontecer quando o mesmo é exposto a diferentes estímulos do ambiente. Em termos de transmissão, normalmente ocorre por meio de alimentos como água e carnes. Foram realizados vários estudos em técnicas diferentes e o ATP-bioluminescência apresentou bons resultados e quando presentes nas amostras de alimentos e água foram encontrados e posteriormente confirmados , o que auxiliou no diagnóstico dessa doença (VELASQUEZ,1999).

O método de ATP-bioluminescência foi usado para a detecção de bactéria em pacientes com quadro de infecção urinária. Os resultados dos testes foram comparados com culturas de microrganismos de referência, para avaliação semiquantitativa. Foram amostradas e realizadas 1.565 análises e após os testes, a técnica apresentou sensibilidade, especificidade e resultados falsos negativos abaixo de 2%, sendo realizada a validação do equipamento e aprovação para uso em centros médicos para resultados rápidos de exames (VELASCO,et.al,2002).

Malik et.al (2003) empregaram o método de ATP-bioluminescência em hospitais para validação do programa de limpeza e após auditorias, concluíram que este foi eficiente para monitoração de superfícies e diminuição dos riscos de transmissão de patógenos. O método foi utilizado combinado com a auditoria, para a redução de contaminação microbiana e custos e como ferramenta para prevenção de infecções hospitalares.

2.6.4 Uso do método em programas de qualidade

Considerando os programas de *HACCP* (*Hazard Analysis Critical Control Point*) ou APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) sistema de qualidade utilizado pela indústria alimentícia para a identificação de possíveis riscos e pontos críticos nas etapas de fabricação, no monitoramento de condições sanitárias dos equipamentos empregados na produção e embalagem a técnica de ATP- bioluminescência oferece a vantagem da resposta rápida de um possível ponto crítico e tomado de ações corretivas em tempo real (OLIVEIRA et al., 1998).

Por definição, *HACCP* é metodologia sistemática de identificação, avaliação e controle de perigos possíveis, antes que os mesmos ocorram, e tem sido reconhecido como o meio mais eficiente para garantir a segurança dos alimentos. O controle de cada etapa é uma medida preventiva. Para implementação do sistema, é necessária a monitoração das etapas do processo em tempo real ou próximo deste para tomar medidas proativas na correção da etapa do processo que estiver fora de controle. Os sete princípios do *HACCP* muito empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticos são descritos a seguir:

- identificar os perigos de cada etapa do processo;
- identificar os pontos críticos de controle (PCC);
- estabelecer limites críticos para controle do PCC;
- estabelecer procedimentos de monitoramento;
- estabelecer ações corretivas;
- estabelecer procedimento de registro;
- estabelecer procedimentos para identificação (SBCTA, 1995).

Hayes (1997) utilizou o método de ATP-bioluminescência para contribuir com o *HACCP*, garantindo a segurança dos alimentos, empregando parâmetros estatísticos para monitoração e avaliação de pontos de controles na fábrica. Estabeleceu limites de alerta e ação a partir dos valores de URL (Unidade Relativa de Luz) para cada área, com resultados rápidos e ações diferenciadas nos diversos setores para prevenir futuros problemas de contaminação.

2.6.5- Outras aplicações da técnica

Lehtola et.al (2004), usou a método de ATP-bioluminescência para quantificação de biofilmes, após sua remoção de equipamentos de aço inox e polipropileno em uma usina de leite. Após a aplicação de ultra-som em condições de testes (10s and 40kHz), foi possível analisar o resíduo dos tanques de aço inoxidável; ou seja o biofilme composto de células procariontes, incluindo várias espécies de bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Por meio do

método de ATP-bioluminescência e de *swabs*, os biofilmes removidos foram quantificados e comparados os resultados dos dois métodos para validação de limpeza industrial. O primeiro método foi adotado por ser rápido e confiável para monitoração dos equipamentos após limpezas e sanitizações.

O método foi também empregado para determinar os níveis de bactérias em piscinas públicas na cidade de *Washtenaw County, Michigan (E.U.A)* e avaliação dos riscos de saúde dos usuários visando à prevenção. As autoridades de saúde utilizaram o método para comparação e obtiveram resultados rápidos auxiliando-os no ajuste das doses dos agentes desinfetantes. Realizando testes em paralelo com o método de plaqueamento por profundidade, e após validação através da inoculação de amostras e posterior contagem para comparação, concluiu-se que o método pode ser uma alternativa para a avaliação da qualidade da água de piscinas antes de sua abertura (LEE,2001).

Contudo a extração e detecção para enriquecimento das amostras em laboratório, requerem um intervalo de tempo prolongado para o procedimento. As amostras foram testadas usando o ensaio de ATP-bioluminescência para determinação da contagem de biomassa microbiana em diferentes matérias-primas e produtos estéreis, para a detecção e identificação microbiana. Suspensões de produtos farmacêuticos foram analisadas para teste esterilidade em intervalos 3,7 e 14 dias. O método apresentou uma alternativa objetiva para a visualização do ponto final comparando com o teste padrão de esterilidade para a determinação do total da biomassa microbiana em curto período de tempo (JIMENEZ,2001b).

A água é a matéria-prima mais comum em cosméticos e formulações farmacêuticas e foi uma das principais causas de recolhimento de produtos do mercado devido à contaminação microbiana. A avaliação rápida da qualidade da água empregada para cosméticos e indústrias farmacêuticas é muito importante. Por meio do método de ATP-bioluminescência, pesquisadores obtiveram resultados em 24 horas, e para a comparação e validação foi relacionada à quantidade de UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia) com os valores obtidos na técnica de filtração. Os resultados foram sensíveis e rápidos e o processo automatizado. Embora, não tenha sido possível realizar a qualificação dos microrganismos presentes nas amostras; o teste pode ser usado por ser um indicador rápido em algumas etapas junto aos testes de identificação de patogênicos (JIMENEZ,2001b).

Em Paris, um dos métodos usados para monitoração da qualidade da água pela *SAGEP (Société Anonyme de Gestion de Eaux de Paris)*, empresa responsável pela distribuição de água em Paris é o de ATP-bioluminescência, devido à monitoração rápida da qualidade microbiológica, promovendo resultados simples e rápidos. O equipamento contém um micro luminômetro, sendo as amostras adicionadas em pequenas doses de reagentes e filtradas. A quantidade de luz emitida é comparada com aquela inicialmente presente, por meio do tempo da reação enzimática do ATP e do complexo luciferina-luciferase (componentes do reagente e enzima). Pode ser usado como um alarme para o sistema quando eventualmente ocorrer uma contaminação microbiológica (DELAHAYE, et.al, 2003).

Marino (2000) realizou um estudo comparativo para quantificação dos microrganismos presentes na água usada na fabricação de produtos farmacêuticos,

empregando o método de ATP-bioluminescência e a técnica de membrana filtrante. Por meio do uso de culturas puras de *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, verificou a precisão, reprodutibilidade e linearidade das duas técnicas propostas. Durante um mês, as análises foram realizadas e os resultados comparados, e também foi possível recuperar os microrganismos nas duas técnicas apresentando-se estatisticamente iguais. Como vantagem, o método de ATP-bioluminescência pode detectar os microrganismos em 24 horas, enquanto que por meio da técnica de membrana filtrante apenas foi possível detectá-lo em 72 horas. Paralelos a esse estudo, foram isolados pelas duas técnicas os microrganismos *Ralstonia pickettii*, *Bacillus sphaericus*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus species*, em amostras de água mostrando que são equivalentes.

A indústria de cosméticos utiliza novas matérias-primas rotineiramente para acompanhar a evolução dos produtos e do mercado. Existe a necessidade destas serem testadas quanto à contagem microbiana. Como já comentado, o método tradicional requer cinco a sete dias para fornecer resultados completos, que significa custo elevado em retenção de inventário, pois devem ficar armazenadas, aumentando o volume de estoque aguardando liberação, portanto, a indústria precisa de métodos rápidos e mais automatizados de análise (MORRIS,1998).

O método de ATP-bioluminescência pode ser aplicado para análises de matérias-primas em geral e produtos cosméticos após ter sido submetido à validação. A metodologia oferece garantia de sensibilidade para detecção de microrganismos, por meio da medida de luz emitida quando ocorre a reação de bioluminescência com a enzima luciferase capaz de detectar 1 UFC, além de

possuir eficiência e custo reduzido (MORRIS,1998). Usando dois injetores, o sistema Celsis® lisa as células seguindo por adição de reagente que permite a redução do tempo e resultado em 24 horas. O sistema pode fornecer informações sobre a quantidade de microrganismos, mas não permite sua identificação dos microrganismos, uma vez que todos possuem ATP (JIMENEZ,2000).

2.6.6 Adaptações do método de ATP-bioluminescência

Existem algumas matérias-prima que podem inibir a reação do ATP, como pigmentos, corantes, tensoativos aniônicos e catiônicos, interferindo na reação de bioluminescência (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989). Devido ao grande uso dessas matérias-primas principalmente na indústria de produtos cosméticos, os métodos alternativos para análise da qualidade microbiológica devem ser usados. Entretanto, uma matéria-prima de origem orgânica pode conter ATP não microbiano podendo extinguir o sinal de luz emitida no equipamento. Alguns parâmetros são importantes como: a escolha do meio de cultura , o valor de pH das matérias-primas e dependendo desta ela poderá favorecer ou não o crescimento de microrganismos. Esses problemas podem ser resolvidos, incluindo o enriquecimento do meio de cultura de escolha, procedente de incubação e reagentes para a detecção de microrganismos (MORRIS, 1998).

Os tensoativos aniônicos sulfatados, principalmente o lauril sulfato de sódio, são muito usados em indústrias de higiene pessoal e cosmético. No entanto, na análise de produtos por método de bioluminescência que contenham em sua formulação esses componentes, é necessária a verificação da possível inibição da

reação enzimática, produzida por esses tensoativos. Com o aumento da sensibilidade da técnica por meio da modificação da metodologia analítica, pode-se adicionar um agente capaz de bloquear de forma efetiva a inibição produzida por estes compostos. Esse agente deve ser adicionado depois do enriquecimento das amostras e antes da reação de bioluminescência para não interferir no crescimento microbiano. A substância adicionada deve cumprir alguns requisitos, ser catiônica, capaz de formar complexos com a substância aniônica, ser solúvel em água e não interferir na reação de luciferina-luciferase (LERANOSZ et. al, 2001).

Leranosz et.al (2001), com intuito de reduzir essas interferências, preparou um protocolo geral de diluição dos tensoativos aniônicos de 0,1g/mL de produto em 9,9mL de meio de cultura *Letheen Broth*, seguido da incubação à temperatura de 32 °C, com agitação por 18 a 24 horas. Este período prévio de enriquecimento permitiu detectar níveis reduzidos de microrganismos na amostra inicial, em uma mesma diluição do produto. Foi adicionado cloreto de benzalcônio e benzetônio estéreis que permitiram o aumento da resposta intensidade luminosa, proporcionando a resposta da reação enzimática. Comparando o meio de cultura empregado (*Letheen Broth*) em relação à água, a reação foi inibida em aproximadamente 80%. Segundo alguns autores, pode ter ocorrido efeito inibitório de alguns dos compostos do meio de cultura, como a lecitina de soja e o polisorbato 80, que atuaram como inativadores dos sais de amônios quartenários, que verificado pelo valor de absorbância o mesmo comprimento de onda usado no ensaio de bioluminescência. O cloreto de benzetônio no meio de cultura proporcionou resposta analiticamente confiável na presença de ATP inibindo a ação dos tensoativos aniônicos.

Ignar et al. (1997) pesquisaram e usaram o método de ATP bioluminescência para otimização da validação da detecção da presença de microrganismos contaminantes em formulações de dentifrícios com triclosan. As suspensões dentifrícias foram inoculadas com bactérias, fungos e leveduras. Todos esses microrganismos foram detectados dentro de 24 a 27 horas após período de incubação usando o meio de cultura *TAT* enriquecido. O meio estudado continha diferentes concentrações dos seguintes ingredientes: polissorbato 80 (tensoativo), neopeptona, dextrose, *Triton*® X-100, tiosulfato de sódio, fosfato dibásico sódio e glicina. Em geral, todos os caldos enriquecidos testados e a suspensão da amostra demonstraram menor ATP endógeno e não inibiu o efeito do ATP na reação de bioluminescência. Para a validação do ensaio de Celsis ATP bioluminescência, adiciona-se vários níveis de diferentes tipos de microrganismos para 1% da suspensão de dentifrício para detectar o crescimento microbiano. Após 24 horas do período de incubação, bactérias e fungos contaminaram a suspensão com triclosan em meio de cultura *TAT* com 4% Polisorbato 80. Contudo *A.niger* não foi detectado após 48 horas. Para redução do tempo de detecção desse fungo, um novo caldo de enriquecimento foi formulado com a adição de dextrose, neopeptona, e tiosulfato de sódio. Resultados dos testes demonstraram que a contaminação foi detectada dentro de 27 horas do período de incubação. Portanto, a adição de nutrientes como a dextrose, neopeptona, ingredientes conhecidos para isolar e cultivar fungos e o meio de cultura *TAT* com 4% polissorbato 80, promoveu o crescimento do fungo e o tiosulfato de sódio promoveu a neutralização do agente antimicrobiano através da inibição química.

Os mesmos autores realizaram o mesmo ensaio, usando o meio de cultura *Rbroth*® (TAT com 4% de polisorbato 20, 1% neopeptona, 1% dextrose e 0,25% de tiosulfato de sódio). Ocorreu crescimento em 24 horas de detecção os microrganismos *C.albicans*, *A.niger* e *P.aeruginosa*. Contudo, o *S.aureus* não foi detectado dentro de 48 horas, explicado pelo valor da concentração mínima inibitória deste para *S.aureus*, indicando ser necessário à neutralização do triclosan antes da realização do teste. Para melhorar a recuperação de *S.aureus*, diferentes meios de cultura foram analisados. O *Rbroth*® foi modificado por *MR (Modified R)* e continha polissorbato 20 a 10% e adicionou-se 1% de *Triton*® X-100, 1% de glicina, 0,5% de fosfato dibásico sódio, 1% de neopeptona, 1% de dextrose, 0,5% de tiosulfato de sódio. O *Triton*® X-100 promoveu a neutralização do sistema conservante e a glicina por isolar e cultivar o *Staphylococcus spp.* nos meios *Vogel Johnson* e *Baird Parker*. Os resultados dos testes do dentríficio com triclosan na suspensão de dentífrico em meio de cultura *MRBroth* promoveram a detecção de *S.aureus* após 27 horas de incubação. Considerando a diferença da composição química do meio de cultura, podemos concluir que a otimização do teste de ATP-bioluminescência é possível com a modificação contínua dos meios de cultura para detecção da contaminação microbiana (IGNAR et. al, 1997).

Foram realizados dois ensaios diferentes para detecção de fungos após 24 horas de incubação da amostra de creme dental em meio de cultura. Os esporos de *Penicillium expansum* (ATCC 1117) foram incubados em concentração menor que 100 UFC transferido para 10mL de meio de cultura *Letheen Broth (LB)* a 25°C por 24 horas. Seguindo o mesmo procedimento anterior; foi inoculado um número reduzido de esporos para verificar a capacidade de detecção em diferentes tipos de

ensaios. Após o enriquecimento em meio de cultura *Letheen Broth*, foram inoculados esporos de *P.expansum* na amostra de creme dental. Como controle negativo foram usados meio de cultura *LB* e creme dental (estéril). Após o ensaio, foram removidos 0,75mL para 10mL de meio de cultura enriquecimento, incubado por 24 horas e transferido ao luminômetro. A leitura foi realizada em URL (Unidade Relativa de Luz). Com uma outra amostra no volume 0,15mL do caldo de enriquecimento após ensaio e incubação de 24 horas foram adicionados os reagentes e 0,15ml da amostra foi transferida para as cubetas no equipamento e feita a leitura no equipamento (MEIGHAN et. al, 1997).

Os resultados apresentados para o primeiro ensaio foram inconsistentes na leitura, devido à natureza dos esporos do fungo, mas para a amostra com o volume diluído, o resultado foi adequado quanto à precisão. A diluição do volume permitiu o crescimento homogêneo do fungo e a distribuição da enzima durante o enriquecimento do meio. O método detectou quatro tipos de esporos em 24 horas, em níveis reduzidos de aproximadamente 10 a 100 esporos, após inoculação do creme dental detectou-se o crescimento de 10 esporos. Portanto, o tratamento da amostra foi relevante à detecção desse fungo, pois o ensaio permitiu o seu crescimento em 24 horas, sendo consistente e sensível à detecção (MEIGHAN et .al, 1997).

Estudos indicaram que o efeito da temperatura, luz e valor de pH são importantes para o crescimento de fungos empregando o método de ATP-bioluminescência. A relação encontrada no estudo correlaciona a biomassa com a bioluminescência. Alguns fungos possuem bioluminescência natural. Os resultados

encontrados estão relacionados com as exigências de cultivo para otimizar o crescimento (WEITZ et.al.,2001).

Tanaka et al.,1997 usaram a técnica para detecção rápida de coliformes em água e alimentos, empregando a modificação do meio de cultura *Desoxychocolate Agar Plate*, utilizado para detecção de coliformes. Inicialmente este interferiu na reação de bioluminescência, mas por meio da modificação de sua composição, adicionando caseína , foi possível empregar a metodologia.

O método de ATP-bioluminescência permitiu a detecção de bactérias e fungos e dependendo do produto, exigirá adequação dos meios de culturas utilizados com acréscimo de nutrientes para a liberação mais rápida de matéria-prima e produtos.

2.7 Método de ATP-bioluminescência utilizando o equipamento Celsis® Optcomp Advance.im

No método de ATP-bioluminescência, as amostras que apresentam contaminação são automaticamente lisadas para liberar o ATP microbiano. A concentração deste ATP contribui na análise da amostra e é medida pela enzima que controla a bioluminescência na reação da luciferina-luciferase ATP. (IGNAR et al., 1996).

A purificação e o fornecimento da enzima luciferase é realizada pelo fornecedor do equipamento para promover estabilidade, sensibilidade de detecção

dos níveis de contaminação. Para isolar o ATP, um reagente de liberação química é empregado a fim de elevar a permeabilidade da membrana celular. Assim, esta enzima purificada é adicionada na reação para a produção de luz. Esta geralmente indica a presença de bactérias e a proporção da quantidade de ATP presente depende do número de microrganismos na amostra. A luz é detectada por um luminômetro sensível, fotomultiplicada com no mínimo dois injetores automáticos ou instrumento designado especialmente para medir o aumento do nível de luz medida e reportada em URL (NIELSEN and VAN, 1989).

As matérias-primas e os produtos cosméticos podem conter componentes comuns como tensoativos, agentes emulsificantes, corantes, perfumes e conservantes, que afetam os resultados das análises e a atividade da enzima luciferase. Assim, os reagentes fornecidos minimizam os possíveis interferentes da formulação, maximizando a emissão de luz para ATP microbiano (CELSIS, 1998).

Outros tipos de reações diferentes que também exigem ATP, ocorrem em insetos luminescentes, (como nos vagalumes da família *Lampyridae*). A forma reduzida da luciferina combina com ATP na presença de luciferase para formar um complexo luciferil-adenilate. Esse complexo, então, se decompõe para produzir a luciferina oxidada, gás carbônico e luz no comprimento de onda máximo de 560 nm (KRICKA, et.al., 1984).

Princípio da Medida de ATP

Figura 2.2 Reação de bioluminescência no equipamento (CELSIS,1998).

Um dos equipamentos disponíveis no mercado é Celsis® que distribuem reagentes específicos. O LuminEX™ é o primeiro reagente a ser injetado automaticamente no equipamento para iniciar as análises, após incubação de 24 horas das amostras, promovendo a lise dos microrganismos quando presentes nas amostras. O reagente Celsis LuminATE™ é então injetado e a luz produzida é medida por meio do instrumento em URL (CELSIS,1998). O procedimento para análise envolve o enriquecimento das amostras, retiram-se alíquotas e transfere-se para cubetas localizadas no equipamento (Luminômetro) e programa-se a adição dos reagentes. O primeiro reagente, *LuminEX*™ é denominado de liberador de ATP

e vai liberar as células microbianas presente. O reagente de bioluminescência (*LuminATETM*) é então adicionado, reagindo com o ATP e gerando o sinal claro de detecção pelo Luminômetro, apresentando a leitura em URL (Unidades Relativas de Luz) conforme mostra a FIGURA 2.2(MORRIS,1998).

O reagente *LuminATETM* reage com o ATP da amostra e gera o sinal adequado para detecção do equipamento, deve ser usado à temperatura no máximo de 25 °C e depois de aberto deverá ser consumido em três dias e quando estocado na temperatura de 2 a 8 °C , para manter a sua integridade e não interferir nos resultados dos testes como falso negativo. O reagente *LuminEXTM* , responsável pela lise e extração do ATP nas células microbianas, é passado por espectro ultravioleta para confirmação da concentração do componente antes de ser liberado. O reagente de ATP Controle Positivo é reconstituído com tampão (*Buffer*) onde é verificado se o valor de pH e a concentração de ATP (CELSIS,1998). O prazo de validade antes de ser aberto é de 12 semanas. A Figura 2.3 mostra exemplos de reagentes.

Figura 2.3 Reagentes usados no equipamento (CELSIS,1998).

Figura 2.4 Equipamento Celsis Optcomp Advance.Im., parte externa e dispositivo para amostras (Celsis,1998).

Com o equipamento Celsis® Optcomp Advance.im. (ver figura 2.4) é possível à detecção de níveis reduzidos de até $<10\text{UFC/g}$ (MORRIS, 1998).

Porém, o equipamento deve ser mantido a temperatura entre 20°C e no máximo 25°C , pois acima dessa temperatura o luminômetro e o reagente enzimático poderão sofrer alterações devido à influência da temperatura (CELSIS,1998).

Após a fase de enriquecimento e da incubação das amostras por 24 horas, o tempo gasto por análise é de aproximadamente dois minutos (NIELSEN and VAN DELLEN,1989). O custo por análise considerando todas as etapas , materiais e reagentes fica em torno de U\$2,65 (CELSIS,1998).

A Figura 2.5 a seguir, mostra a planilha do programa onde são inseridos os dados de leitura em URL das amostras após serem analisadas pelo equipamento. (CELSIS,1998)

Sample ID	Date	Sample Name	Sample Type	Status	Result	Multi-Read
1	1	b-mal	1	Committed	b-mal	
2	2	b-mal	1	Committed		
3	3	b-mal	1	Committed		
4	4	b-mal	1	Committed		
5	5	b-mal	1	Committed		
6	6	b-mal	1	Committed		
7	7	b-mal	1	Committed		
8	8	b-mal	1	Committed		
9	9	b-mal	1	Committed		
10	10	b-mal	1	Committed		
11	11	b-mal	1	Committed		
12	12	b-mal	1	Committed		
13	13	b-mal	1	Committed		
14	14	b-mal	1	Committed		
15	15	b-mal	1	Committed		

Figura 2.5 Planilha programa no qual são inseridos os dados de leitura das amostras (Celsis,1998).

2.7.1 Qualificação do equipamento

Para que o equipamento possa ser usado com segurança deve ser realizada a qualificação do mesmo, as etapas que envolvem são:

- Qualificação de Projeto (QP),
- Qualificação de Instalação (QI) e
- Qualificação operacional (QO).

A Qualificação de Projeto (QP) é a fase onde se verifica a documentação técnica que o fornecedor do equipamento oferece, e se a mesma atende aos conceitos e requisitos do usuário. Essa fase é importante pois é possível verificar as

necessidades e fazer a adequação do projeto. A Qualificação de Instalação (QI) é a etapa onde se verificam se as instalações atendem aos requisitos do projeto, para produção de registros que comprovem a qualificação. Nesta fase é importante à verificação do local onde o equipamento será instalado, envolvendo sala limpa classe 10.000 ou próximo ao fluxo laminar. Os sistemas de computação que serão acoplados ao equipamento devem ser verificados e testados para evitar problemas na etapa de Qualificação de Operação (QO).

A etapa subsequente refere-se à Qualificação da Operação (QO), onde é verificado se ocorre o cumprimento das etapas anteriores, ou seja verifica-se se as instalações e os sistemas atendem aos requisitos operacionais e também as funções pré-definidas no projeto. Nessa fase a atividade é documentada para comprovar que o equipamento e as instalações atendem e cumprem a função desejada (CELSIS, 1998).

2.7.2 Testes preliminares para o uso do método de ATP-bioluminescência

Considerando os produtos cosméticos, como por exemplo, xampu e condicionador possuem difícil detecção pelo método da bioluminescência, pois contém componentes com tensoativos, corantes, perfumes e conservantes, que podem afetar os resultados das análises interferindo na atividade da enzima luciferase, como anteriormente relatados. O equipamento possui reagentes que visam minimizar essas interferências e maximizar a emissão de luz proveniente de ATP microbiano, e por conseguinte obter um ensaio rápido, reprodutível e confiável (RIBEIRO et. al., 1998).

O método inclui o enriquecimento da preparação e a neutralização do conservante da fórmula, permitindo assim que muitos microrganismos contaminantes venham multiplicar-se. O meio de cultura, os componentes dos produtos e a diluição de conservantes não podem interferir na reação final de bioluminescência (JIMENEZ,2001a).

Durante a avaliação e validação do método para análise bacteriana de matérias-primas, algumas etapas são necessárias :

- submeter as matérias-primas ao teste de neutralizante ou a um processo esterilizante para evitar que os conservantes presentes nas matérias-primas não interferiram na análise;
- verificar se a matéria-prima ou o produto selecionado tem ATP não microbiano, que pode inibir a reação de bioluminescência (Efeito da Amostra);
- selecionar o meio de cultura para enriquecimento;
- aplicar o método para especificação da matéria-prima;
- testar as matérias-primas líquidas a fim de determinar a sua hostilidade em relação aos microrganismos (teste de desafio) quando necessário;
- determinar o limite mínimo de detecção ou recuperação dos microrganismos ;
- realizar a análise comparativa do método de bioluminescência com o método padrão de plaqueamento para sua validação.

2.7.3 Teste de neutralização

O método de ATP-bioluminescência inclui o enriquecimento da preparação e a neutralização do conservante da fórmula, permitindo assim que muitos microrganismos contaminantes venham multiplicar-se. O meio de cultura, os componentes dos produtos e a diluição de conservantes não podem interferir na reação final de bioluminescência (JIMENEZ,2001a).

Para realizar o teste de neutralizante, deve-se adicionar quantidades estabelecidas de microrganismos padrões nos materiais avaliados como:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,
- *Escherichia coli* ATCC 8739,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027,
- *Burkholderia cepacea* ATCC 25416,
- *Candida albicans* ATCC 10231.

Cada microrganismo citado é inoculado normalmente a 10^4 UFC/g nos materiais avaliados, verificando-se por meio da contagem em placas se ocorre à neutralização do sistema conservante e a razão deverá estar no intervalo de 50 a 150%, conforme cálculo da razão :

$$\frac{VC \times 100}{CP (A + D)}$$

Onde: VC = Valor de contagem da amostra
 CP = Controle positivo
 A = Amostra
 D = Diluente

Caso isso não ocorra, temos a indicação que o meio de cultura não foi capaz de neutralizar o conservante da amostra, sendo necessário testar a amostra com outros meios de culturas e adicionar os componentes necessários para sua neutralização.

Para as amostras que receberem tratamento esterilizante, não é necessário realizar esse teste, faz-se a análise da carga microbiana antes e após a esterilização (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989).

2.7.4 Efeito da Amostra

As amostras podem apresentar ATP não microbiano que pode ser originado de componentes de naturais e por meio do teste de Efeito da Amostra, pode-se verificar se há presença desse ATP que poderá interferir na leitura da amostra (MORRIS, 1998).

Para determinação do efeito da amostra no ensaio, deve-se proceder à leitura no equipamento do meio de cultura antes de receber a amostra, com e sem adição do reagente ATP. Após este procedimento deve-se realizar o cálculo para a verificação de inibição.

Determina-se a resposta para o ATP do produto e o intervalo de aceitação deverá estar entre 25% e 200% .

2.7.5 Seleção do meio de cultura

O meio de cultura selecionado para enriquecimento, deve conter nutrientes que promovam a detecção de níveis baixos de microrganismos, mantendo o tempo de detecção em até 27 horas (24 a 27 horas). Diferentes meios de enriquecimentos são exigidos para a neutralização das substâncias antimicrobianas dos produtos terminados e para promover a otimização do crescimento pelos nutrientes (IGNAR et al., 1.996).

Existe uma diferença significativa na resposta de crescimento nos meios de cultura escolhidos. Diversas matérias-primas podem conter microrganismos estressados, que após rápida reidratação e em contato com os nutrientes dos meios de cultura, podem apresentar dificuldade para recuperação. O critério usado para a escolha do meio de cultura envolve: origem da matéria-prima e da formulação dos produtos analisados, evitando que os microrganismos tenham incompatibilidades com os nutrientes; custo por litro e a facilidade para preparo (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989) .

Morris (1998) recomendou testar três meios de cultura para a avaliação de produtos cosméticos e posterior seleção daquele com baixos níveis de ATP, a fim de não interferir na resposta do equipamento.

Para que os meios de cultura não interferiram na reação de bioluminescência devem ser preparados com água de boa qualidade microbiana, em vidrarias adequadas e submetidas à esterilização (CELSIS, 1998).

As amostras podem conter algum microrganismo presente com baixa atividade metabólica e, portanto níveis baixos de ATP. Durante a incubação, estes, multiplicam-se e podem ser detectados no teste (CELSIS, 1998). Com a adição de nutrientes nos meios de cultura foi possível a detecção de fungos e bactérias em até 27 horas usando o meio de cultura *TAT* modificado contendo 10% de Tween® 20; 1% de Tween ®80; 0,5% de $MgSO_4$; 0,5 % de glicina; 0,25% de KH_2PO_4 e 1% lecitina (JIMENEZ,2000).

Comparando o método de bioluminescência com o tradicional de contagem em placas, que requer maior quantidade de materiais, de meios de cultura e o tempo de detecção o primeiro foi capaz de detectar todos os microrganismos usando menores quantidades dos mesmos meios de cultura e em período de tempo menor (JIMENEZ 2001a).

2.7.6 Limite de detecção (recuperação dos microrganismos)

Uma etapa de grande importância para o método de ATP-bioluminescência é o limite de detecção. A amostra pode impedir a extração de ATP microbiano, não permitindo a detecção do crescimento de microrganismos, por isso deve-se conhecer os limites de detecção de microrganismos, avaliando-se a sensibilidade do método e o limite de detecção (MORRIS, 1998).

Um aspecto importante é que o método conseguiu detectar níveis reduzidos de microrganismos presentes no produto. Entretanto, se após a inoculação e a incubação não houver crescimento desses nas amostras em teste, recomenda-se verificar a necessidade de adequação dos meios de cultura, mudando-os ou adicionando nutrientes necessários, aumentando o tempo de incubação e a verificação do teste de neutralização, pois o conservante poderá estar inibindo o crescimento dos microrganismos (JIMENEZ 2.001b).

2.7.7 Preparação do Inóculo

Para cada produto a ser testado e para cada meio de cultura, verifica-se a capacidade do menor crescimento do inóculo usando os dois métodos de ATP-

bioluminescência e o método de plaqueamento tradicional. A inoculação de microrganismos padrões descritos pela *U.S. Pharmacopeia* e *CTFA Technical Guidelines* são: *E.coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Candida albicans* ATCC 10231 é feita nas amostras de matérias-primas ou produtos a serem testados. Com auxílio da escala de Mac Farland para a padronização das cepas e

posteriormente inoculação de diluições seriadas (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989).

2.7.8 Teste de Eficiência de Conservantes ou Desafio

As matérias-primas líquidas são normalmente mais suscetíveis à degradação microbiana, sendo necessário à adição de conservantes nestas. NIELSEN and VAN DELLEN, 1989, verificaram que algumas matérias-primas necessitavam da adição de conservantes devido ao crescimento de certos microrganismos, principalmente quando na presença de conteúdo elevado de água. Para esses materiais recomendou-se além do teste de neutralizante, o teste de desafio de conservantes.

No teste de Eficácia de Conservantes ou de Desafio, usa-se 100g de matéria-prima inoculada com 1mL de 1×10^8 /mL, empregadas com mistura de microrganismos como: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *E.coli* ATCC 11229 dentre outros. Inoculou-se 10g de cada amostra e realizaram-se as leituras em 0 hora e 1 dia, 2 dias e 04 dias. Estas amostras foram dispensadas em 90mL de meio de cultura e incubadas por 24 horas a aproximadamente 35°C. Algumas matérias-primas após quatro dias de incubação foram consideradas hostis; ou seja permitiram o crescimento microbiano mesmo na presença de conservantes (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989).

2.7.9 Teste paralelo

Em experimentos realizados, o método de ATP-bioluminescência para contagem de microrganismos possuiu sensibilidade, precisão e reprodutibilidade. Com esse intuito, o trabalho de Jimenez (2003) demonstrou a realização da validação da metodologia obedecendo todas as etapas do protocolo, e incluindo a análise em paralelo da técnica de “pour plate” de contagem microbiana tradicional, empregando o plaqueamento das amostras.

Existe discordância entre autores em relacionar o número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) obtidas pela técnica de plaqueamento *pour plate* e o número de URL (Unidade Relativa de Luz) obtida através da técnica de bioluminescência. Embora não exista uma relação direta, a sensibilidade da técnica na etapa de limite de detecção é elevada, pois existe a possibilidade de detecção de 1 UFC/grama da amostra. Recomenda-se realizar primeiro a leitura do meio de cultura esterilizado que será usado para incubação das amostras e verificar os valores URL/grama, estabelecendo que o dobro do valor obtido na leitura destes representará que as amostras estarão contaminadas. O método de ATP-bioluminescência não permite que o microrganismo detectado seja diretamente identificado, sendo necessário proceder ao plaqueamento “*pour plate*” e fazer a identificação por meio da coloração de Gram (CELSIS, 1998).

Caso as réplicas apresentem resultados semelhantes entre as duas técnicas deve ser concluída essa etapa da validação de metodologia. Por meio dos resultados apresentados e comparados pelas duas metodologias, verificou-se se existia alguma substância interferente para proceder à finalização do plano de validação (CELSIS, 1998).

2.7.10 Plano de validação

O Plano de validação é uma ferramenta que proporciona uma visão ampla das atividades a serem realizadas no processo de validação. Além do objetivo do plano e do estudo do método empregado devemos considerar para a validação, as responsabilidades, os prazos e a documentação como parte essencial para a conclusão do processo.

A validação do equipamento no método de bioluminescência deve ser concluída para, posteriormente, ser empregada com segurança nas análises de rotina, consiste em qualificar o equipamento, documentando as operações de acordo com um plano pré-determinado, com critérios de aceitação definidos, garantindo que o equipamento, os componentes, as instalações estejam adequadas para o uso pretendido (CELSIS,1998).

A Qualificação de Operação estabelece se o equipamento ou sistema apresenta desempenho conforme previsto, em todas as fases operacionais consideradas, garantindo assim que todos os equipamentos devem ser calibrados antes do uso. A Qualificação de Desempenho (Performance) verificará se o equipamento ou sistema é apropriado para executar uma tarefa analítica específica executada pelo usuário que criou o procedimento do teste, baseado no desenvolvimento analítico do produto.

A documentação para cada etapa é extremamente importante para o registro e a garantia de rastreabilidade, caso ocorra problemas futuro. O fabricante das matérias-primas deverá emitir e enviar o laudo das análises realizadas para comparação de resultados . Os fornecedores responsáveis pelos meios de culturas empregados no pré-enriquecimento devem enviar o certificado de viabilidade dos mesmos, embora os meios deverão ser testados para verificação de crescimento dos microrganismos, antes de iniciar os testes. As cepas usadas nos testes deverão ter origem confiável, sendo recebidas de institutos de pesquisa ou de empresas, acompanhadas dos respectivos ATCC e certificados (CELSIS,1998).

Umas etapas importantes na validação do equipamento e da metodologia utilizadas são os cuidados com a temperatura da sala onde serão realizados os testes, pois o equipamento é sensível a temperaturas superiores a 25 °C. As verificações diárias de temperatura da sala, limpeza e sanitização de capelas de fluxo laminar e aferições de balança garantem a adequação e confiabilidade da técnica (CELSIS,1998).

Para emitir o protocolo de validação do equipamento e da metodologia é necessária a emissão de documentação, conforme mencionado pelo fabricante:

- certificado de análise do lote da matéria-prima fornecido pelo fabricante da mesma;
- certificado de Q I (Qualificação de Instalação do equipamento), QO (Qualificação de Operação do equipamento) e QP (Qualificação de Performance do equipamento) ;

- resultado dos testes de neutralizante, quando houver a necessidade de realizá-lo;
- resultado do teste de Efeito da Amostra;
- resultado do teste de Limite de Detecção para verificar a sensibilidade da técnica;
- resultados paralelos do método de plaqueamento e os resultados obtidos pelo equipamento Celsis®;
- certificado dos meios de cultura usados nos testes enviados pelo fornecedor;
- calibrações de equipamentos utilizados: *shaker*, Optcomp Advance.im.Celsis®, balanças, capela, ponteira, dentre outros;
- registro de monitoramento da temperatura da sala, da limpeza e da sanitização da capela e das balanças empregadas;
- certificado de origem das cepas;
- treinamento dos analistas para operação do equipamento.

2.7.11 Órgãos Regulatórios

Consideramos um método de análise válido quando é contemplado nos compêndios oficiais e quanto à posição dos órgãos regulatórios. O órgão regulatório de alimentos e medicamentos dos EUA é o FDA (*Food Drug Administration*), que permite o uso de métodos alternativos desde que validados e com resultados equivalentes aos dos métodos oficiais dos compêndios (WILLS,2000).

O método de bioluminescência, apresentado pela Celsis®, está inscrito em 250 compêndios oficiais em países como Estados Unidos, Canadá, Bélgica, Espanha, Suíça, Holanda, dentre outros.

A França aprovou a metodologia e têm feito a liberação de produtos licenciados rotineiramente através métodos rápidos. Segundo o Guideline Europeu (III 5783/93 revisão), “uma mudança do procedimento teste para produtos finais, requer resultados dos métodos validados e devem ser avaliados para serem pelo menos equivalentes como o procedimento anterior”. Quando for encontrado no método rápido um resultado positivo, deve ser confirmado pelo método tradicional em placa. Na Europa, através da Agência Regulatória da França, verificou-se que o método de ATP-bioluminescência foi o primeiro método alternativo microbiológico aceito e aprovado (WILLS,2000).

O *PDA (Parenteral Drug Association)*, iniciou uma força tarefa para produzir um guia para validação de métodos rápidos para análises microbiológicas. O grupo era formado por microbiologistas de indústrias farmacêuticas e representantes oficiais dos Sub Comitê de Microbiologia *PDA* e da *USP (United States Pharmacopeia)* (WILLS,2000). A força tarefa tem o objetivo de produzir informação técnica necessária para a elaboração de um manual para a implementação de novos métodos microbiológicos necessários nas indústrias farmacêuticas e de produtos cosméticos, assegurando produtos com qualidade. O manual de informação técnica é estruturado em duas partes:

- seleção de novos métodos microbiológicos;

- validação e implementação de novos métodos microbiológicos.

Esse grupo produziu uma regulamentação concisa e consistente na mudança dos métodos testados. O corpo regulatório na verdade aprova os métodos testados, partindo dos resultados da validação da metodologia, para posterior substituição dos métodos existentes para os produtos.

WILLS,2000 mencionou que pela definição no Guideline “Princípios Gerais de Validação Processos” , de maio 1987: “validar é estabelecer evidências documentadas que promovem e asseguram que o processo específico seja consistentemente produzido e que reúne pré-determinadas especificações e qualidade atribuída”. As recomendações para validação são analisadas em cinco itens :

1. determinar as exigências para novos métodos e o fornecedor de cada método.
Isto é essencial para a atividade de pré-validação, onde todas as informações pertinentes e aplicação de mudanças devem ser consideradas. Descrever os objetivos deste estágio e a definição da especificação completa que o novo método pode ser capaz e que atributos são exigidos para o fornecedor de cada método;
2. escrever o Plano de Validação. Este estágio do plano define os procedimentos e os protocolos e os critérios de aceitação;
3. qualificar a instalação, é a fase importante para o uso do equipamento;
4. qualificar a operação do equipamento e a qualificação dos operadores;
5. qualificar a Performance do equipamento e operação.

Os critérios para validação envolvem : precisão, especificidade, exatidão, robustez e equivalência, limite de quantificação e detecção , linearidade, devem ser redefinidos para adequar o processo de validação microbiológica (WILLS,2000).

A equivalência é talvez a chave do critério, mas também a mais difícil para ser provada. A posição de alguns órgãos regulatórios é que novos métodos podem ser validados mediante demonstração de aplicação, que deverá ser equivalente ou melhor que os métodos atualmente aprovados. Deve-se fazer um estudo crítico para utilizar um novo método. São recomendadas a inclusão de controles apropriados e a determinação da precisão e da exatidão para novos métodos. Esses devem ser apresentados e avaliados por um comitê de aprovação através autoridades dos órgãos regulatórios para redução de falso positivo, justificando a mudança. Todas as etapas devem ser documentadas para facilitar a rastreabilidade.

No Brasil a validação foi mencionada com maior exigência através da Resolução RDC Nº 210 de 2003, antes RDC Nº 134 de 2001 que revogou a Portaria Nº 16/95 e no item 19 expõe a necessidade de validação para processos, procedimentos, instrumento, aparato ou equipamento e a partir 2003 através da RDC Nº 35 de 25/02/03-BPDF de Insumos Farmacêuticos – Anexo IV – Validação, é um item obrigatório a ser cumprido e estabelece os parâmetros que estão mencionados no plano mestre de validação (ANVISA).

A validação inclui a etapa de documentação, conforme a ANVISA define como a etapa inicial o Protocolo de Validação, descrito na RDC Nº 35 e Nº 210 (ANVISA).

3. OBJETIVOS

Selecionar e validar um método alternativo para a avaliação da qualidade microbiana do pigmento *Green* № 7 (a base de óxido de cromo) e dos corantes *FD&C Blue* *Covanor* (classe xantenos) e o *FD&C Red* № 5 (classe xantenos), usados em produtos cosméticos. Os meios de cultura testados foram o *Tryptone-Azolectin-Tween* (TAT), o *Dey Engly Neutralization Broth* (DE) e o *Letheen Broth* (LB) utilizando-se métodos baseados na reação de ATP-bioluminescência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material Objeto de Estudo

Foram utilizados dois corantes, um pigmento e três meios de cultura, discriminados a seguir:

Os corantes & pigmento :

- Pigmento *Green Nº 7* (pigmento a base de óxido de cromo) (Ciba)
- *FD&C Bleu Covanor* (corante classe xantenos) (LCW)
- *FD&C Red Nº 5* (corante classe xantenos) (LCW)

Meios de Cultura :

- *Dey Engly* – (DE) (Difco Laboratories)

Digestão pancreática de caseína	5,0g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	10,0g
Tioglicolato de sódio	1,0g
Tiosulfato de sódio	6,0g
Bissulfito de sódio	2,5g
Polisorbato (80)	5,0g
Lecitina de soja	7,0g
Púrpura de bromocressol	0,02g
Água purificada q.s.p.	1.000,0 mL
(pH final 7,6 +/-0,2)	

- *Letheen Broth* (LB) (Difco Laboratories)

Peptona de proteína n° 3	10,0g
Extrato de carne bovina	5,0g
Lecitina	0,7g
Polissorbato 80	5,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Água purificada q.s.p.	1.000,0 mL
(pH final 7,0 +/-0,2)	

- *Tryptone-Azolectin-Tween* (TAT) (Difco Laboratories)

Digestão pancreática de caseína	20,0g
Lecitina de soja	5,0g
Polissorbato 20	40,0mL
Água purificada q.s.p.	1.000,0 mL
(pH final 7,2+/- 0,2)	

4.1.2 Reagentes e soluções

Os reagentes e soluções utilizados para os testes foram:

- Reagentes para análise da bioluminescência: LumiEX® e LuminATE® (as formulações estão descritas no item 2.7 Revisão)
- *ATP Positive Control* (formulação descrita no item 2.7 Revisão)
- Kit *Celsis® Wash e Rinse Kit* (formulação descrita no item 2.7 Revisão)
- Solução Salina 0,85% - Diluente
- *Tryptic Soy Agar com Tween 80* (TSA) -(Difco)

- *Modified Lethen Agar* (MLA) - Lecitina ágar modificado (Difco)- Meio de Cultura

- *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) - Ágar Sabouraud dextrose (Difco)- Meio de Cultura

- Solução de 0,1N de NaOH

- Solução de 0,1N de HCL

- Polissorbato 80

- Polissorbato 20

- Microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Candida albicans* ATCC 10231.

4.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para os testes foram:

- Equipamento Celsis® *Advanced.im Luminometer* , Cambridge,UK, com injetor automático para detecção de luz através da reação de bioluminescência.

- Escala de *MacFarland-padrão 05* (*Biomerieux*)

- Vórtex

- Luminometer Cubetas - para colocação das amostras no equipamento

- Celsis® *Cuvette Rack*

- Shaker para incubação 220rpm -30, 0 °C +/-1 °C.

- Equipamento de Fluxo Laminar e/ou Sala Limpa Classe 10.000

4.2 Método

O fluxograma a seguir refere-se as análises realizadas para Pigmento *Green* Nº 7 e para os corantes *FD&C Blue Covanor* e *FD&C Red* Nº 5 no experimento.

Observações:

- **Pigmento/corantes** – Amostras de pigmento *Green* Nº7 e dos corantes *FD&C Blue Covanor* e *FD&C Red* Nº 5 em suspensões 1% p/v, usadas para o experimento.
- **Bioburden amostras(1)** - O pigmento e os corantes foram analisados para verificação de sua carga microbiana.
- **Tratamento esterilizante (2)** – As amostras foram submetidas a tratamento esterilizante por irradiação cobalto 60, para descontaminação.
- **Análise pós-esterilização (3)** – As amostras foram analisadas quanto à qualidade microbiana para confiabilidade dos testes.
- **Leitura reagente ATP e Preparo do equipamento (4)**- Antes de iniciar os testes para validação do método de ATP-bioluminescência, foi realizada a leitura do reagente de ATP e o preparo do equipamento, para não haver problemas com resultado falso negativo.
- **Efeito da Amostra (5)** – No teste Efeito da Amostra, o pigmento e os corantes foram analisados para verificação de ATP não microbiano nos métodos 1 e 2 e nos três meios de cultura TAT, LB e DE
- **Limite de Detecção (6)** – Foram inoculados suspensões de microrganismos padrões no pigmento e nos corantes para a verificação da recuperação e sensibilidade nos métodos 1 e 2 e nos três meios de cultura TAT, LB e DE.
- **Sensibilidade Método (7)** – Nessa etapa realizou-se a verificação da sensibilidade do método por meio de testes paralelos por plaqueamento *pour plate*.

Fluxograma 1.0- Etapas do experimento realizado

4.2.1 Avaliação das amostras de pigmento e corantes.

Com a finalidade de garantir a confiabilidade do teste, iniciou-se com o conhecimento da carga microbiana dos pigmentos e corante. O *bioburden* das amostras devem apresentar valores até 10UFC/grama.

As matérias-primas e os meios de cultura devem ser testados para a verificação da necessidade de neutralização de seus conservantes, que podem impedir o crescimento dos microrganismos, resultando na intervenção da

identificação de ATP microbiano e em resultados falso-negativo. Deve ocorrer o Limite de Detecção entre 50 a 150% após a inoculação dos microrganismos. Este teste torna-se desnecessário para as matérias-primas submetidas anteriormente a processos de esterilização ou quando as mesmas não possuem conservantes (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989).

Nas amostras do pigmento *Green Nº 7*, do corante *FD&C Blue Covanor* e o do corante *FD&C Red Nº5*, não foram necessárias as realizações dos testes de neutralizante e de desafio do conservante, pois não tinham conservantes na sua composição. Essas amostras sofreram tratamento esterilizante para descontaminação por radiação cobalto 60 pela empresa Embrarad®. Após irradiação foram analisadas para verificar a qualidade microbiana, por meio da técnica de plaqueamento pour plate (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003).

Foram preparadas dispersões das amostras de *Pigmento Green Nº7*, *Corantes Bleu Covanor* e *FD&C Red Nº5*, na concentração de 1% (p/v) em água previamente esterilizada.

4.2.2 Métodos Usados (1 e 2)

No método 1, os meios de cultura *Dey Engly (D/E)*, *Letheen Broth (LB)* e o *TAT (Tryptone-Azolectin-Tween)*, foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante com a adição de um por cento de Polissorbato 80 para cada 99 mL desses e foi pesado 1 grama das amostras de *Pigmento Green Nº7*, *Corantes Bleu Covanor* e *FD&C Red Nº5* em 1% (p/v). No método 2, os meios de

cultura foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante, porém para 90mL de cada meio de cultura foi adicionado 9ml de polissorbato 80 e posteriormente foi pesado 1 grama das amostras de Pigmento *Green Nº7*, Corantes *Bleu Covanor* e *FD&C Red Nº5* em 1% (p/v). O objetivo da adição de polissorbato no método 2 seria melhorar a leitura das amostras como corantes e pigmentos, pois a coloração poderia interferir na leitura no equipamento (CELSIS,1998).

4.3 – Preparo do equipamento

Deve-se realizar o procedimento para verificar o desempenho do equipamento e do reagente de ATP (controle positivo), para posteriormente iniciar os testes Efeito da Amostra. Para os testes de eficiência do equipamento, foi realizada inicialmente a verificação dos injetores quanto à limpeza usando um kit para lavagem (Wash) e um kit para enxágüe (Rinse). Após a limpeza dos injetores foi determinado o branco do equipamento (*background*) por meio da adição de 10ul do reagente de ATP (controle positivo), preparado a partir da reconstituição do produto liofilizado em tampão fornecido pelo fabricante do equipamento e realizada a leitura (Figura 4.1, a seguir). O teste para verificação do reagente de ATP foi realizado devido à possível perda gradativa de atividade do mesmo, após reconstituição, pois pode permanecer guardado em geladeira por cinco dias a temperatura 2 a 8 °C considerado parâmetro crítico; devido à alteração da atividade (CELSIS,1998).

Figura 4.1. Parte interna do Aparelho Celsis Advanced. Im

4.4- Efeito da Amostra

No método de ATP-bioluminescência é necessário determinar se as matérias-primas ou produtos testados possuem ATP não microbiano, que pode ser originado de componentes de origem natural. Com esse intuito, realiza-se o teste do Efeito da Amostra, para verificar se o nível de ATP-não microbiano poderá interferir nos resultados. O propósito desse teste é promover informações ao ensaio, considerando que a situação ideal seria que o nível de URL (Unidades Relativas de Luz) fosse igual para todos os produtos (MORRIS, 1998).

O diagrama a seguir mostra como foi realizado o teste de Efeito da Amostra no experimento para o pigmento e os corantes nos meios de cultura testados para os métodos 1 e 2.

Diagrama 1 – Etapas do teste Efeito da Amostra

Para verificação do Efeito da Amostra, foram preparadas dispersões das amostras de Pigmento *Green Nº7*, Corantes *Bleu Covanor* e *FD&C Red Nº5*, na concentração de 1% (p/v) em água previamente esterilizada e adicionada aos meios de cultura *Dey Engly (D/E)*, *Letheen Broth (LB)* e o *TAT (Tryptone-Azolectin-Tween)*, distribuídos em frascos de vidro com tampas e previamente esterilizados. A água usada para o preparo dos meios era recém destilada e esterilizada, para evitar que aumentasse o nível de ATP e interferisse nos resultados finais. Considerou-se como parte essencial desta etapa dos testes, os cuidados com as vidrarias usadas, pois se recomenda a utilização de material segregado para evitar problemas de interferentes na leitura final.

Os meios de cultura com e sem adição do reagente ATP e com os diferentes corantes e pigmento (com e sem a adição do ATP), foram analisados no aparelho Celsis Advance.Im para verificação de interferentes por meio da leitura do valor de URL, pois a especificação requeria a leitura, na faixa de aceitação, inibição da reação de bioluminescência, entre 25% a 200% (CELSIS,1998).

O procedimento foi usado para o método 1 e 2 conforme mencionado no item 4.2.2, iniciou-se com a identificação em frascos contendo os meios de cultura *Dey Engly (D/E)*, *Letheen Broth (LB)* e o *TAT (Tryptone-Azolectin-Tween)* em duplicata: “I- para o caldo diluente II- para o caldo mais a amostra. Assepticamente, foram feitas as pesagens de um grama da amostra teste de cada matéria-prima (pigmento e dois corantes) e foram transferidas para os frascos I e II respectivamente para os dois métodos 1 e 2. A seguir foram colocadas em shaker por 220 rpm na temperatura de 32 °C +/-1 °C por 10 minutos. Após esse procedimento, com auxílio de uma pipeta automática e ponteiras estéreis foram transferidas 50ul das amostras e procedeu-se à leitura no equipamento”.

Para o cálculo de URL (Unidade Relativa de Luz) utilizou-se a seguinte equação:

% Inibição da reação de bioluminescência é igual a :

$$\left(\frac{D - C}{B - A} \right) \times 100$$

onde :

A = Leitura de URL dos meios de cultura puro

B = Leitura de URL dos meios de cultura com 10 μ L do reagente de ATP
(controle positivo)

C = Leitura da amostra no meio de cultura

D = Leitura da amostra no meio de cultura com 10 μ L do reagente de ATP
(controle positivo)

4.5 - Limite de Detecção

Nessa etapa do teste, verificaram-se os limites de detecção de microrganismos para as amostras, avaliando-se a sensibilidade do método (MORRIS, 1998).

Para a realização do teste de Limite de Detecção foi necessário à preparação e a padronização das suspensões microbianas dos microrganismos padrões : *Escherichia coli* ATCC 8739; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Candida albicans* ATCC 10231 e *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, conforme mostra o diagrama 2.

A princípio foi necessária a manutenção dos microrganismos através da realização das estrias sobre a superfície inclinada de meios de cultura de TSA (ágar caseína soja) para as bactérias, e ágar sabouraud-dextrose para os fungos em tubos de ensaio de 18mm x 200 mm. Os meios de cultura foram previamente preparados conforme orientação do fabricante (Difco®), esterilizado e transferido

asépticamente para tubos de ensaios estéreis e resfriados de forma a obter superfície inclinada. Após o repique, incubaram-se as bactérias a 30 – 35 °C por 24 horas e os fungos, a 20 – 25 °C por 5 dias.

A massa celular resultante desse crescimento, foi recolhida com 9 mL de solução salina a 0,9 % (p/v) estéril e considerou-se como suspensão microbiana padrão. A contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) da suspensão foi realizada através da técnica de semeadura em profundidade. Nesta técnica são transferidas para as placas de Petri estéril, em triplicata, 1,0 mL das diluições de 10^{-4} a 10^{-7} das suspensões microbianas, obtidas por diluições decimais seriadas em tubos contendo 9 mL de solução salina a 0,9 % (p/v) estéril. Adicionou-se sobre as alíquotas, 15,0 a 20 mL de meio de cultura resfriados em cerca de 45 a 50°C de TSA (ágar caseína soja) para as bactérias ou SDA (ágar sabouraud-dextrose) para fungos e a seguir faz-se à homogeneização em movimentos suaves em forma de oito.

Os meios de cultura, ágar caseína-soja e Sabouraud-dextrose, foram preparados de acordo com o fabricante (Difco®). Após solidificação do meio de cultura, incubaram-se essas placas a 30 – 35 °C para as bactérias em estufa por 24 horas e os fungos, a 20 – 25 °C por 5 dias. O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL foi determinado a partir das placas que obtiveram contagem entre 30 e 300 para as bactérias e a levedura e entre 10 a 100 para o bolor, utilizando um contador de colônias. As suspensões obtidas através da massa celular resultante do crescimento do repique foram mantidas esfriadas em refrigerador, por até dois dias. Para a padronização da suspensão do inóculo utilizou-se à escala de

Mac Farland e foram feitas às diluições seriadas até obter a concentração de 100 UFC/mL .

Diagrama 2 – Padronização das cepas para preparo do inóculo.

De acordo com o método de ATP-bioluminescência, o nível mais baixo que poderá ser detectado é de 1 a 5 UFC (Unidades Formadoras de Colônias); após a inoculação e a diluição. Na validação do método para cada produto ou grupo destes, inocula-se 10 µL de 10 a 100 UFC de cada microrganismo proposto para cada amostra (CELSIS, 1998).

Após a padronização das suspensões microbianas, amostras 1% (p/v) de *Pigmento Green Nº7* e dos corantes *FD&C Bleu Covanor* e *FD&C Red Nº5*, foram colocadas respectivamente nos meios de cultura *Dey Engly (D/E)*, *Letheen Broth*

(LB) e *Tryptone-Azolectin-Tween* (TAT) para os métodos 1 e 2 (conforme descrito item 4.2.2). Adicionaram-se 10 µL dos inóculos de *Escherichia coli* ATCC 8739; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Candida albicans* ATCC 10231 e *Burkholderia cepacea* ATCC 25416 o que correspondeu aproximadamente 100 UFC/mL em cada amostra. Essas amostras foram incubadas com agitação em shaker à 220rpm, à temperatura de 32°C +/- 2 °C, por 24 horas e posteriormente fez-se à leitura do URL no equipamento para verificar a sensibilidade de Limite de Detecção.

No controle do teste, realizou-se a leitura do URL dos meios de cultura; do reagente ATP, controle positivo; e de 50 µL meio de cultura adicionado de 10 µL do reagente ATP.

Após a leitura no equipamento para comprovar a recuperação, foi realizada a contagem de microrganismo presente nas amostras por meio da técnica de *pour plate*. O teste faz parte do protocolo usado para validação de um produto ou matéria-prima analisada pelo método de ATP-bioluminescência. O Limite de Detecção de cada microrganismo é menor que cinco unidades formadoras de colônias por grama 5 UFC/grama; alguns autores mencionam que é possível detectar 1UFC/grama no produto (MORRIS,1998).

A seguir, o diagrama 3 mostra a etapa de inoculação das suspensões padronizadas nas amostras no método 1 e 2 para a realização do teste de Limite de Detecção e a comparação da recuperação desses microrganismos por meio da técnica de plaqueamento *pour plate*.

Diagrama 3 – Limite de Detecção (recuperação de microrganismos) nos métodos 1 e 2 para o Pigmento *Green Nº7* e para os Corantes *Blue Covanor* e *FD&C Nº5*.

4.6. Determinação da precisão do método (Testes paralelos)

Para verificação da precisão, após a seleção do método, foram realizadas 30 réplicas. O procedimento iniciou-se preparando suspensões das amostras de mesmo lote de *Pigmento Green Nº7* e dos corantes, *FD&C Bleu Covanor* e *FD&C*

Red Nº5, na concentração de 1% (p/v), para cada meio de cultura nos meios de cultura *Dey Engly (D/E)*, *Letheen Broth* e *TAT (Tryptone-Azolectin-Tween)* para os métodos 1 e 2 (conforme descritos anteriormente no item 4.2.2). As preparações foram colocadas para incubação em shaker 250 rpm na temperatura de 32 °C +/-1 °C por 24 horas. Para a leitura do URL, tomaram-se 50µL das amostras incubadas. Para o controle do teste foram realizadas leituras dos meios de cultura sem amostra e do meio de cultura com o reagente ATP. O requisito para precisão do método é que a leitura das amostras não deve exceder duas vezes o valor da leitura de URL do meio de cultura puro (CELSIS,1998).

Em paralelo, as suspensões foram avaliadas quanto à presença de microorganismo pela técnica de pour plate (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003).

4.7 Planejamento estatístico do experimento e análise dos resultados

Os ensaios foram conduzidos de acordo com um planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo “three-way”, conforme a tabela 4.1 para o Efeito da Amostra e a tabela 4.2 para o Limite de Detecção. Foram feitos para os métodos 1 e 2 em réplica de quatro análises para o Pigmento *FD&C Green Nº7*, para o Corante *FD&C Blue Covanor* e para o corante *FD&C Red Nº5* nos três meio de cultura *TAT (Tryptone-Azolectin-Tween)*, *D/E (Dey Engly Neutralization Broth)* e *LB(Letheen Broth)*. Nas tabelas 4.1 e 4.2 os algarismos arábicos representam cada ensaio (BOX, HUNTER,HUNTER,1978).

Para a análise dos resultados utilizou-se o programa *Statgraphics plus*, versão 2.1, método de análise de variância múltipla dos ensaios e o método de diferença mínima significativa (LSD Fisher), para a comparação entre as médias.

Tabela 4.1 – Matriz de ensaio do experimento utilizado no ensaio Efeito da Amostra.

Método	Corante/Pigmento	Meio de Cultura		
		TAT	LB	DE
1	FD&C Green №7	1	13	25
		2	14	26
		3	15	27
		4	16	28
	FD&C Blue Covanor	5	17	29
		6	18	30
		7	19	31
		8	20	32
	FD&C Red №5	9	21	33
		10	22	34
		11	23	34
		12	24	36
2	FD&C Green №7	37	49	61
		38	50	62
		39	51	63
		40	52	64
	FD&C Blue Covanor	41	53	65
		42	54	66
		43	55	67
		44	56	68
	FD&C Red №5	45	57	69
		46	58	70
		47	59	71
		48	60	72

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween
LB = Lethen Broth

DE = Dey Engly Neutralization Broth
Os algarismos arábicos representam cada ensaio

Tabela 4.2 – Matriz de ensaio do experimento utilizado no ensaio Limite de Detecção, para os microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Método	Corante/Pigmento	Meio de Cultura		
		TAT	LB	DE
1	FD&C Green Nº7	1	13	25
		2	14	26
	FD&C Blue Covanor	TAT	LB	DE
		3	15	27
		4	16	28
	FD&C Red Nº5	TAT	LB	DE
		5	17	29
		6	18	30
2	FD&C Green Nº7	TAT	LB	DE
		7	19	31
		8	20	32
	FD&C Blue Covanor	TAT	LB	DE
		9	21	33
		10	22	34
	FD&C Red Nº5	TAT	LB	DE
		11	23	35
		12	24	36

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Letheen Broth

Os algarismos arábicos representam cada ensaio

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de métodos rápidos para avaliação de contagem de microrganismos viáveis pelo método de bioluminescência reduz o tempo de teste, o volume de trabalho, e é economicamente mais vantajosa. Essa técnica traz benefícios para empresas, que necessitam de uma liberação rápida de seus produtos e pode representar a substituição de métodos clássicos.

Os produtos cosméticos contêm corantes, tensoativos, perfumes, conservantes e outros podem afetar os resultados das análises pelo método de bioluminescência, pois podem interferir na atividade da enzima luciferase (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989). Assim, atualmente, há o enfoque de desenvolver protocolos adequados, reagentes que maximizam a emissão de luz proveniente de ATP microbiano, e validar a metodologia para cada matéria prima e produtos.

Deve-se proceder a testes com diferentes meios de cultura , adicionando-se nutrientes necessários para adequar a utilização da técnica. Adicionalmente, alguns parâmetros são importantes além da escolha do meio de cultura, como o valor de pH das matérias-primas que poderá influenciar no crescimento de microrganismos (NIELSEN and VAN DELLEN, 1989).

Com intuito de verificar a influência das amostras, no pigmento (*FD&C Green n°7*) e nos corantes (*FD&C Blue Covanor e FD&C Red n°5*); desenvolveu-se dois métodos nomeados de 1 e de 2, utilizando-se três meios de cultura TAT (Tryptone-Azolectin-Tween), DE (*Dey Engly Neutralization Broth*) e LB (*Letheen Broth*). Com a

finalidade de garantir a confiabilidade do teste, iniciou-se com o conhecimento da carga microbiana dos pigmentos e corante. De acordo com a tabela a seguir, os *bioburden* das amostras apresentaram valores menores que 100UFC/g, mas necessitando de uma descontaminação, pois poderiam interferir na validação do método. As amostras foram submetidas ao tratamento com radiação de cobalto 60 e o resultado apresenta-se na tabela a seguir. Ressalta-se que as amostras não sofreram alterações visíveis no aspecto, na cor e no odor.

Tabela 5.1 Carga microbiana dos corantes e pigmento antes (*bioburden*) e após a descontaminação por radiação

Condição	UFC/g		
Antes do tratamento	<i>FD&C Green</i> <i>nº7</i>	<i>FD&C Blue</i> <i>Covanor</i>	<i>FD&C Red</i> <i>nº5</i>
	100	10	10
	100	10	10
	100	10	10
Após o tratamento	<10	<10	<10
	<10	<10	<10
	<10	<10	<10

Para a validação do método de bioluminescência de matérias-primas, deve-se levar em consideração outras condições, como o resultado da reação falso-positivo e falso negativo. Considera-se o falso positivo o ATP não microbiano na

amostra e o falso negativo a degradação do reagente de ATP (NIELSEN and VAN DELLEN,1989).

No que se refere aos interferentes relacionados ao reagente de ATP que podem ser interpretadas como resultado falso negativo, devem ser considerados como aspectos relevantes, as condições de armazenamento do ATP liofilizado; do preparo da solução do ATP reconstituído e do seu tempo de estocagem; e das condições de uso. No experimento o armazenamento do ATP liofilizado foi na temperatura de 5 °C ,seguindo-se as instruções do fabricante. Em relação ao tempo de estocagem do reagente reconstituído verificou-se que ocorreu instabilidade, mesmo estando no período de validade, de cinco dias na temperatura de 5 °C, recomendado pelo fabricante e de acordo com a sugestão de Reilly, Jenkins e Virgo (1996) que obtiveram o decaimento de 4%, a 4 °C e após 4 dias de reconstituição. No entanto, nos ensaios realizados verificou-se que ocorreu decaimento de 15% após 4 dias e frente a esse resultado a solução do reagente ATP utilizado foi recém preparada, para prevenir possíveis interferências, embora o valor encontrado estivesse dentro da especificação. Conforme mostra a tabela a seguir, os valores dos reagentes ATP reconstituídos (controle positivo) no ensaio apresentaram acima do valor mínimo permitido 1.000.000 URL, mostrando que o reagente usado nos testes apresentava-se dentro da especificação.

Tabela 5.2 Valores de URL (Unidade Relativa de Luz) do branco do equipamento (*background*) e do reagente ATP reconstituído (controle positivo) no teste de eficiência do equipamento.

Ensaio	Branco	Controle positivo
1	32	2974219
2	29	2846790
3	32	3185494
4	32	2730420

TAT = *Tryptone-Azolectin-Tween* DE = *Dey Engly Neutralization Broth*

LB = *Letheen Broth*

Efeito da Amostra

Após as avaliações do *bioburden* das amostras e do reagente de ATP, foram realizados os testes para verificar a interferência de ATP não microbiano que poderia resultar em falso positivo para os métodos 1 e 2. Os meios de cultura usados para enriquecimento das amostras poderiam causar uma possível inibição na reação de bioluminescência, assim nessa etapa procedeu-se o teste do Efeito da Amostra, que faz parte do protocolo de validação da técnica de ATP bioluminescência, conforme o método descrito no item 4.4 no capítulo de Material e Métodos. Adicionalmente poderia haver uma possível interferência da cor das amostras de corantes e pigmento na leitura do luminômetro devido a essas apresentarem absorbância, ou seja, o comprimento de onda dessas cores estão próximos ao da reação de bioluminescência que está na faixa de 500-550nm. Para o corante de coloração azul

a faixa está 450-500nm, o pigmento de coloração verde de 500-570nm e o corante coloração vermelha de 620-750nm. Ressalta-se que foi feita uma diluição para diminuir a possibilidade de interferência da coloração da amostra no luminômetro, assim como a leitura do branco (meios de culturas usados) para verificação de uma possível interferência.

Por meio dos resultados, apresentados na tabela 5.3 foi possível verificar que não houve inibição da reação de bioluminescência para os meios de cultura, de acordo com a recomendação do protocolo do equipamento, o valor de URL não deve ultrapassar duas vezes o valor da leitura do meio de cultura usado.

Tabela 5.3 Leitura de URL (Unidade Relativa de Luz) da reação de bioluminescência dos meios de cultura usados nos ensaios realizados nos métodos 1 e 2.

Leitura de URL	<i>TAT</i>	<i>LB</i>	<i>DE</i>
Ensaio 1	12636	9182	3698
Ensaio2	10656	5737	2830
Ensaio 3	17484	5160	2300
Ensaio 4	13189	8022	2691

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Letheen Broth

Quando os valores de URL das amostras forem maiores que duas vezes dos valores da leitura dos meios de cultura, considera-se que há a presença de ATP microbiano. Para que os resultados obtidos sejam confiáveis; recomendam-se alguns cuidados para a realização dos testes, como uso de luvas pelos analistas e a

temperatura da sala estar sempre no máximo a 22 °C, pois poderá degradar os reagentes e trazer problemas quanto à eficiência do equipamento. Esses procedimentos são importantes para evitar que haja interferência de ATP não microbiano nos resultados, pois pode aumentar os valores de URL e trazer problemas como os resultados falsos positivos para as análises.

A importância dos valores de URL nessa fase está relacionada com a possível inibição de leitura das amostras, ou dos meios de cultura ou das amostras dispersas nos meios de cultura. Esses poderiam interferir no equipamento devido à coloração das amostras e não ser possível a utilização do método para pigmento e corante. Foram realizados os testes com os métodos 1 e 2, com o objetivo de avaliar se esses poderiam contribuir para minimizar as possíveis interferências relacionadas à coloração das suspensões de pigmento e corantes, auxiliando na leitura com a adição de polissorbato 80 no método 2, conforme descrição dos métodos no item 4.2.2 no capítulo de Material e Métodos. Procederam-se os testes e foram realizadas as leituras do URL para os dois métodos, conforme as tabelas, 5.4 e 5.5, mostradas a seguir.

Tabela 5.4 Leitura de URL (Unidade Relativa de Luz) da reação de bioluminescência para a suspensão de pigmento/ corantes na concentração de 1% (p/v) em meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para o Método 1.

Pigmento/Corantes	Meio de Cultura		
	TAT	LB	DE
<i>FD&C Green n°7</i>			
	2455	3423	3395
	3489	2908	4373
	3423	5702	3714
	1233	6066	3069
Média	2650	4525	3638
Desvio Padrão	914,8	1377,4	481,9
<i>FD&C Blue Covonor</i>			
	3063	2572	1992
	1065	4432	3517
	2568	6284	2259
	1063	2847	1957
Média	1940	4034	2431
Desvio Padrão	893,0	1480,5	637,6
<i>FD&C Red n°5</i>			
	2304	1137	1241
	1160	1351	2485
	1236	1238	2827
	1937	1037	1143
Média	1659	1191	1924
Desvio Padrão	479,9	116,6	742,7

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween
LB = Letheen Broth

DE = Dey Engly Neutralization Broth

Tabela 5.5 Leitura de URL (Unidade Relativa de Luz) da reação de bioluminescência para a suspensão de pigmento/ corantes na concentração de 1% (p/v) em meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para o Método 2.

Pigmento/Corantes	Meio de Cultura		
<i>FD&C Green nº7</i>	<i>TAT</i>	<i>LB</i>	<i>DE</i>
	1269	3620	3069
	1132	4540	4373
	1279	4080	3327
	1784	3283	3714
Média	1623	4009	3624
Desvio Padrão	625,5	554,9	491,3
<i>FD&C Blue Covanor</i>	<i>TAT</i>	<i>LB</i>	<i>DE</i>
	1884	10106	10275
	1115	4875	4295
	1001	3162	2259
	945	1052	1957
Média	1236	4799	4696
Desvio Padrão	378,9	3349,9	3343,9
<i>FD&C Red nº5</i>	<i>TAT</i>	<i>LB</i>	<i>DE</i>
	40	36	41
	38	38	47
	1666	2907	2827
	1077	1699	2485
Média	705	1170	1350
Desvio Padrão	698,0	1210,8	1311,6

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Letheen Broth

Com o objetivo de selecionar o método adequado para análise dos corantes e pigmento, procederam-se ensaios descritos no item 4.2.2 do capítulo de Material e Métodos e baseado no planejamento estatístico do experimento, item 4.7 do mesmo capítulo. Para a análise dos resultados utilizou-se o programa *Statigraphics plus*, versão 2.1, método de análise de variância múltipla dos ensaios e o método de diferença mínima significativa (LSD Fisher), para a comparação entre as médias. Escolheu-se essa de análise, apesar de não ser sugerido no protocolo de validação,

pois as análises dos resultados obtidos e do desvio padrão (Tabelas 5.4 e 5.5) não ofereceriam confiabilidade dos resultados.

De acordo com a tabela 5.6 a seguir, na análise dos efeitos principais das médias encontradas, há diferenças significativas em relação as suspensão de pigmento/ corantes e aos meios de cultura nos ensaios realizados, com um grau de confiança de 95%. No entanto, em relação às interações entre os efeitos principais, não há diferenças significativas.

Tabela 5.6 Análise de variância dos valores de URL para a suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método, no ensaio Efeito da Amostra, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Fonte de variação	Soma do desvio quadrático	Grau de liberdade	Média dos desvios quadráticos ou variância estimada	F calculado ou razão de variância	Probabilidade ou nível de significância
Efeito principal					
Pigmentos e Corantes (A)	37838963	2	18919481	7.861	*0.0010
Meio de cultura (B)	57948523	2	28974262	12.039	*0.0000
Método (C)	302642	1	302642	0.126	0.7279
Interações					
AB	17678936	4	4419734.1	1.836	0.1341
AC	7341082	2	3670540.8	1.525	0.2262
BC	7427636	2	3713818.0	1.543	0.2224
Resíduo	1.3959E8	58	2406685.0		
TOTAL	2.6813E8	71			

* Denota diferença significativa Analise com grau de confiança de 95% e todos os F calculados ou razão de variância são baseados no erro residual das médias do desvio quadrático ou variância estimada.

Para uma análise pormenorizada realizou-se a comparação das médias dos valores de URL do pigmento e dos corantes, no teste Efeito da amostra, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planeamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*. Na análise estatística demonstrou que há diferença significativa entre o pigmento (1) e os corantes (2 e 3), de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 5.7 Comparação das médias dos valores de URL para a suspensão de pigmento/ corantes, no teste Efeito da Amostra, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planeamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
1	24	1592.7500	X
3	24	2943.3750	X
2	24	3266.4583	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		1673.71	896.645 *
1 – 3		1350.63	896.645 *
2 – 3		323.083	896.645

1 FD&C Green nº7 (pigmento)

2 FD&C Blue Covanor (corante)

3 FD&C Red nº5 (corante)

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

Frente aos resultados, as diferenças seriam esperadas uma vez que pigmento e corante não apresentam a mesma composição e solubilidade, mencionadas anteriormente na revisão de literatura no item 2.2.1.

A mesma análise estatística foi realizada para os meios de cultura *TAT* (*Tryptone-Azolectin-Tween*), *LB* (*Letheen Broth*) e *DE* (*Dey Engly Neutralization Broth*) e os resultados encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 5.8 Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio Efeito da Amostra, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher), do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
3	24	1333.2083	X
2	24	3189.3750	X
1	24	3280.0000	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		90.6250	896.645
1 – 3		1946.79	896.645*
2 – 3		1856.17	896.645*

- 1 *TAT* = "Tryptone-Azolectin-Tween"
 2 *LB* = "Letheen Broth"
 3 *DE* = "Dey Engly Neutralization Broth"

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

Em relação à análise das médias de resposta do URL, observou-se que os meios *TAT* e *LB*, apresentaram comportamento semelhante, não ocorrendo diferenças significativas entre eles. No entanto, de acordo com Leranoz *et al.* (2001), o meio de cultura *LB* poderia interferir na reação de bioluminescência, pois a leitura

da absorbância máxima desse meio tem o mesmo comprimento de onda que a reação de bioluminescência.

O meio DE apresentou diferenças significativas quando comparado com o *TAT* e *LB*, sugere-se que essa diferença ocorreu devido à coloração do próprio DE que é arroxeadada. Ressalta-se que na literatura, não existem trabalhos que utilizam esse meio de cultura, entretanto foi intenção desse experimento analisá-lo, pois é bastante utilizado como meio de enriquecimento, favorecendo o crescimento de muitos microrganismos, e apresenta alguns inativadores de conservantes bastante utilizados em cosméticos.

Em relação ao método 1 (sem acréscimo adicional de polissorbato 80 no meio de cultura) e no método 2 (com acréscimo 9mL de polissorbato 80 no meio de cultura), os resultados da comparação de médias são apresentados na Tabela 5.9. Na análise de variância múltipla ou multifatorial das médias de resposta do URL dos testes de Efeito da Amostra, verifica-se que não houve diferença significativa nos resultados dos métodos testados. Assim, o acréscimo na concentração de polissorbato no meio de cultura não interferiu nos ensaios. O intuito do acréscimo no ensaio, era verificar se haveria o favorecimento na dispersão de componentes insolúveis do corante e facilitar a leitura do URL.

Tabela 5.9 Comparação das médias dos valores de URL dos métodos 1 e 2, no ensaio do Efeito da Amostra, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
1	36	2536.0278	X
2	36	2665.6944	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		129.667	732.107

1. Método 1

2. Método 2

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

Dando continuidade a etapa de validação da reação de bioluminescência para as suspensões de pigmento/corantes, sugere-se, também, além da análise das leituras do URL, a verificação da porcentagem de inibição da amostra no teste. O cálculo dessa porcentagem está descrito, no capítulo de Material e Métodos, item 4.4. Os resultados dos ensaios realizados, réplica de quatro, para as suspensões de pigmento/corantes nos três meios de cultura, são mostrados nas tabelas 5.10 e 5.11, a seguir.

Tabela 5.10 Porcentagem de inibição da reação de bioluminescência para suspensão de pigmento/ corantes , na concentração de 1% (p/v), em três diferentes meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para o Método 1.

Corante/Pigmento	Meio de Cultura		
	<i>TAT</i>	<i>LB</i>	<i>DE</i>
<i>FD&C Green nº7</i>	61,70	23,30	27,50
	108,88	40,44	46,18
	60,97	23,20	24,24
	25,54	33,10	34,17
	64,27	30,01	33,02
Média			
<i>FD&C Blue Covanor</i>	<i>TAT</i>	<i>LB</i>	<i>DE</i>
	58,20	26,9	33,20
	80,92	75,78	25,67
	24,71	33,10	20,64
	23,82	83,14	26,28
	46,92	54,73	26,45
Média			
<i>FD&C Red nº5</i>	<i>TAT</i>	<i>LB</i>	<i>DE</i>
	70,90	13,51	30,81
	32,04	22,85	28,66
	22,80	11,28	30,20
	29,41	18,23	29,00
	38,79	16,47	29,67
Média			

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Letheen Broth

Tabela 5.11 Porcentagem de inibição da reação de bioluminescência para suspensão de pigmento/ corantes, concentração de 1% (p/v), em três diferentes meios de cultura no teste do Efeito da Amostra para o Método 2.

Corante/Pigmento	Meio de Cultura		
	TAT	LB	DE
FD&C Green nº7	90,44	39,19	23,80
	67,74	33,01	34,73
	33,86	15,92	21,06
	21,58	13,93	27,12
Média	53,41	25,51	26,67
FD&C Blue Covanor	69,67	1525,12	1321,12
	31,97	63,33	33,65
	28,90	23,09	19,55
	13,31	14,65	11,13
Média	35,96	406,55	346,37
FD&C Red nº5	0,01	0,01	0,01
	0,05	0,05	0,07
	48,82	21,34	31,55
	17,99	19,04	18,32
Média	16,72	10,11	12,49

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween DE = Dey Engly Neutralization Broth
LB = Lethen Broth

As análises estatísticas das porcentagens de inibição não foram realizadas, uma vez que apresentariam resultados semelhantes ao do URL, quanto às influências dos efeitos principais, interações e comparação das médias das suspensões de pigmento/corantes, meios de cultura e métodos, realizados de acordo com o planejamento estatístico do experimento, com a matriz de ensaio tipo *three-way*. No cálculo da porcentagem, os valores de URL utilizados são os mesmos analisados, sendo, portanto, apenas uma transformação matemática desses valores (item 4.4 do Capítulo Material e Métodos) .

Dentro da validação, recomenda-se que os valores de porcentagem estejam dentro do intervalo de 25 a 200% para serem considerados em conformidade. As amostras que apresentam valores menores que 25%, não poderiam ser analisadas, pois o método não possui sensibilidade. Os valores acima de 200% indicam a interferência da amostra na leitura dos URL, nesses casos recomenda-se a diluição da amostra para prosseguir a validação do método. Frente a esse enfoque (Tabela anteriores 5.10 e 5.11), analisando os efeitos principais, o pigmento *Green n° 7* pode ser analisado pelo método de ATP-bioluminescência, pois não ocorreram interferências nos três meios de cultura testados e nos métodos estudados. Para análise de corantes, houve interferências com os meios de cultura e métodos. Esses resultados corroboram com a análise estatística onde houve diferenças significativas entre pigmento e corantes.

Limite de Detecção (recuperação dos microrganismos)

Dando continuidade aos testes para validação do método de ATP bioluminescência; após a verificação dos possíveis interferentes da amostra na reação de bioluminescência (Efeito da Amostra), realizou-se o teste chamado de Limite de Detecção. A amostra pode impedir a extração de ATP microbiano, não permitindo a detecção do crescimento de microrganismos, por isso devem-se conhecer os limites de detecção de microrganismos.

O Limite de Detecção tem como objetivo a verificação da sensibilidade do ensaio (MORRIS, 1998). Com essa finalidade avaliou-se a recuperação dos microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416,

Staphylococcus aureus ATCC 6538 , *Candida albicans* ATCC 10231. Esses foram inoculados, previamente, nas amostras em concentrações conhecidas, conforme descrito no item 4.5 no capítulo de Material e Métodos.

Nesse ensaio, analisaram-se as leituras por URL das suspensões de pigmento/ corantes, após inoculação de microrganismos e incubação nos diferentes meios de culturas utilizando-se os métodos 1 e 2. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados são apresentados na tabela 5.12 e 5.13.

Tabela 5.12 Valores de URL do teste Limite de Detecção microbiana da suspensão de pigmento/ corantes, após inoculação e incubação dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Candida albicans* ATCC 10231, nos diferentes meios de culturas pelo método 1.

Amostra	Meios de cultura	<i>B.cepacea</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
FD&C Green 7	TAT	37393	43696	63979	43354
		42228	49886	74721	43087
	LB	24992	57094	62543	23060
		31878	35811	33002	35242
		21720	23210	25130	20882
	DE	20180	23390	22780	20810
FD&C Blue Covanor	TAT	61204	51540	61112	77302
		64514	85337	64514	91116
	LB	58523	51385	68639	18432
		45368	53688	58627	35224
		37393	43354	53688	15204
	DE	34228	43087	51385	11694
FD&C Red nº5	TAT	53135	69025	51223	77302
		68158	91498	98681	91115
	LB	19722	23060	24992	42645
		17700	31878	26237	62540
		11112	16972	12306	22300
	DE	20654	17730	20623	31499

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Letheen Broth

Tabela 5.13 Valores de URL do teste Limite de Detecção microbiana da suspensão de pigmento/ corantes, após inoculação e incubação dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Candida albicans* ATCC 10231 em diferentes meios de culturas pelo método 2.

Amostra	Meios de cultura	<i>B.cepacea</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
FD&C Green 7	TAT	2691	2321	2513	2088
		3422	3087	2278	2156
	LB	2328 3346	2241 2341	2259 2315	2300 2499
	DE	1169	1830	1433	1112
		2154	2018	2339	1169
	TAT	2540 1184	2420 2691	1674 1540	7221 5344
FD&C Blue Covanor	LB	3939	1184	3422	2691
		3422	1352	3739	4335
	DE	1694 1830	2315 2811	1152 1830	2328 2241
FD&C Red nº5	TAT	1883	3346	2259	2328
		2172	2241	2341	3346
	LB	2018 2339	2278 2081	2156 2328	3346 3868
	DE	2315	2259	2241	2278
		2321	3354	2081	4172

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Lethen Broth

Após a leitura por URL das suspensões de pigmento/ corantes com os microrganismos inoculados nos diferentes meios de culturas nos métodos 1 e 2, procedeu-se à verificação da recuperação no teste Limite de Detecção microbiano por UFC/mL. Após a inoculação dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Candida albicans* ATCC 10231 no pigmento e corantes, nos diferentes meios de culturas para os Métodos 1 e 2 , fez-se o plaqueamento e incubação e posterior leitura em UFC/mL, conforme mostra as tabelas 5.14 e 5.15 a seguir.

Conforme mostra a tabela 5.14, para o método 1, o crescimento dos microrganismos no pigmento e nos corantes, foram confirmados por meio da técnica de plaqueamento *pour plate*. Esses resultados foram, também, obtidos por Jimenez (2003). Para o método 2, conforme a tabela 5.15, verificou-se que as leituras de URL das amostras apresentaram-se abaixo da leitura do meio de cultura conforme resultados anteriores da Tabela 5.3.

Para ambos os métodos foram adicionados quantidades idênticas de inóculo dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 8739; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Candida albicans* ATCC 10231 e *Burkholderia cepacea* ATCC 25416 nos meios de cultura teste. No entanto, no método 2 não foi possível à detecção desses microrganismos pela reação de bioluminescência, indicando a interferência para a recuperação desses microrganismos nas suspensões de *Pigmento Green n^o7*, de *Blue Covanor* e de *FD&C Red n^o5* a 1% (p/v), conforme mostra a tabela 5.15.

Tabela 5.14 Comprovação da sensibilidade no teste Limite de Detecção microbiano por UFC/mL da suspensão de pigmento/ corantes após contaminação e incubação dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, nos diferentes meios de culturas para o Método 1.

Amostra	Meio de cultura	<i>B.cepacea</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
<i>FD&C Green 7</i>	<i>TAT</i>	2	2	5	1
		3	2	3	1
	<i>LB</i>	2	1	2	3
		2	1	3	2
	<i>DE</i>	1	1	2	2
		1	1	2	1
	<i>FD&C Blue Covanor</i>	1	2	1	3
		1	3	2	1
	<i>LB</i>	1	2	1	2
		1	1	3	1
	<i>DE</i>	1	2	1	3
		1	1	1	1
<i>FD&C Red nº5</i>	<i>TAT</i>	1	2	3	3
		1	2	1	1
	<i>LB</i>	1	1	1	3
		1	1	2	1
	<i>DE</i>	1	1	1	2
		1	1	1	1

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Letheen Broth

Tabela 5.15 Comprovação da sensibilidade no Limite de Detecção microbiano por UFC/mL da suspensão de pigmento/ corantes após contaminação e incubação dos microorganismos *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231, nos diferentes meios de culturas para o Método 2.

Amostra	Meio de cultura	<i>B.cepacea</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
FD&C Green nº7	TAT	1	2	2	1
		1	1	3	<1
	LB	1	1	1	2
		1	1	3	1
	DE	1	1	2	1
		1	1	2	<1
FD&C Blue Covanor	TAT	1	2	1	2
		1	1	1	1
	LB	1	1	1	1
		1	1	1	<1
	DE	1	1	2	3
		1	1	1	1
FD&C Red nº5	TAT	1	2	1	2
		1	1	1	1
	LB	1	1	1	<1
		1	1	2	2
	DE	1	1	2	2
		1	1	1	1

TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

DE = Dey Engly Neutralization Broth

LB = Letheen Broth

Para o método 2, foi verificado a recuperação de *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacea*, *Staphylococcus aureus*. Para a recuperação da *C. albicans*, o tempo de incubação de 24 horas não foi suficiente. Os valores de URL obtidos

foram inferiores ao método 1 mostrando uma possível interferência. Conforme protocolo do equipamento sugere que a incubação seja realizada em até 48 horas, para espécies que não sejam recuperadas em 24 horas no teste de Limite de Detecção (CELSIS,1998). Ressalta-se que o objetivo desse trabalho foi à avaliação dessas amostras para liberação em 24 horas, assim não foram testadas em 48 horas para possível verificação de recuperação.

Para cada um dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Candida albicans* ATCC 10231 os resultados do teste de Limite de Detecção para os valores de URL foram analisados estatisticamente pela análise de variância multifatorial, planejados experimentalmente por meio do modelo “three-way”, de acordo com o item 4.7 do capítulo Material e Métodos, para maior confiabilidade do ensaio.

Avaliação dos resultados do teste de Limite de Detecção para Burkholderia cepacea ATCC 25416.

A Tabela 5.16 a seguir, mostra a avaliação dos resultados do Limite de Detecção para a *Burkholderia cepacea*, refere-se a análise de variância dos valores encontrados para esse microrganismo. As análises gerais das médias encontradas mostram que os efeitos principais (suspensão de pigmento/corantes, os meios de cultura e os métodos), apresentaram diferenças significativas no ensaio analisado. Foi possível a recuperação desse microrganismo inoculado em pigmento e nos corantes, em todos os meios de cultura e nos métodos 1 e 2, mostrando assim que esse este pode ser detectado em pequenas quantidades.

Tabela 5.16 Análise de variância dos valores de URL suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método no ensaio do Limite de Detecção microbiano da *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Fonte de variação	Soma do desvio quadrático	Grau de liberdade	Média dos desvios quadráticos ou variância estimada	F calculado ou razão de variância	Probabilidade ou nível de significância
Efeito principal					
Corante e Pigmentos (A)	7.6891E8	2	3.8445E8	12.973	*0.0002
Meio de cultura (B)	1.4677E9	2	7.3383E8	24.762	*0.0000
Método (C)	1.0932E10	1	1.0932E10	368.875	*0.0000
Interações					
AB	3.6449E8	4	9.1122E7	3.075	0.0374
AC	7.5931E8	2	3.7965E8	12.811	0.0002
BC	1.4343E9		7.1717E8	24.200	0.0000
Resíduo	6.5199E8	22	29635811		
TOTAL (Corrigido)	1.6379E10	35			

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95% e todos os F calculados ou razão de variância são baseados no erro residual das médias do desvio quadrático ou variância estimada.

A tabela 5.17, refere-se à comparação das médias dos valores de URL da suspensão de pigmento/ corantes no teste Limite de Detecção para *Burkholderia cepacea* dentro do planejamento estatístico. Nessa tabela verificou-se que há

diferença significativa da recuperação entre os resultados apresentados para o pigmento comparado com os corantes. Conforme resultados anteriormente discutidos (Tabela 5.14) confirma-se a recuperação mais adequada desse microrganismo no pigmento. A dificuldade para recuperação nos corantes pode estar relacionada à composição e coloração dos mesmos, que dificulta a leitura do ATP microbiano pelo equipamento.

Tabela 5.17 Comparação das médias dos valores de URL das suspensões de pigmento/ corantes no teste Limite de Detecção para *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
3	12	13064.167	X
2	12	17964.583	X
1	12	28377.000	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		10412.4	4610.19*
1 – 3		15312.8	4610.19*
2- 3		4900.42	4610.19*

- 1 *FD&C Green n°7* (pigmento)
 2 *FD&C Blue Covanor* (corante)
 3 *FD&C Red n°5* (corante)
 * Denota diferença significativa
 Analise com grau de confiança de 95%

Na tabela seguinte, considerando-se os resultados quanto à recuperação do microrganismo, observa-se que há diferenças significativas entre os três meios de

cultura testados. Sugere-se que essas diferenças ocorreram devido à composição dos meios de culturas que favoreceu maior ou menor crescimento.

Tabela 5.18 Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no teste Limite de Detecção para *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
3	12	13064.167	X
2	12	17964.583	X
1	12	28377.000	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		10412.4	4610.19*
1 – 3		15312.8	4610.19*
2- 3		4900.42	4610.19*

1 TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

2 LB = Letheen Broth

3 DE = Dey Engly Neutralization Broth

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

Na tabela a seguir, 5.19, a análise foi realizada com o intuito de confirmar a influência entre os resultados dos métodos 1 e 2. A análise mostrou que mesmo havendo a recuperação desse microrganismo nos dois métodos, o acréscimo do

polissorbato no método 2, pode ter influenciado a recuperação do mesmo (Tabela 5.15).

Tabela 5.19 Comparação das médias dos valores de URL dos métodos 1 e 2, no teste Limite de Detecção para *Burkholderia cepacea* ATCC 25416 , pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
2	18	2375.944	X
1	18	37227.889	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		34851.9	3764.21*

1 Método 1

2 Método 2

* Denota diferença significativa Analise com grau de confiança de 95%

Avaliação dos resultados do teste de Limite de Detecção para *E.coli* ATCC 8739.

Para a *E.coli*, a análise de variância dos valores de URL, conforme tabela 5.20, mostra que não houve diferenças significativas para o teste de Limite de Detecção.

Tabela 5.20 Análise de variância dos valores de URL suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método no ensaio do Limite de Detecção para a *Escherichia coli* ATCC 8739, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Fonte de variação	Soma do desvio quadrático	Grau de liberdade	Média dos desvios quadráticos ou variância estimada	F calculado ou razão de variância	Probabilidade ou nível de significância
Efeito principal					
Pigmento e Corantes (A)	6.5021E8	2	3.2510E8	2.789	0.0833
Meio de cultura (B)	2.2273E9	2	1.1136E9	9.552	0.0010
Método (C)	1.9334E10	1	1.9334E10	165.840	0.0000
Interações					
AB	9.1136E8	4	2.2784E8	1.954	0.1370
AC	6.5047E8	2	3.2523E8	2.790	0.0832
BC	2.1944E9	2	1.0972E9	9.411	0.0011
Resíduo	2.5648E9	22	1.1658E8		
TOTAL (Corrigido)	2.8533E10	35			

Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95% e todos os F calculados ou razão de variância são baseados no erro residual das médias do desvio quadrático ou variância estimada.

Na tabela 5.21 da comparação das médias dos valores de URL da suspensão de pigmento/ corantes para o teste de Limite de Detecção para *Escherichia coli*, foi

observado que a recuperação desse microrganismo apresentou diferença significativa para os corantes *FD&C Blue Covanor* e *FD&C Red nº5*. Essa diferença não foi observada para o pigmento *Green nº7*, conforme a Tabela 5.14, apresentando melhor recuperação do pigmento do que dos corantes para esse ensaio. Como observado para a recuperação da *B. cepacea*, o pigmento apresentou uma melhor recuperação, devido a sua composição e coloração, enquanto que os corantes podem dificultar a leitura do URL pelo equipamento.

Tabela 5.21 Comparação das médias dos valores de URL da suspensão de pigmento/ corantes no teste de Limite de Detecção para *Escherichia coli* ATCC 8739, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos	
3	12	20622.333	X	
1	12	24607.667	X	X
2	12	30943.500	X	
Contraste		Diferença +/-	Limites	
1 – 2		-6335.83	9143.81	
1 – 3		3985.33	9143.81	
2 – 3		10321.2	9143.81*	

- 1 *FD&C Green nº7* (pigmento)
 2 *FD&C Blue Covanor* (corante)
 3 *FD&C Red nº5*
 * Denota diferença significativa
 Analise com grau de confiança de 95%

Ao avaliar as médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio no teste de Limite de Detecção para a *Escherichia coli*, conforme mostra a tabela a

seguir 5.22, verificou-se que o meio de cultura *TAT* apresentou diferença significativa entre os dois outros meios *LB* e *DE* para recuperação desse microrganismo. Os meios de cultura *LB* e *DE* não apresentaram diferença entre eles para a recuperação. Considerando a composição dos meios de cultura, o *TAT* é semelhante ao *LB*, porém o *TAT* apresentou condições para um ótimo crescimento microbiano no experimento. Esses resultados corroboram com a literatura, onde o meio de cultura *TAT* apresentou uma ótima eficiência para o método de bioluminescência (JIMENEZ,L.,2001).

Tabela 5.22 Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio no teste de Limite de Detecção para *Escherichia coli* ATCC 8739, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
3	12	16415.667	X
2	12	24188.250	X
1	12	35569.583	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		11381.3	9143.81 *
1 – 3		19153.9	9143.81 *
2 – 3		7772.58	9143.81

- 1 *TAT* = *Tryptone-Azolectin-Tween*
 2 *LB* = *Lethen Broth*
 3 *DE* = *Dey Engly Neutralization Broth*

* Denota diferença significativa
 Análise com grau de confiança de 95%

A tabela a seguir, 5.23, mostra a comparação das médias dos valores de URL nos métodos 1 e 2, para *Escherichia coli* mostrando que há diferença

significativa de recuperação entre os dois métodos. Os resultados sugerem que essa diferença está relacionada com o acréscimo de polissorbato no método 2 que pode ter interferido, diminuindo a sensibilidade para a recuperação desse microrganismo no teste Limite de Detecção.

Tabela 5.23 Comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no teste Limite de Detecção para *Escherichia coli* ATCC 8739, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
2	18	2216.667	X
1	18	48565.667	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		46349.0	7465.89 *

1 Método 1

2 Método 2

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

Avaliação dos resultados do teste de Limite de Detecção para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Observa-se a seguir, as análises de variância dos valores de URL suspensão de pigmento/ corantes, meios de cultura e métodos para *Staphylococcus aureus*, no

ensaio do Limite de Detecção microbiano. Houve diferenças significativas entre os meios de cultura e os métodos, de acordo com a tabela 5.24, comportamento semelhante a *Escherichia coli*.

Tabela 5.24 Análise de variância dos valores de URL para método, meio de cultura e amostra no ensaio do Limite de Detecção microbiano para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Fonte de variação	Soma do desvio quadrático	Grau de liberdade	Média dos desvios quadráticos ou variância estimada	F calculado ou razão de variância	Probabilidade ou nível de significância
Efeito principal					
Pigmento e Corantes (A)	4.1461E8	2	2.0730E8	2.318	0.1221
Meio de cultura (B)	2.1559E9	2	1.0779E9	12.051	0.0003*
Método (C)	1.6447E10	1	1.6447E10	183.870	0.0000*
Interações					
AB	8.5631E8	4	2.1408E8	2.393	0.0815
AC	4.4683E8	2	2.2342E8	2.498	0.1053
BC	2.0766E9	2	1.0383E9	11.608	0.0004*
Resíduo	1.9679E9	22	89448042		
TOTAL (Corrigido)	2.4365E10	35			

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95% e todos os F calculados ou razão de variância são baseados no erro

Para as suspensões de pigmento e corantes a comparação das médias dos valores de URL para o teste Limite de Detecção para *Staphylococcus aureus*, não apresentou diferença significativa entre elas conforme a tabela a seguir.

Tabela 5.25 Comparação das médias dos valores de URL da suspensão pigmento/ corantes no teste de Limite de Detecção para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
3	12	20577.083	X
2	12	22143.500	X
1	12	28430.333	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		-7853.25	8009.33
1 – 3		-1566.42	8009.33
2 – 3		6286.83	8009.33

1 FD&C Green nº7 (pigmento)

2 FD&C Blue Covanor (corante)

3 FD&C Red nº5

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

A tabela a seguir mostra a comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio no ensaio Limite de Detecção para *Staphylococcus aureus*, mostrando que houve diferença significativa entre o meio de cultura TAT em

comparação com os meios de cultura *LB* e *DE* para a recuperação desse microrganismo. Os meios de cultura *LB* e *DE* não mostram diferença significativa entre eles, apresentando resultados comum entre os dois. Confirmando os resultados anteriores, quanto à recuperação do microrganismo, verificou-se que o meio *TAT* foi o mais adequado, permitindo melhor recuperação desse microrganismo, conforme Tabelas 5.14 e 5.15.

Tabela 5.26 Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no ensaio no teste de Limite de Detecção para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
3	12	15194.167	X
2	12	22032.750	X
1	12	33924.000	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		11891.3	8009.33 *
1 – 3		18729.8	8009.33 *
2 – 3		6838.58	8009.33

- 1 *TAT* = *Tryptone-Azolectin-Tween*
 2 *LB* = *Lethen Broth*
 3 *DE* = *Dey Engly Neutralization Broth*

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

A comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no ensaio de recuperação para *Staphylococcus aureus*, conforme tabela a 5.27 a seguir, mostra diferença significativa entre os dois métodos 1 e 2 para recuperação desse

microrganismo. Essa diferença pode estar relacionada com a adição de tensoativos como discutidas e justificadas anteriormente.

Tabela 5.27 Comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no ensaio teste de Limite de Detecção para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
2	18	2342.778	X
1	18	45091.167	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		42748.4	6539.59 *

1 Método 1

2 Método 2

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

Avaliação dos resultados do teste de Limite de Detecção para *Candida albicans* ATCC 10231.

A análise de variância dos valores de URL para a suspensão de pigmento/ corantes, o meio de cultura e o método no teste do Limite de Detecção microbiano para a *Candida albicans*, apresentaram interações com todos os efeitos principais.

Tabela 5.28 Análise de variância dos valores de URL suspensão de pigmento/ corantes, meio de cultura e método de no teste Limite de Detecção microbiano para a *Candida albicans* ATCC 10231, planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Fonte de variação	Soma do desvio quadrático	Grau de liberdade	Média dos desvios quadráticos ou variância estimada	F calculado ou razão de variância	Probabilidade ou nível de Significância
Efeito principal					
Pigmento e Corantes (A)	9.2484E8	2	4.6242E8	7.411	0.0035*
Meio de cultura (B)	4.1712E9	2	2.0856E9	33.427	0.0000*
Método (C)	1.3923E10	1	1.3923E10	223.154	0.0000*
Interações					
AB	8.6835E8	4	2.1709E8	3.479	0.0240*
AC	7.5214E8	2	3.7607E8	6.027	0.0000*
BC	3.7249E9	2	1.8625E9	29.850	0.0082*
Resíduo	1.3727E9	22	62393902		
TOTAL (Corrigido)	2.5738E10	35			

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95% e todos os F calculados ou razão de variância são baseados no erro

As médias de comparação dos valores de URL para as suspensões de pigmento e corantes no teste de Limite de Detecção para *Candida albicans*, mostra que houve diferença significativa entre a recuperação desse microrganismo para o pigmento e os corantes. O pigmento apresentou melhor recuperação desse

microrganismo do que os corantes. Comportamento semelhante foi observado e discutido para os outros microrganismos estudados.

Tabela 5.29 Comparação das médias dos valores de URL das suspensões de pigmento/ corantes no teste de Limite de Detecção para a *Candida albicans* ATCC 10231, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos	
3	12	16479.917	X	
2	12	22761.000	X	X
1	12	28894.917	X	
Contraste		Diferença +/-	Limites	
1 – 2		-6281.08	6689.32	
1 – 3		-12415.0	6689.32*	
2 – 3		-6133.92	6689.32	

1 FD&C Green nº7 (pigmento)

2 FD&C Blue Covanor (corante)

3 FD&C Red nº5 (corante)

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

A Tabela 5.30 apresenta o comportamento das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no teste de Limite de Detecção para *Candida albicans*. Houve diferença significativa entre os três meios de cultura para a recuperação desse microrganismo. As diferentes composições desses meios podem ter colaborado para a diferente recuperação desse microrganismo. Por outro lado, na validação do

método de ATP bioluminescência para leveduras como a *C.albicans*, o protocolo sugere que sejam usados outros meios específicos para a recuperação de fungos (Celsis,1998).

Tabela 5.30 Comparação das médias dos valores de URL dos meios de cultura, no teste de Limite de Detecção para *Candida albicans* ATCC 10231, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*.

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
3	12	11307.417	X
2	12	19681.833	X
1	12	37146.583	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		17464.8	6689.32 *
1 – 3		25839.2	6689.32 *
2 – 3		8374.42	6689.32 *

1 TAT = Tryptone-Azolectin-Tween

2 LB = Letheen Broth

3 DE = Dey Engly Neutralization Broth

* Denota diferença significativa

Análise com grau de confiança de 95%

A comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no teste de Limite de Detecção para *Candida albicans*, verificou-se que há uma diferença significativa entre esses métodos para a recuperação do microrganismo. No método 2, não foi possível recuperá-lo em 24 horas, no entanto o protocolo do equipamento

sugere a incubação de 48 horas para recuperação, procedimento esse não efetuado conforme comentado anteriormente.

Tabela 5.31 Comparação das médias dos valores de URL dos métodos, 1 e 2, no teste Limite de Detecção para *Candida albicans* ATCC 10231, pelo método de diferença mínima significativa (LSD Fisher) do planejamento estatístico do experimento com a matriz de ensaio tipo *three-way*

Nível	Quantidade	Diferença mínima entre média	Grupos homogêneos
2	18	3045.667	X
1	18	42378.222	X
Contraste		Diferença +/-	Limites
1 – 2		39332.6	5461.81 *

1 Método 1

2 Método 2

* Denota diferença significativa
Análise com grau de confiança de 95%

Em relação aos resultados dos experimentos discutidos no trabalho, que envolveu o desenvolvimento, seleção e validação de método alternativo, para a avaliação da qualidade microbiana do pigmento *Green* № 7 e dos corantes *FD&C Blue Covanor* e o *FD&C Red* № 5 (classe xantenos) pode-se tecer comentários finais, apresentados a seguir.

No experimento, o ensaio foi assegurado com a descontaminação das amostras e a verificação da eficiência do equipamento, seguindo o seu protocolo. Após as avaliações iniciais, foram realizados os testes para validação do método 1 e 2, o Teste de Efeito da Amostra, onde foi possível verificar que não houve inibição

da reação de bioluminescência para os meios de cultura e para as suspensões de pigmento *Green Nº 7*. Em relação aos corantes nos diferentes meios de cultura, observou-se uma possível interferência desses na reação. As interpretações dos resultados sugeridas pelo manual do equipamento e pela análise estatística foram coincidentes. Observou-se que para os corantes ocorreu influência do efeito da amostra, principalmente para o *FD&C Red Nº5*. Em relação à comparação dos métodos não houve diferença estatística de comportamento quando analisados. O acréscimo de polissorbato não proporcionou melhores resultados de leitura de URL na dispersão do pigmento e corantes, portanto, sugere-se que economicamente é mais adequado utilizar o método 1, para os testes de Efeito da Amostra. Considerando a seleção do meio de cultura, o *TAT* (Tryptone-Azolectin-Tween), foi o que menos interferiu nas leituras do URL para o teste Efeito da Amostra e apresentou a melhor eficiência.

A USP XXVIII no capítulo <1227> aborda na validação de métodos microbiológicos a recuperação de microrganismo. De acordo com a validação do método ATP-bioluminescência há, também, a verificação da recuperação do microrganismo no teste de Limite de Detecção. Esse ensaio apresenta limites de cargas de até uma (1) UFC/mL, descrito no manual do equipamento e na literatura (JIMENEZ ,2003; MORRIS, 1998, CELSIS, 1998). No experimento, resultados semelhantes foram obtidos com a mesma sensibilidade e corroborando com os descritos.

Nielsen and Van Dellen,1989, mencionaram que para a validação da metodologia analítica de matérias-primas empregando o método de

bioluminescência, devemos considerar outras condições, como a contribuição do resultado da reação falso-positivo do ATP não microbiano na amostra e a degradação do reagente de ATP, que proporciona resultados falso-negativos. Por estes motivos existe dificuldade na escolha do meio de cultura, sendo necessário proceder todas as etapas de validação para maior confiabilidade de resultados .

A presença do pigmento e corantes, nos meios de cultura não influenciou na recuperação dos microrganismos. Portanto, o método apresentou-se sensível pois pode detectar a presença de cargas baixas de microrganismos mesmo na presença de substâncias coloridas.

O método de ATP- bioluminescência estudado pode ser utilizado para avaliar a qualidade microbiana do pigmento o *FD&C Green No7*, pelo método 1, com o meio de cultura *TAT*, pois os resultados dos experimentos mostraram que atendem as especificações dos testes de Efeito da Amostra e Limite de Detecção, portanto com método validado e com rápida liberação de resultados.

Para os corantes, o método requer ainda estudo, pesquisando-se outras condições, como modificação do meio de cultura, ou acréscimo de nutrientes diferentes nos meios de cultura; a diluição da amostra e o aumento do tempo de incubação conforme citado no item 2.6.6 no capítulo de Revisão. Para Nielsen and Van Dellen (1989), por ser a técnica de bioluminescência muito sensível e por ter a flexibilidade de utilizar diferentes meios de cultura e permitir a adição de outros componentes, facilita a detecção de microrganismos nas amostras.

Um aspecto importante a ser ressaltado é que as amostras do experimento apresentavam composição simples, suspensão do pigmento ou corante, mas requereram estudo criterioso e trabalhoso, para escolha das condições experimentais, e o auxílio da estatística propiciou adequada análise para essa escolha. Para formulações de cosméticos que são complexas, apresentando vários componentes, formas de apresentação diversas, colorações variadas com corantes e pigmentos, requer maior desafio na validação do método de ATP bioluminescência. Portanto, o desenvolvimento do método é desafiante, porém a partir da seleção e validação desse, as análises das amostras tornam-se confiáveis e os resultados são obtidos em um tempo menor, quando comparadas com os métodos tradicionais, o que pode refletir na economia para a empresa.

Quanto aos meios de cultura estudados, de forma geral, propiciaram a recuperação das bactérias. No teste de limite de detecção, o *TAT* (Tryptone-Azolectin-Tween) apresentou-se como o melhor meio para a recuperação dos microrganismos.

Para o fungo, os meios de cultura estudados não se apresentaram adequados para a recuperação em 24 horas, levando a um resultado falso negativo. Segundo Jimenez (2003), é necessário um tempo maior de incubação, e um meio de cultura seletivo para fungos.

Ignar et al. 1996, pesquisaram a detecção da presença de microrganismos contaminantes em formulações de dentifrícios com triclosan. As suspensões dentifrícias foram inoculadas com bactérias e fungos, para ser detectado no período

de 24 horas, após incubação, usando o meio de cultura *TAT* enriquecido. O meio estudado continha diferentes concentrações dos seguintes componentes: polissorbato 80 (tensoativo), neopeptona, dextrose, *Triton*^R X-100, tiosulfato de sódio, fosfato de sódio dibásico e glicina. No período de 24 horas de incubação, as bactérias foram detectadas. Nesse estudo não foi detectado o fungo, em até 27 horas após incubação e para redução do tempo de detecção desse fungo, um novo meio de cultura foi formulado com a adição de dextrose, neopeptona, e tiosulfato de sódio. Os resultados indicaram que a contaminação foi detectada em 48 horas do período de incubação. Portanto, a adição de nutrientes como a dextrose, neopeptona, para isolar e cultivar fungos e o meio de cultura *TAT* com polissorbato 80 a 4%, promoveu o crescimento do mesmo e o tiosulfato de sódio promoveu a neutralização do agente antimicrobiano (triclosan), por meio da inibição química. Com este enfoque Meighan et al (1997) estudaram diferentes meios de cultura e verificou que era possível a recuperação de fungo em 24 horas quando foi utilizado meio seletivo.

Para esporos bacterianos, devem-se aprofundar os estudos do método de ATP-bioluminescência, pois o tempo de incubação de 24 horas no experimento, não foi suficiente para a sua avaliação.

Os resultados mostraram que, mesmo sendo inoculada a mesma carga microbiana, a recuperação pelo método 1 foi mais eficiente para as bactérias, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e para o fungo o *Candida albicans* ATCC 10231. No método 2 a recuperação adequada do fungo não foi possível, sugerindo a utilização de meio

de cultura seletivo, interferência do polissorbato 80 adicionado nos meios e o tempo de incubação, como anteriormente discutido.

A análise dos resultados indicou que para corantes *FD&C Blue Covanor* e *FD&C Red No5* as condições estudadas não foram adequadas para a recuperação dos microrganismos para o método 2, sugerindo que a adição do tensoativo interferiu nessa condição, sugere-se que a presença deste pode estar interferindo na viabilidade dos microrganismos. Em relação ao efeito da amostra para os corantes, a leitura em URL mostrou-se acima do limite estabelecido pelo protocolo, indicando a interferência da amostra. No protocolo estabelece como procedimento, nesses casos, a diluição do corante para que a leitura se encontre nos limites estabelecidos. No entanto, nos experimentos optou-se por não realizar esse procedimento, pois a sensibilidade do método seria prejudicada. Para uma investigação mais criteriosa seria necessário estudar outros meios de cultura, reagentes e condições que propiciassem resultados adequados em conformidade com as especificações da validação.

Para o pigmento *FD&C Green No7* foi possível obter condições adequadas para teste de efeito de amostra e para o teste de recuperação dos microrganismos, com exceção da *Candida albicans* ATCC 10231. As melhores condições foram com o meio de cultura *TAT* e o com o método 1, selecionadas para a validação do método de ATP-bioluminescência.

O planejamento estatístico de experimento e análise, embora não recomendada pelo protocolo de validação foi útil e conveniente, permitindo análise

dos resultados com maior confiabilidade. Foi possível avaliar de maneira criteriosa e objetiva a influencia dos efeitos principais, pigmento e corantes, meios de cultura e métodos, ficando assim como sugestão, utilizar como ferramenta de análise estatística para validação do método de ATP-bioluminescência.

De acordo com o estudo, mesmo produtos cosméticos coloridos podem ser analisados pelo método de bioluminescência. No entanto, é necessário inicialmente um estudo pormenorizado da composição dos pigmentos e corantes, pois podem ocorrer interferências na reação de ATP-bioluminescência. Como descrito na revisão de literatura item 2.2.1, os pigmentos, em geral, apresentam-se mais hidrossolúveis que os corantes, são opacos e apresentam substâncias que permitem grau de cobertura elevada do produto e a possibilidade de adicionar substâncias micronizados e óleo. Os corantes *FD&C Blue Covanor* e *FD&C Red Nº5*, do grupo xantenos, apresentam substâncias muito insolúveis na composição, o que poderiam dificultar a dispersão da amostra no meio de cultura. Finalmente a formulação cosmética deve, também, ser analisada, pois os componentes da formulação podem interferir na reação de ATP bioluminescência.

O método de ATP-bioluminescência é um método alternativo, rápido que possibilita a otimização na análise e liberação de produtos pelo controle de qualidade para indústrias de matérias-primas, alimentos, cosméticas e farmacêuticas, diminuindo estoques, porém deve-se proceder à validação desse para cada matéria-prima e ou produto para que possa ter a garantia dos resultados (JIMENEZ,2000).

6.CONCLUSÃO

- Na avaliação da qualidade microbiana do pigmento *Green Nº 7* (a base de óxido de cromo), a combinação do método 1 com o meio de cultura o *TAT* (*Tryptone-Azolectin-Tween*) foram a melhor condição para a validação do método de ATP-bioluminescência .

- Para os corantes *FD&C Blue Covanor* (classe xantenos) e o *FD&C Red Nº 5* (classe xantenos), a validação do método de ATP-bioluminescência não foi possível dentro das condições experimentais.

- Os meios de cultura *TAT* (*Tryptone-Azolectin-Tween*), o *DE* (*Dey Engly Neutralization Broth*) e o *LB* (*Lethen Broth*), foram adequados na validação do método de ATP-bioluminescência, pois promoveram crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 .

- O acréscimo de polissorbato 80 nos meios de cultura *TAT*, *LB* e *DE* não favoreceu melhor análise do pigmento *Green Nº 7* e corantes *FD&C Blue Covanor* e o *FD&C Red Nº 5* pelo método de bioluminescência.

RESUMO

Angela, F.M. **Qualidade Microbiana: Influência de Corantes e Pigmento no Método de Bioluminescência**. 2005. 145f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A análise da qualidade microbiana de matérias-primas e de produtos por meio da técnica convencional de contagem de microrganismos exige demanda elevada de trabalho e fornece resultados em período de tempo não compatível com o desenvolvimento da tecnologia. A indústria farmacêutica e cosmética necessita de liberação rápida de seus produtos, assim métodos alternativos podem reduzir o tempo de trabalho e custo. O método de ATP bioluminescência detecta a presença ou ausência de microrganismos em até 24 horas. O método baseia-se na reação do ATP (adenosina trifosfato) provenientes do microrganismo com o complexo luciferina – luciferase, produzindo luz. Os componentes da formulação de produtos cosméticos, como os corantes e os pigmentos podem interferir na reação e influenciar na leitura da Unidade Relativa de Luz (URL). O objetivo do experimento foi validar método de ATP bioluminescência para avaliação da qualidade microbiana do pigmento *Green* Nº 7 e dos corantes *FD&C Blue Covanor* e o *FD&C Red* Nº 5, usados em produtos cosméticos, verificando se esses podem interferir na reação de ATP-bioluminescência, utilizando os meios de cultura *TAT* (*Tryptone-Azolectin-Tween*), *DE* (*Dey Engly Neutralization Broth*) e *LB* (*Letheen Broth*). A primeira etapa da validação do sistema ATP bioluminescência foi determinar o Efeito da Amostra nas suspensões o qual verifica a presença de ATP não microbiano. A sensibilidade do ensaio foi analisada por meio do teste de limite de detecção inoculando-se os microorganismos *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 na suspensão das amostras. Para *C. albicans* não foi possível a detecção pois houve a necessidade de tempo maior de incubação. O meio de cultura *TAT* sem acréscimo de polissorbato 80 apresentou as melhores condições para a validação do pigmento *Green* Nº 7. Para corantes há necessidade ainda de uma

investigação mais criteriosa, estudando outros meios de cultura, reagentes e condições que propiciem resultados adequados em conformidade com as especificações para a validação.

Palavras chaves:

ATP bioluminescência, métodos rápidos, pigmento, corantes, qualidade microbiana, meia de cultura, Unidade Relativa de Luz (URL), validação.

ABSTRACT

Angela, F.M. **Microbiology quality: Influence of dyes and pigment to bioluminescence method.** 2005. 145f. Paper Master's (degree)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The analysis of the microbiology quality of raw materials and finished products by means of the conventional technique of counting of microorganism demands high time of work and supplies resulted in period of not compatible time with the development of the technology. The rapid methods provide reliable and cost effective analysis for the microbiological evaluation the pharmaceutical and cosmetic industry. The ATP Bioluminescence detect the presence or absence of microorganisms the reduction in detection times and analysis from 72 hours to 24 hours. The bioluminescence assay is based upon the light-producing enzyme luciferase that will hydrolyze ATP to produce light. Light production is detected by a luminometer and recorded as relative light units (RLU). The purpose of this investigation was to develop and validate the use an ATP bioluminescence assay for detection microbial contamination in artificially contaminated commercial *Green* № 7 pigment and *FD&C Blue Covanol* e o *FD&C Red* № 5 dyes with some microbial cultures, *TAT* (*Tryptone-Azolectin-Tween*), *DE* (*Dey Engly Neutralization Broth*) e *LB* (*Lethen Broth*), and to compare the results against standard microbiological analysis. The first step in validation of the ATP bioluminescence system was to determine the sample effect of the sample suspensions on the bioluminescence reaction where analyzed to determine whether the sample contained nonmicrobial ATP. The sensitivity of the assay to detect different levels of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Burkholderia cepacea* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 was analyzed by spiking into the samples suspensions. For *C. albicans* contamination detection has not been possible because it has required more time than bacteria. The microbial culture *TAT* without addition of polissorbato 80 has presented the best conditions for the validation of the *Green* pigment nº 7. For dyes has still been necessity of studying other microbial culture, reagents and conditions that they propitiate resulted adequate in compliance with the specifications for the validation.

Key words:

ATP Bioluminescence, rapid methods, pigment, dyes, microbiology quality, microbial cultures, Relative Light Units (RLU), validation.

REFERÊNCIAS *

- ABDULLAH, B.; GARDINI, F.; GUERZONI, M.E.; RUOCCO, G. Suitability of bioluminescence for evaluation of microbiological quality of hamburgers. **Ind. Aliment.**, Pinerolo, v.31, n.302, p.201-204, 1992.
- ALFENORE, S.; DÉLIA, M.L.; STREHAIANO, P. Use of ATP measurements by bioluminescence to quantify yeast's sensitivity against a killer toxin. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.495, p.217-224, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA INDÚSTRIA QUÍMICA –ABIQUIM- CORANTES E PIGMENTOS. Disponível em <<http://www.abiquim.org.br?canais.asp?id=15>> Acesso em :02 out.2004
- ARAKAWA, H.; MAEDA, M.; TSUJI, A. Chemiluminescent assay of B-D-galactosidase based on indol e luminescence. **J. Biolumin. Chemilumin.**, Chichester, v.13, p.349-354, 1998.
- BAUTISTA, D.A.; SPRUNG, D.W.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. A sampling regime based on an ATP bioluminescence assay to assess the quality of poultry carcasses at critical control point during processing. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.30, n.10, p.803-809, 1997.
- BILLARD, P.; DUBOW, M.S. Bioluminescence-based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories. **Clin. Biochem.**, New York, v.31, n.1, p.1-14, 1998.
- BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.50, p.119-130, 1999.

*As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI)2004.

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**. New York: John Wiley, 1978. 653P.

BUSSEY, D.M.; TSUJI, K. Bioluminescence for USP sterility testing of pharmaceutical products. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.51, p.349-355, 1998.

CAMPA, A.; COLEPICOLO, P. Bioluminescência: aplicações analíticas de interesse para o diagnóstico clínico. **Rev. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.16, p.79-89, 1995.

CELSIS PRODUCT GROUP. **Guía validación el conjunto producto cosmético: Introducción**. México: Celsis Product Group, 1998. 4p.

CONNOLLY, P.; BLOOMFIELD, S.F.; DENYER, S.P. A study of the use of rapid method for preservative efficacy testing of pharmaceutical and cosmetics. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.76, p.68-74, 1994.

CORBITT, A.J.; BENNION, N.; FORSYTHE, S.J. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.30, n.6, p.443-447, 2000.

DAVIDSON, A.C.; GRIFFITH, J.C.; PETERS, C.A.; FIELDING, L.M. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness – ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. **Luminescence**, Bognor Regis, v.14, p.33-38, 1999.

DELAHAYE, E.; WELTÉ, B.; LEVI, Y.; LEBLON, G.; MONTIEL, A. An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network. **Water Res.**, Amsterdam, v.37, p.3689-3696, 2003.

DEXTER, S.J.; CÁMARA, M.; DAVIES, M.; SHAKESHEFF, K.M. Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. **Biomaterials**, Amsterdam, v.24, p.27-34, 2003.

- FRANCO, B.D.G.M. Métodos alternativos de análise microbiológica de alimentos: uma revisão. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.33, n.2, p.229-234, 1999.
- FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Estimation of bacterial concentrations in commercial foods by measuring ATP changes during incubation. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, Tokyo, v.44, n.2, p.83-88, 2003.
- GIFFEL, M.C.; MEEUWISSE, J.; JONG, P. Control of milk processing based on rapid detection of microorganisms. **Food Control**, Amsterdam, v.12, p.305-309, 2001.
- GREEN, S.I. **Rapid microbiological methods: a case study**. New Jersey: Celsis, 1999. 3p. [Relatório Técnico].
- GRIFFITH, C.J.; COOPER, R.A.; GILMORE, J.; DAVIES, C.; LEWIS, M. An evaluation of hospital leaning regimes and standards. **J. Hosp. Infect.**, New York, v.45, n.1, p.19-28, 2000.
- HARBER, M.J. Applications of luminiscence in clinical microbiology. In: KRICKA, L.J.; STANLEY, P.E.; THORPE, G.H.P., eds. **Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence**: based on the proceedings of the third International Symposium on Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence. London: Academic Press, 1984. p.3-16.
- HAYES, G.D.; SCALLAN, A.J.; WONG, J.H.F. Applying statistical process control to monitor and evaluate the hazard analysis critical control point hygiene data. **Food Control**, Amsterdam, v.8, n.4, p.173-176, 1997.
- IGNAR, R.; ENGLISH, D.; JIMENEZ, L. **Optimization of the Celsis ATP bioluminescence assay for the detection of microbial contamination in triclosan and high fluoride dentrifices**. Jersey City: Block Drug Company, 1997. p.1-4. (1997 ASM Meeting - Paper, n.Q46). Disponível em: http://www.celsis.com/products/articles_list.php. Acesso em: 16 jan. 2003.

- ISHIDA, A.; YOSHIKAWA, T.; NAKAZAWA, T.; KAMIDATE, T. Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using Diethylaminoethyl-Dextran. **Anal. Biochem.**, New York, v.305, p.236-241, 2002.
- JIMENEZ, L.; IGNAR, R.; REID, W. **Rapid detection of microbiological contamination dentifrices formulations using ATP bioluminescence assays.** New Jersey: Celsis, 1993. 4p. (1996 ASM Paper, n. Q26). [Relatório Técnico].
- JIMENEZ, L.; SMALLS, S. Molecular detection of *Burkholderia cepacia* in toiletry, cosmetic, and pharmaceutical raw materials and finished products. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.83, n.4, p.963-966, 2000.
- JIMENEZ, L. Molecular diagnosis of microbial contamination in cosmetic and pharmaceutical products: a review. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.84, n.3, p.671-675, 2001a.
- JIMENEZ, L. Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, Bethesda, v.55, n.5, p.278-285, 2001b.
- JIMENEZ, L. ATP bioluminescence: detecting microbial contamination in dentifrices. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.118, n.2, p.67-72, 2003.
- JIN, Y.; SAMARANAYAKE, P.L.; SAMARANAYAKE, Y.; YIP, H.K. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Arch. Oral Biol.**, Amsterdam, v.49, p.789-798, 2004.
- JUNGERMANN, E.; SONNTAG, N.O.V., eds. **Glycerine: a key cosmetic ingredient.** New York: Marcell Dekker, 1991. 460p. (Cosmetic Science and Technology Series, v.11).
- KODAKA, H.; FUKUDA, K.; MIZUOCHI, S.; HORIGOME, K. Adenosine triphosphate content of microorganisms related with food spoilage. **Nihon Shokuhin Biseibutsu Gakkai Zasshi**, Tokyo, v.13, n.1, p.29-34, 1996.

KOHEN, E.; HIRSCHBERG, J.G., eds. **Cell structure and function by microspectrofluorometry**. San Diego: Academic Press, 1989. 465p.

KYRIAKIDES, A.L.; PATEL, P.D. Luminescence techniques for microbiological analysis of foods. In: PATEL, P.D., ed. **Rapid analysis techniques in food microbiology, luminescence techniques for microbiological analysis of foods**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. v.11, p.196-231.

LAPPALAINEN, J.; LOIKKANEN, S.; HAVANA, M.; KARP, M.; SJOBERG, AM.; WIRTANEN, G. Microbial testing methods for detection of residual cleaning agents and disinfectants-prevention of ATP bioluminescence measurement errors in the food industry. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, n.2, p.210-215, 2000.

LA ROSSA, R.A. **Bioluminescence methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 1998. 310p. (Methods in Molecular Biology, v.102).

LARSON, E.L.; AIELLO, E.A.; DUARTE, G.C.; LIN, X.S.; LEE, L.; DELLA-LATTA, P.; LINDHARDT, C. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. **Nihon Shokuhin Biseibutsu Gakkai Zasshi**, Tokyo, v.20, p.735-739, 2003.

LEE, J.; DEININGER, R.A. Detection of E. coli in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. **Luminescence**, Bognor Regis, v.19, n.1, p.31-36, 2004.

LEE, J.; DEININGER, R.A.; FLEECE, R.M. Rapid determination of bacteria in pools. **J. Environ. Health**, Denver, v.64, n.1, p.9-14, 2001.

LEHTOLA, J.M.; MIETTINEN, T.I.; KEINANEN, M.M.; KEKKI, K.T.; LAINE, O.; HIRVONEN, A.; VARTIAINEN, T.; MARTIKAINEN, J.P. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. **Water Res.**, Amsterdam, v.38, p.3769-3779, 2004.

- LERANOZ, S. Modificación de la tecnica de bioluminescência em presença de tensioactivos aniónicos sulfatados. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 15, Buenos Aires, 2001. **Libro de Trabajós**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Químicos Cosméticos/International Federation of Societies of Cosmetic Chemists, 2001. p.37-46.
- MALIK, R.E.; COOPER, R.A.; GRIFFITH, C.J. Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals. **Am. J. Infect. Control**, Saint Louis, v.31, n.3, p.181-187, 2003.
- MARENA, C.; LODOLA, L.; ZECCA, M.; BULGHERONI, A.; CARRETTO, E.; MASERATI, R.; ZAMBIANCHI, L. Assessment of handwashing practices with chemical and microbiologic methods: preliminary results from a prospective crossover study. **Am. J. Infect. Control**, Saint Louis, v.30, n.6, p.334-340, 2002.
- MARINO, G.; MAIER, C.; CUNDELL, A.M. A comparison of the Micro Count Digital System to plate count and membrane filtration methods for the enumeration of microorganisms in water for pharmaceutical purposes. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, Bethesda, v.54, n.3, p.172-192, 2000.
- MEIGHAN, P.; NELSON, D.; LAYTE, K.; FOOTE, N. **Rapid and reliable detection of molds within 24 hours**. (1997 ASM Meeting – Paper, n.Q037). Disponível em: <http://www.celsis.com/products/pdfs/cels0150.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2003.
- MONZÓN, M.; OTEIZA, C.; LEIVA, J.; LAMATA, M.; AMORENA, B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.44, n.4, p.319-324, 2002.
- MOORE, G; GRIFFITH, C. A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: an industry trial. **Int. J. Environ. Health Res.**, Basingstoke, v.12, n.4, p.317-29, 2002.

- MORRIS, H.C. The benefits of rapid microbiological testing of finished products using ATP bioluminescence. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.20, n.1, p.63-67, 1998.
- MORWOOD, K.; ABLEY, E.; KAY, J.; LING, T.; JOHNSON, R.; TODD, A.; MORRIS, H. **The evaluation, validation and implementation of ATP bioluminescence technology for the microbiological examination of personal care products.** (1997 ASM Meeting – Paper, n.Q 47). Disponível em: <http://www.celsis.com/products/pdfs/cels0148.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2003.
- MYDDLETON, W.W. Chemistry of oils, fats and waxes. In: HIBBOTT, H.W., ed. **Handbook of cosmetic science: an introduction to principles and applications.** Oxford: Pergamon Press, 1963. p.59-77.
- NIELSEN, P.; VAN DELLEN, E. Rapid bacteriological screening of cosmetic raw materials by using Bioluminescence. **J. -Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.72, n.5, p.708-711, 1989.
- OBEE, P.C.; GRIFFITH, C.J.; COOPER, R.A.; COOKE, R.P.; BENNION, N.E.; LEWIS, M. Real-time monitoring in managing the decontamination of flexible gastrointestinal endoscopes. **Am. J. Infect. Control**, Saint Louis, v.33, n.4, p.202-206, 2005.
- ODEBRECHT, E.; SCHMIDT, H.J.; FRANCO, B.D.G.M. Avaliação do desempenho de dois equipamentos e um kit que medem a bioluminescência para determinar a eficiência dos cip de uma cervejaria. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.36, suppl.1, p.44, 2000.
- OHARA, M.T.; BOU CHACRA, N.A.; SAKUDA, T.M. Avaliação da eficácia de sistemas conservadores por métodos rápidos. **Aerosol Cosmet.**, São Paulo, v.101, p.23-25, 1996.
- OLIVEIRA, C.A.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L.; GERMANO, P.M.L. Avaliação comparativa das condições higiênicas de equipamentos utilizados na fabricação

- de embutidos através das técnicas de bioluminescência de ATP e contagem global de microorganismos. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.12, n.58, p.58-63, 1998.
- ORTH, R. The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, Amsterdam, v.41, p.201-208, 1998.
- OTERO, A.M.L.; GARCIA, L.; MORENO, B. Rapid microbiological methods in meat and meat products. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.49, suppl.1, p.179-189, 1998.
- OULAHAL, L.N.; MARTIAL, G.A.; BONNEAU, M.; BLUM, L.J. Ultrasonic methodology coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment- validation and application to a dairy factory. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.89, suppl.3, p.433-441, 2000.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. v.1, p.91-92.
- REILLY, M.J.; JENKINS, H.C.; VIRGO, J.H. Stability of reconstituted firefly luciferase reagents. **J. Biolumin. Chemilumin.**, Chichester, v.11, p.317-335, 1996.
- REYES, E.; FLORES, E. Preservative efficacy testing for stability using impedance. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.115, n.4, p.61-66, 2000.
- RIBEIRO, A.R.; SANTOS, R.M.; ROSÁRIO, L.M.; GIL, M.H. Immobilization of luciferase from a firefly lantern extract on glass strips as an alternative strategy for luminescent detection of ATP+. **J. Biolumin. Chemilumin.**, Chichester, v.13, p.371-378, 1998.
- RIBEIRO, N.J.; LOUZA, C.A.; SANTOS, P.; LIMA, M. Monitoring the microbiological quality of raw milk through the use of an ATP bioluminescence method. **Food Control**, Amsterdam, v.11, p.209-216, 2000.

RUSH, S. Stability properties of colors used in cosmetics and toiletries. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.112, n.9, p.73-76, 1997.

SAMKUTTY, P.J.; GOUGH, R.H.; ADKINSON, R.W.; MC GREW, P. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.2, p.208-212, 2001.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. **Beginning cosmetic chemistry**: an overview for chemists, formulators, suppliers and others interested in the cosmetic industry. Carol Stream: Allured, 2002. v.1, p.41-49.

SIRAGUSA, G.R. Use of a newly developed rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect microbial contamination of poultry carcasses. **J. Biolumin. Chemilumin.**, Chichester, v.11, p.297-301, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS DA QUALIDADE DE ALIMENTOS. **Manual de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC**. 2.ed. Campinas: SBCTA; São Paulo: PROFIQUA, 1995. 28p.

SQUIRELL, D.J.; PRICE, R.L.; MURPHY, M.J. Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.457, p.109-114, 2002.

STEWART, G.S.A.B. Challenging food microbiology from a molecular perspective. **Microbiology**, Reading, v.143, n.7, p.2099-2108, 1997.

TAKAHASHI, T.; NAKAKITA, Y.; WATARI, J.; SHINOTSUKA, K. A new rapid technique for detection of microorganisms using bioluminescence and fluorescence microscope method. **J. Biosci. Bioeng.**, Osaka, v.89, n.5, p.509-513, 2000.

TAKAHASHI, T.; NAKAKITA, Y.; WATARI, J.; SHINOTSUKA, K. Application of a bioluminescence method for the beer industry: sensitivity of MicroStar (TM)-

RMDS for detecting beer-spoilage bacteria. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v.64, n.5, p.1032-1037, 2000.

TANAKA, H.; IWANO, S.T.; SAWADA, K.; MONJI, Y.; SETO, S.; YAJIMA, M.; YAGI, O. Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria. **Water Res.**, Amsterdam, v.31, n.8, p-1913-1918, 1997.

TAVERNA, M.; PÁEZ, R.; CHARLON, V.; NARI, J. Evaluacion de la higiene en ordenadoras mecanicas a través de la tecnica de bioluminiscencia de ATP. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.12, n.58, p.58-63,1998.

TSE, Y.T.E.; LOO, T.Y.W.; CHEUNG, N.B.M.; CHOW, W.C.L.; CHENG, W.C. Arimidex inhibition on proliferation of human breast solid tumors measured by ATP bioluminescence. **Life Sci.**, Amsterdam, v.76, n.7, p.827-834, 2004.

UNITED States Pharmacopeia: USP 28; The National Formulary: NF 23. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. cap.1227.

UKUKU, D.O.; PILIZOTA, V.; SAPERS, G.M. Bioluminescence ATP assay for estimating total plate counts of surface microflora of whole cantaloupe and determining efficacy of washing treatments. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.6, p.813-819, 2001.

VAN DYKE, K. Automated system for measurement of burst or delayed chemiluminescent reaction. In: _____. **Bioluminescence and chemiluminescence**: instruments and applications. Boca Raton: CRC Press, 1985. v.2, p.159-166.

VELASCO, D.; GIL, E.; GARCIA, P.; GUERRERO, A Eficacia de los métodos semiautomaticos para la exclusion de bacteriuria. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v.20, n.1, p.22-24, 2002.

- VELAZQUEZ, M.; FEIRTAG, J.M. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.53, n.2/3, p.95-104, 1999.
- VENKATESWARAN, K.; HATTORI, N.; LA DUC, M.T.; KERN, R. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.52, n.3, p.367-377, 2003.
- WEITZ, J.H.; BALLARD, L.A.; CAMPBELL, D.C.; KILLHAM, K. The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.202, p.165-170, 2001.
- WILLS, K. **Evaluation validation of implementation of new microbiological testing methods**. New Jersey: Celsis, 2000. 3p. [Relatório Técnico].
- WILKES, A.P. Aseptic tomato process monitored with bioluminescence based rapid test. **Food Eng.**, Troy, v.63, n.2, p.54, 1991.
- YE, J.; LAKSHMAN, P.S.; YUTHIKA, S.; HAK, K.Y. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Arch. Oral Biol.**, Amsterdam, v.49, n.10, p.789-798, 2004.
- ZEE, V.D.; VELD, H.I.T. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.80, n.4, p.934-939, 1997.