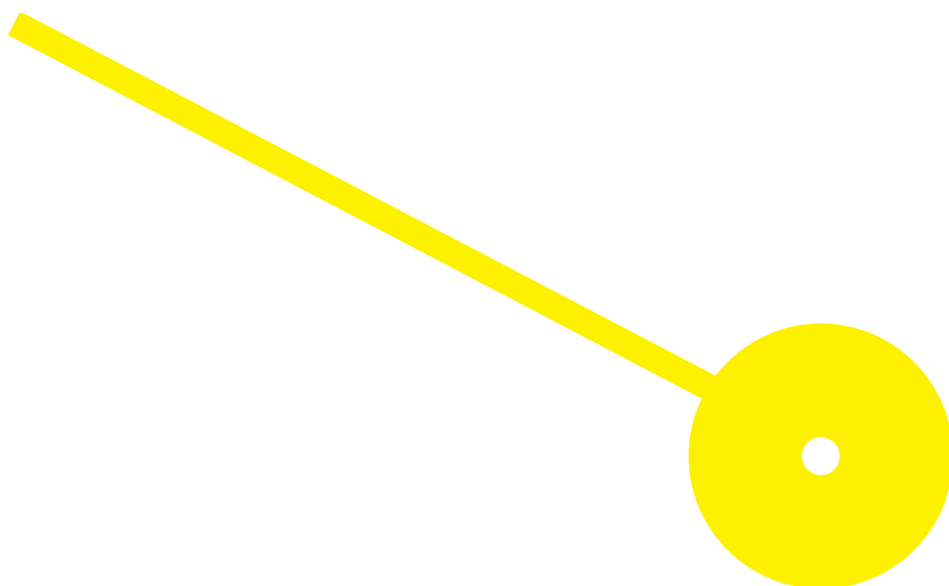




# Controlo de Qualidade Microbiológica no produto cosmético: Avaliação da metodologia de espalhamento

Catarina Teixeira Carvalho

09/2023



**P. PORTO**

**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**COSMETEK**  
Cosmetic Lab & Consulting

**Controlo de Qualidade Microbiológica no produto cosmético: Avaliação da  
metodologia de espalhamento**

**Autor**

Catarina Teixeira Carvalho

**Orientador(es)**

Prof. Doutora Sandra Marlene Mota/ Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola  
Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos  
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em  
**Análises Clínicas e Saúde Pública**– Ramo em **Microbiologia  
e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto  
Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

A realização deste estágio e o presente relatório não seriam possíveis sem o apoio direto e indireto de múltiplas pessoas e instituições. Desta forma, desejo exprimir os meus agradecimentos:

À orientadora deste estágio, a Doutora Sandra Mota, que continuamente expressou a sua disponibilidade para o solucionar de dúvidas e problemas, bem como, as suas opiniões, críticas, apoio e incentivo no decorrer da elaboração do presente relatório.

À Diretora da Cosmetek, a Engenheira Helena Ribeiro, que não só me deu a oportunidade de estagiar numa área de grande interesse meu como também me presenteou um tema de trabalho cativante que me permitiu dedicar completamente.

Agradeço também às minhas colegas de trabalho Rita Parauta, Carina Lopes e Sílvia Pais pela amizade que me demonstraram e a ajuda no desenvolvimento do trabalho laboratorial. Sem a sua orientação e transmissão de conhecimentos a realização deste estágio não seria possível.

Por fim, deixo os meus agradecimentos a todos os meus amigos e família pelo apoio e incentivo que me mostraram durante este período da minha vida.

## Resumo

Um produto cosmético para estar disponível no mercado europeu deve passar por um moroso e dispendioso processo, no qual, a sua qualidade, quer esta seja química, física ou microbiológica é analisada e avaliada. Na qualidade microbiológica é realizada a enumeração de microrganismos cada vez mais através dos métodos descritos em normas internacionais, ISO, como os métodos de incorporação e espalhamento. Através da análise de procedimentos verifica-se que o método de espalhamento requer menor tempo de preparação e permite melhor visibilidade de colónias em relação ao método de incorporação.

O objetivo deste estudo foi comparar a metodologia de espalhamento com a metodologia de incorporação. Para alcançar isto foram analisadas amostras de produtos cosméticos pelo procedimento de demonstração da aptidão do método para as estirpes *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* como descrito nas normas ISO 21149 e 16212. Os dados obtidos foram analisados por testes não paramétricos (Teste de *Mann-Whitney*) a partir dos quais se conclui que não há evidências de uma diferença significativa entre as médias do método de incorporação e espalhamento. Assim sendo foi possível comparar as duas metodologias e demonstrar que o laboratório tem competências para realizar o método de espalhamento.

**Palavras-chave:** Microbiologia Industrial; Cosméticos; Contagem de colónias de microrganismos; ISO 21149; ISO 16212.

## **Abstract**

A cosmetic product to be available in the European market must go through a long and expensive process, during which, its quality, be it chemical, physical, or microbiological is analyzed and evaluated. In microbiological quality, the enumeration of microorganisms is increasingly conducted using methods described in international standards, ISO, such as pour and spread plate methods. Through the analysis of procedures, it is verified that the spread plate method requires less preparation time and allows for better visibility of colonies when compared to the pour plate method.

The aim of this study was to compare the spread plate and pour plate methods. To achieve this, cosmetic samples were analyzed through the procedure of demonstration of method suitability for the *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* strains as described in ISO standards 21149 and 16212. The obtained data was analyzed through nonparametric tests (Mann-Whitney test) from which it was concluded that there is no evidence that there is a significant difference between the medians of the pour plate and the spread plate methods. Therefore, it was possible to compare the two methods and show that the laboratory has the skills needed to perform the spread plate method.

**Keywords:** Industrial Microbiology; Cosmetics; Microbial Colony Count; ISO 21149; ISO 16212.

## Índice

Capítulo I – Controlo de qualidade microbiológica no cosmético .....	1
1. Contextualização do estágio.....	1
1.1. Caracterização da instituição.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Controlo de Qualidade de Produtos Cosméticos .....	2
3.1. Estabilidade do produto cosmético.....	3
4. Especificações microbiológicas.....	4
4.1. Microrganismos específicos .....	6
4.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	6
4.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
4.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
4.1.4. <i>Candida albicans</i> .....	8
4.2. Meios de cultura .....	8
4.3. Enumeração de microrganismos .....	9
4.4. Teste de eficácia de conservação.....	10
Capítulo II – Avaliação da Metodologia de Espalhamento.....	11
1. Introdução.....	11
1.1. Metodologias convencionais .....	11
1.1.1. Método de incorporação .....	12
1.1.2. Método de espalhamento.....	12
1.1.3. Comparação entre os métodos de espalhamento e incorporação.....	13
1.2. Avaliação do método de espalhamento.....	14
1.3. Objetivo .....	15
2. Métodos .....	16
2.1. Seleção de amostras .....	16
2.2. Procedimento .....	17
2.3. Tratamento de dados.....	17
2.3.1. Análise operadores.....	18
2.3.2. Análise metodologia de incorporação e espalhamento.....	18

3. Resultados.....	20
3.1. Análise Operadores.....	20
3.2. Análise metodologia de incorporação e espalhamento.....	24
4. Discussão.....	29
5. Conclusão.....	32
Referências Bibliográficas.....	33

## Índice de Imagens

Figura 1 – Gráfico <i>Box plot</i> das estirpes <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> para os Operadores 1 e 2 por as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos <i>outliers</i> .....	21
Figura 2 – Gráfico <i>Box plot</i> dos controlos da estirpe <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i> para os Operadores 1 e 2 por as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos <i>outliers</i> .....	23
Figura 3 – Gráfico <i>Box plot</i> das estirpes <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> para as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos <i>outliers</i> .....	25
Figura 4 – Gráfico <i>Box plot</i> do controlo das estirpes <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> para as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos <i>outliers</i> .....	27

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Limites microbiológicos para cosméticos. Tabela retirada da ISO 17516 (11).....	6
Tabela 2 – Resultados da Análise de Estatística Descritiva para as amostras de produtos cosméticos.....	20
Tabela 3 – Resultados da Análise de Estatística Descritiva dos controlos do estudo.....	22
Tabela 4 – Resultados do teste estatístico não paramétrico de <i>Mann-Whitney</i> da comparação entre o Operador 1 e Operador 2 para as metodologias de incorporação e espalhamento.....	24
Tabela 5 – Resultados da Análise de Estatística Descritiva para as amostras de produtos cosméticos após junção dos valores do Operador 1 e 2.....	24
Tabela 6 – Resultados da Análise de Estatística Descritiva dos controlos do estudo após junção dos valores do Operador 1 e 2.....	26
Tabela 7 – Resultados do teste estatístico não paramétrico de <i>Mann-Whitney</i> da comparação entre as metodologias de incorporação e espalhamento.....	27
Tabela 8 – Resultados do teste estatístico não paramétrico de <i>Mann-Whitney</i> da comparação entre as metodologias de incorporação e espalhamento da estirpe <i>S. aureus</i> com e sem <i>outliers</i> .....	28

## Lista de abreviaturas

BPF's	Boas Práticas de Fabrico
CPNP	Portal de Notificação de Produtos Cosméticos
FIP	Ficheiro de Informação de Produto
I&D	Investigação e Desenvolvimento
ISO	International Organization for Standardization
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente à metilina
MSDS	Fichas Técnicas/Ficha de Dados de Segurança
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAO	Período após Abertura
SDCA	Sabouraud Dextrose Chloramphenicol agar
TSA	Tryptic Soy Agar
TSC	Tryptone Salt Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

# Capítulo I – Controlo de qualidade microbiológica no cosmético

## 1. Contextualização do estágio

O estágio descrito neste relatório foi realizado no âmbito da Unidade Curricular de Estágio do 2º ano do plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública do Ramo de Microbiologia e Saúde Pública, na empresa COSMETEK, de 22 de novembro de 2021 até 29 de abril de 2022.

### 1.1. Caracterização da instituição

A COSMETEK é uma empresa especializada na prestação de serviços ao nível do controlo de qualidade e caracterização de produtos cosméticos, bem como, na investigação e desenvolvimento (I&D) dos mesmos. Em termos de ensaios laboratoriais, são realizados testes de estabilidade (envelhecimento acelerado), testes de compatibilidade do produto, determinação do Período após Abertura (PAO), Qualidade Microbiológica, *Challenge Test* e *Sun Test*. A empresa também é especializada nos sistemas de Gestão da Qualidade e serviços regulamentares, nomeadamente, na implementação de sistemas de gestão de qualidade, Boas Práticas de Fabrico (BPF's), consultoria na certificação pela ISO 22716, elaboração de Fichas Técnicas/ Ficha de Dados de Segurança (MSDS), avaliação da conformidade, elaboração do Ficheiro de Informação de Produto (FIP), notificação no Portal de Notificação de Produtos Cosméticos (CPNP) e acompanhamento de atualizações da legislação aplicável, a nível nacional e europeu (1). Esta empresa é certificada pelas normas NP EN ISO 9001 (2) e ISO 22716 *Cosmetics - Good Manufacturing Practices (GMP) - Guidelines on Good Manufacturing Practices* (3) e encontra-se empenhada em ser acreditada pelas suas competências técnicas, pelo que já segue os protocolos descritos em normas internacionais.

## **2. Objetivos**

O estágio realizado na empresa COSMETEK teve por objetivo aprofundar conhecimentos na área da microbiologia, particularmente no ramo da cosmética. Este estágio permitiu colocar em prática os conhecimentos adquiridos durante o mestrado, bem como adquirir novos conhecimentos e competências nesta área.

Foram objetivos de aprendizagem deste estágio integrar os conhecimentos e competências sobre o procedimento de controlo de qualidade microbiológica do produto cosmético, assim como das normas internacionais utilizadas para este processo.

## **3. Controlo de Qualidade de Produtos Cosméticos**

De acordo com o Regulamento da Comunidade Europeia n. 1223/2009 de 2009 podemos definir um produto cosmético como: "qualquer substância ou mistura destinada a ser colocada em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com dentes ou com mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais". (Parlamento Europeu, 27/06/2009, p. 64) (4)

Todos os produtos cosméticos disponibilizados para consumo público devem ser seguros para a saúde humana, isto quando são utilizados em condições normais ou razoavelmente previsíveis (4). Para garantir que um produto cosmético é seguro para consumo humano este tem de ser submetido a múltiplos testes. A legislação vigente na União Europeia afirma que todas as empresas ou indivíduos que comercializam cosméticos têm responsabilidades relativamente à segurança e qualidade dos seus produtos (5). Para garantir a segurança e conformidade dos cosméticos estas devem seguir o regulamento (CE) 1223/2009 (4,6) e a ISO 22716 (3), outra diretriz que fornece requisitos organizacionais e práticos na gestão de fatores humanos, técnicos e administrativos, que possam afetar a qualidade e segurança do produto (3,7).

A ISO 22716 dita que os produtos, antes de serem colocados no mercado, devem ser controlados e devem cumprir critérios de conformidade de forma a assegurar a sua qualidade e segurança (3,7). Já no regulamento (CE) 1223/2009 estão descritas as informações que os relatórios de avaliação de segurança do produto cosmético devem incluir:

- Parte A – Informação sobre a segurança do produto cosmético
  - Composição qualitativa e quantitativa do produto cosmético;
  - Características físico-químicas e estabilidade do produto cosmético;
  - Qualidade microbiológica;
  - Impurezas, vestígios, informações sobre o material de embalagem;
  - Utilização normal e razoavelmente previsível;
  - Exposição ao produto cosmético;
  - Exposição às substâncias;
  - Perfil toxicológico das substâncias;
  - Efeitos indesejáveis e efeitos indesejáveis graves;
  - Informação sobre o produto cosmético.
- Parte B – Avaliação da segurança do produto cosmético
  - Conclusão da avaliação;
  - Advertências e instruções de utilização a inscrever no rotulo;
  - Fundamentação;
  - Credenciais do avaliador e aprovação da parte B. (4)

Uma vez que o estágio realizado se focou essencialmente na estabilidade do produto cosmético mais particularmente na sua qualidade microbiológica, de seguida serão abordados apenas estes dois temas.

### **3.1. Estabilidade do produto cosmético**

Para avaliar a capacidade de um produto manter as propriedades físicas, químicas e microbiológicas desejadas, bem como, as propriedades sensoriais e funcionalidade quando armazenado e utilizado pelo consumidor nas condições apropriadas, são realizados testes à estabilidade do produto. A norma que fornece diretrizes para esta testagem é a ISO 18811 *Cosmetics – Guidelines on the stability testing of cosmetic products* (8).

Devido à grande variedade de produtos cosméticos nem sempre é possível se estabelecer testes de estabilidade padronizados. Estes devem ser adaptados através de testes específicos apropriados para monitorização de possíveis alterações do produto cosmético, ao longo do tempo (8). Os testes realizados têm de ter em consideração:

- Os efeitos das condições normais de utilização, armazenamento e transporte;
- As propriedades organoléticas após as condições de stress;
- As condições do processo de produção, incluindo as BPF's;
- A embalagem do produto, bem como as possíveis interações entre os ingredientes da formulação e da embalagem. (8)

Os testes de estabilidade podem ser divididos em três grupos.

- ✓ Testes de estabilidade (avaliação de parâmetros químicos/físicos) – nos quais são avaliados os seguintes parâmetros:
  - Variação de temperatura;
  - Ciclos de temperatura;
  - Determinação de pH;
  - Determinação de viscosidade;
  - Determinação de densidade;
  - Determinação de teor alcoólico;
  - Teste de Centrifugação;
  - Exposição à luz;
  - Medição do índice de refração;
  - Avaliação organolética.
- ✓ Testes de compatibilidade (testes de interação com a embalagem) – no qual se avalia:
  - As perdas de peso;
  - Avaliação organolética;
  - Estanqueidade da embalagem final;
  - Determinação de pH.
- ✓ Testes microbiológicos (enumeração de microrganismos e teste de eficácia de conservação). (9)

#### **4. Especificações microbiológicas**

Os produtos cosméticos devido a fatores como pH, temperatura, conteúdo de água e nutrientes como lípidos, polissacarídeos, proteínas, entre outros, são considerados meios apropriados para o crescimento e multiplicação de microrganismos. O desenvolvimento de microrganismos em

cosméticos pode estar associado com contaminação de matérias primas, condições higiénicas insatisfatórias do local de produção/pessoal e/ou exposição do cosmético ao ambiente por conservação ineficaz ou utilização inadequada (5). Não é esperado que os produtos cosméticos estejam estéreis, no entanto é necessário garantir que estes foram fabricados sobre condições higiénicas, BPF's. De acordo com o Regulamento Europeu de cosméticos cada produto cosmético colocado no mercado deve ter o seu FIP no qual é fornecida informação relativa à qualidade microbiológica de matérias-primas e do produto cosmético final (5). Pelo que para produtos cosméticos que não são considerados de baixo risco microbiológico (avaliados de acordo com ISO 29621 - *Cosmetics – Microbiology – Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products* (10)) é necessário determinar a carga microbiológica (5). Os cosméticos não devem conter quantidades excessivas de microrganismos nem microrganismos específicos, que têm o potencial de afetar a qualidade do produto ou a segurança do consumidor. Por esta razão, foram estabelecidos limites microbiológicos (Tabela 1) para produtos cosméticos finais (11). A presença de microrganismos não específicos não é considerada questionável desde que estes não tenham a capacidade de crescer no produto. Isto pode ser baseado na avaliação de risco que inclui os testes de eficácia dos conservantes (exemplo ISO 11930 *Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product* (12)) ou pela demonstração de que o produto não suporta o crescimento microbiano (ISO 29621 (10)) (11).

A quantificação de microrganismos viáveis, quer estes sejam bactérias mesófilas ou fungos (bolors ou leveduras) é um passo indispensável para assegurar a segurança microbiológica do produto. Existem diversas metodologias microbiológicas, clássicas ou não, através das quais se pode proceder a esta quantificação. Por questões de demonstração de competências técnicas e processos de acreditação, cada vez mais laboratórios seguem normas internacionais, nas quais são utilizadas metodologias clássicas. Para quantificar microrganismos não específicos num produto cosmético pode-se seguir as normas ISO 21149 *Cosmetics – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria* (13) e a ISO 16212 *Cosmetics – Microbiology – Enumeration of yeast and mould* (14). Nestas o produto cosmético é submetido a dois passos principais: o de enumeração de microrganismos, e o de demonstração da aptidão do método. Ambos podem ser realizadas através de 3 metodologias distintas, métodos de espalhamento, incorporação e filtração de membrana (13,14). Na instituição em que o estágio foi realizado a metodologia utilizada é por incorporação, contudo há um interesse em implementar a metodologia por espalhamento.

**Tabela 1** – Limites microbiológicos para cosméticos. Tabela retirada da ISO 17516 (11). Legenda: UFC – Unidades Formadoras de Colônias.

Tipos de microrganismos	Produtos especificamente destinados para crianças com menos de 3 anos, área dos olhos ou membranas mucosas	Outros produtos
Microrganismos mesófilos aeróbios totais (bactérias mais leveduras e bolores)	$\leq 1 \times 10^2$ UFC por g ou mL	$\leq 1 \times 10^3$ UFC por g ou mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Ausente em 1g ou 1mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Ausente em 1g ou 1mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Ausente em 1g ou 1mL
<i>Candida albicans</i>	Ausente em 1g ou 1mL	Ausente em 1g ou 1mL

#### 4.1. Microrganismos específicos

A ausência de microrganismos específicos, tais como, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em cosméticos é importante pois estes são patógenos da pele podendo causar infecções cutâneas e oculares. Já outros microrganismos são de interesse para avaliar as condições de higiene durante o processo de fabrico, como é o caso da *Escherichia coli* um indicador de contaminação fecal (15).

##### 4.1.1. *Escherichia coli*

A *E. coli* é um bacilo Gram negativo, lactose positiva e oxidase negativa que pertence à família dos *Enterobacteriaceae* (16,17). Este microrganismo é um importante membro da microbiota intestinal de animais e humanos (16) e é uma bactéria profundamente estudada em contexto laboratorial (18). A *E. coli* é utilizada para sistemas de manipulação de genes, sobretudo para produzir enzimas e outros produtos industriais. Ademais, esta é frequentemente usada como um indicador de contaminação fecal, conquanto ainda há dúvidas sobre a utilização desta para este propósito (18). Em cosmética a sua presença está associada a pobres condições de higiene durante produção e/ou embalagem (19). Em laboratório, a *E. coli* pode ser incubada a uma temperatura de 37°C o que irá permitir um crescimento adequado, podendo sobreviver em meio sólido a temperaturas de 4°C até 3 meses (20).

Apesar de ser um comensal da microbiota humana, algumas estirpes de *E. coli* podem constituir um perigo para a saúde pública causando uma variedade de doenças provocando cerca de 2 milhões de mortes por ano. As estirpes intestinais patogênicas são classificadas por fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade que causam doença gastrointestinal (18). Além disso, o desenvolvimento de resistências a antibióticos de algumas *Enterobacteriaceae* levou à inclusão desta família na lista da Organização Mundial da Saúde (OMS) de bactérias para as quais é imperativo o desenvolvimento urgente de antibióticos (21).

#### **4.1.2. *Pseudomonas aeruginosa***

A *P. aeruginosa* é um bacilo Gram negativo, oxidase positiva (22) com uma temperatura ideal de crescimento de 37°C, sendo a sua virulência afetada pela temperatura (23).

A *P. aeruginosa* tipicamente, infeta as vias respiratórias e trato urinário, causa bacteremia e é a causa mais comum de infecções de feridas, devido a queimaduras, dermatites e otites externas (24,25). Esta bactéria pode causar sépsis e é o mais frequente colonizador de equipamentos médicos provocando infecções hospitalares, como pneumonia associada a ventilador (24). A capacidade deste microrganismo formar biofilmes assim como a sua resistência a antimicrobianos, como carbapenemos e cefalosporinas de terceira geração, torna o seu tratamento difícil (22,25) o que levou ao reconhecimento pela OMS como um agente patogênico de prioridade 1: Crítico para pesquisa e desenvolvimento de antibióticos (21).

#### **4.1.3. *Staphylococcus aureus***

O *S. aureus* é um anaeróbio facultativo (26), catalase e coagulase positivo (27), pertencente ao gênero *Staphylococcus*, que após coloração Gram observa-se no microscópio como pequenos *clusters* de cocos Gram positivo (26). Em condições laboratoriais, este microrganismo consegue-se desenvolver em temperaturas entre os 15°C e 45°C em meio nutritivo (28). Esta bactéria faz parte da flora da pele e de mucosas, todavia é capaz de causar infecções superficiais e doenças invasivas (26). O *S. aureus* é um dos agentes causadores de pneumonia e outras infecções do trato respiratório, infecções cardiovasculares e bacteremia associada aos cuidados de saúde. Este microrganismo pode também causar infecções de pele moderadamente severas que são acompanhadas por morbidade e dor (29). Infecções por *S. aureus* podem ser particularmente

problemáticas devido à capacidade desta bactéria formar biofilmes (30) e à frequente ocorrência de resistências (29). Dentro destas estirpes resistentes, a mais importante clinicamente é o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA do inglês *Methicillin-resistant S. aureus*) sendo as suas infeções acompanhadas por mortalidade e morbidade aumentadas bem como longos períodos de internamento hospitalar (29). Tal como a *P. aeruginosa* e as *Enterobacteriaceae* (incluindo *E. coli*), o *S. aureus* também foi classificado como um agente patogénico prioritário para pesquisa e desenvolvimento de antibióticos (21).

#### **4.1.4. *Candida albicans***

A *C. albicans* é uma levedura com forma ovoide (blastoconídeo), podendo formar pseudo-hifas e hifas (31,32). As mucosas do corpo humano, como a cavidade oral, intestinos, e trato vaginal são frequentemente colonizados por esta (33). A *Candida spp.* é um dos fungos causadores de infeções de mucosas e infeções sistémicas mais comum, e é também responsável por cerca de 70% das infeções por fungos no mundo (32). Fatores predisponentes como tratamentos com antibióticos ou quimioterapia, ou imunossupressão, podem induzir uma alteração da flora permitindo a proliferação dos fungos comensais levando ao surgimento de infeções locais ou sistémicas, visto que esta é um fungo oportunista (33). Apesar de tratamento, a taxa de mortalidade é perto dos 40%, especialmente em doentes hospitalizados (32). A *C. albicans* afeta principalmente as cavidades geniturinária, orofaríngea, gastrointestinal e perianal. A candidíase sistémica pode afetar a corrente sanguínea ou pode envolver o sistema nervoso central, fígado, baço, coração e/ou os rins (34,35).

#### **4.2. Meios de cultura**

Os meios a seguir indicados são referenciados nas normas ISO (13,14) utilizadas no laboratório de microbiologia da COSMETEK, sendo estes pertinentes para a análise microbiológica de produtos cosméticos:

- *Tryptic Soy Agar (TSA)*, é um meio nutritivo não seletivo, que permite o crescimento de uma grande gama de microrganismos. Sendo direcionado pelas normas para a utilização no crescimento de bactérias mesófilas, para enumerações e deteções. Este meio é o indicado para o crescimento das estirpes *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

- *Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar* (SDCA), é um meio seletivo para fungos. Sendo indicado pelas normas para a enumeração de bolores e leveduras. Este meio é o indicado para o crescimento das estirpes *C. albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

- Eugon, é usado como diluente neutralizante e como meio de enriquecimento para microrganismos em produtos cosméticos com e sem conservantes.

- *Tryptone Salt Broth* (TSC), é usado como diluente. (12–14)

### **4.3. Enumeração de microrganismos**

Nas normas internacionais para cosméticos para enumeração e detecção de bactérias aeróbias mesófilas, ISO 21149, e enumeração de bolores e leveduras, ISO 16212, são fornecidas diretrizes gerais para a enumeração de microrganismos através da contagem de colónias em meio agar (13,14) e para a detecção de crescimento bacteriano após enriquecimento (13). Nestas normas são descritos dois processos necessários para a enumeração de microrganismos.

Na análise inicial é recolhida uma amostra do produto cosmético e esta é colocada em contacto com um agente neutralizante durante o período necessário para a inibição das propriedades antimicrobianas do produto, seguidamente a amostra é semeada em meio agar e incubada em condições aeróbias. Este passo permite a quantificação de microrganismos viáveis no produto aquando da recolha da amostra, ou seja, a “amostra tal e qual”. Todavia, a análise não termina neste passo sendo necessário proceder ao passo de demonstração da aptidão do método. Os resultados obtidos com o primeiro passo podem não ser considerados fiáveis pois os conservantes ou outras substâncias com propriedades antimicrobianas podem afetar negativamente o ensaio, assim sendo, é necessário demonstrar que microrganismos podem crescer nas condições da análise. Daí a importância de demonstrar a aptidão do agente neutralizante. Para este passo são utilizadas estirpes geralmente sensíveis a agentes antimicrobianos, duas estirpes representativas de bactérias: Gram positivo (*S. aureus*) e Gram negativo (*P. aeruginosa* ou *E. coli*) (13), e uma estirpe de referência de uma levedura (*C. albicans*) (14). Este processo consiste na preparação de uma suspensão do produto cosmético analisado em meio neutralizante. A esta suspensão é adicionada uma quantidade fixa de um inóculo calibrado seguido da sua incorporação/espalhamento/filtração. Em suma, é possível obter um intervalo de colónias específico e dessa forma demonstrar que o neutralizante é eficaz (13,14). O

intervalo pretendido é entre 30 a 300 colónias para bactérias (13) e 15 a 150 colónias para bolores e leveduras (14).

Na ISO 21149 é também descrito o processo para a pesquisa de bactérias aeróbias mesófilas. Neste passo a amostra é colocada em contacto com um meio líquido nutritivo com agentes neutralizantes e incubada para permitir o crescimento de microrganismos. Após esta incubação a amostra é semeada em meio agar nutritivo e após incubação é observada a ausência ou presença de bactérias aeróbias mesófilas. Se necessário estas bactérias podem ser identificadas utilizando outras normas (ex. ISO 21150) (13).

#### **4.4. Teste de eficácia de conservação**

O teste de eficácia de conservação (ou *Challenge Test*) pode ser realizado de acordo com a ISO 11930 *Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product* (12). Este ensaio permite avaliar a proteção antimicrobiana de um produto cosmético, proteção esta, que pode resultar de conservação química, características inerentes da formulação, design da embalagem ou do processo de fabrico. O ensaio consiste em colocar a formulação em contacto com um inóculo calibrado de cada microrganismo de teste avaliando as diferenças de contagens de microrganismos em intervalos de tempo definidos durante um período de 28 dias. Os microrganismos de teste para este ensaio são a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis* (12). No tempo 0 do ensaio é medida uma quantidade definida da formulação em teste para um recipiente estéril. Nesse mesmo recipiente é colocada uma quantidade definida de inóculo calibrado dos microrganismos teste e a formulação contaminada é incubada. No T0 é realizado o passo já referido de demonstração da aptidão do método não só para validar os resultados, certificando que na duração do ensaio as propriedades antimicrobianas não vão interferir nos momentos de contagens, mas também para calcular a quantidade inicial de inóculo colocado na formulação. No decorrer do ensaio a formulação contaminada é semeada aos tempos T7, T14 e T28, sendo que, para obter um resultado favorável espera-se um decréscimo abrupto das contagens de microrganismos. Isto é, que o sistema de conservação do produto cosmético atue rapidamente e eficazmente para eliminar contaminação protegendo a qualidade do produto e segurança do consumidor (12).

## Capítulo II – Avaliação da Metodologia de Espalhamento

### 1. Introdução

Os produtos cosméticos que são disponibilizados no mercado europeu devem ser seguros para a saúde humana (4) pelo que é necessário certificar a qualidade microbiológica de matérias-primas e do produto cosmético final (5). Isto é, a carga microbiológica dos produtos/matérias-primas deve estar dentro de limites estipulados e microrganismos específicos não devem estar presentes (11). Em consequência destes limites microbiológicos (11) é necessário enumerar os microrganismos viáveis nos cosméticos (5).

As normas internacionais específicas para a enumeração de microrganismos em produtos cosméticos são as ISO 21149, para bactérias mesófilas (13), e ISO 16212, para bolores e leveduras (14). Nestas normas são mencionados três métodos para a enumeração de microrganismos: método de incorporação; método de espalhamento; e método de filtração de membrana (13,14). Dois dos métodos de placa utilizados rotineiramente em laboratório que permitem enumerar colónias viáveis e manter a esterilidade do procedimento são os métodos de incorporação e espalhamento (36). Na empresa onde foi realizado o estágio é utilizada a metodologia de incorporação, no entanto, pretende-se implementar a metodologia de espalhamento. Utilizando o procedimento de demonstração da aptidão do método, descrito nas normas internacionais (13,14), é possível obter resultados dentro de intervalos específicos o que permite uma comparação quantitativa das duas metodologias. Isto irá permitir alcançar o objetivo deste estudo que é a avaliação do método de espalhamento em relação ao método de incorporação para a demonstração da aptidão do método.

#### 1.1. Metodologias convencionais

Métodos de cultura convencionais ainda são considerados o padrão devido à sua confiabilidade, eficiência, sensibilidade e gama de aplicações. Em razão disso, permanecem um passo indispensável para deteção e enumeração de microrganismos. Na generalidade, as normas ISO para enumeração de indicadores de segurança e higiene (*Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras) e deteção de patógenos são baseadas em métodos de cultura convencionais e os órgãos reguladores definem limites para cada categoria (37). Os métodos de espalhamento e

incorporação são baseados no princípio de que quando uma suspensão com microrganismos é espalhada ou incorporada em meio sólido cada um dos microrganismos viáveis se vai multiplicar e formar uma colônia isolada (38,39). As metodologias tradicionais são morosas requerendo grandes quantidades de material e preparação prévia de meio (40), apesar de serem relativamente simples e pouco dispendiosas (37). No entanto, as técnicas assépticas devem ser seguidas rigorosamente para evitar contaminação (37).

### **1.1.1. Método de incorporação**

O método de incorporação é uma técnica laboratorial utilizada para isolar e contar microrganismos viáveis numa amostra líquida ou suspensão (38). Este método consiste na transferência de uma quantidade fixa de uma amostra/suspensão para o centro de uma placa de *Petri*, utilizando material e técnicas assépticas. O meio agar utilizado para este método é mantido num estado líquido a uma temperatura estável de forma a que o meio não esteja demasiado quente para destruir os microrganismos nem a uma temperatura demasiado baixa para começar a solidificar (40). O meio é vertido para a placa com a amostra/suspensão e esta é agitada para dispersar a amostra (41). Após o meio solidificar as placas são invertidas e incubadas. Utilizando este método é possível que as colônias cresçam tanto na superfície do meio como no interior do mesmo, embora, as colônias que crescem envolvidas pelo agar apresentam, geralmente, um tamanho menor (41). Quando entram em contacto com o meio agar quente os microrganismos sensíveis ao calor podem perder a viabilidade o que vai causar contagens reduzidas quando comparado com outros métodos. Além do mais, a taxa de crescimento de aeróbios obrigatórios envolvidos por agar também é menor. Apesar destas desvantagens o método de incorporação é mais preciso e não requer a preparação prévia de placas, o que não significa que a preparação para esta metodologia não seja longa (41).

### **1.1.2. Método de espalhamento**

O método de espalhamento, tal como o de incorporação, é uma técnica laboratorial utilizada para isolar e contar microrganismos viáveis numa amostra líquida ou suspensão (39). Este método consiste na transferência de uma quantidade de amostra/suspensão para uma placa de *Petri* com meio adequado, seguido do seu espalhamento com auxílio de um espalhador. Tanto o

material como as técnicas utilizadas devem cumprir as condições de assépsia. É um dos métodos mais utilizados em laboratório devido à sua simplicidade e baixo custo, ainda que, seja necessário material extra, como espalhadores, para a executar. Esta metodologia é adequada para microrganismos aeróbios obrigatórios e facultativos (39). Através desta metodologia é possível visualizar as características morfológicas das colónias, transferir colónias facilmente e o meio não necessita de ser transparente ou translúcido para facilitar a contagem. Ademais, os microrganismos não têm de entrar em contacto com meio agar quente, ainda assim, o volume que pode ser inoculado nas placas está dependente da capacidade de absorção do meio de cultura (42).

### **1.1.3. Comparação entre os métodos de espalhamento e incorporação**

O método de espalhamento requer menos tempo de preparação, mas é mais suscetível a erro humano já o método de incorporação permite utilizar maiores volumes de amostra, no entanto, a visibilidade das colónias no interior do agar é menor (40). Ambos os métodos têm as suas vantagens e desvantagens, todavia, é a visibilidade das colónias e o tempo de preparação do método que levaram à ponderação da substituição do método de incorporação pelo de espalhamento no laboratório da empresa COSMETEK.

Na metodologia de incorporação as colónias podem estar integradas no meio agar ou à superfície do mesmo (40), estas colónias incorporadas podem dificultar a contagem devido ao seu tamanho reduzido (41) particularmente em casos em que o meio agar tem uma opacidade elevada (40). A opacidade dos meios de cultura pode até ser alterada devido às diversas matrizes ou pigmentações presentes nos produtos cosméticos. A metodologia de espalhamento permite obter colónias apenas na superfície (40) o que facilita a observação de colónias (42) independentemente da opacidade do meio e da matriz ou pigmentação do cosmético.

Quanto ao tempo de preparação para as metodologias as diferenças significativas surgem na preparação dos meios de cultura agar. Estes podem ser preparados em laboratório, sendo o mais comum a utilização de meios desidratados (43), ou podem ser adquiridos prontos a usar, sendo que estes podem vir em placas de *Petri* ou frascos (44). O meio agar preparado em laboratório pode ser utilizado no mesmo dia de preparação, mas nem sempre é possível devido a restrições de tempo. A preparação do meio agar passa pela dissolução dos componentes (ou meio desidratado) em água com aquecimento e a posterior esterilização em autoclave (45,46), um

processo moroso. Contudo, o meio agar à temperatura de armazenamento, 2°C a 8°C (45,46), está no estado sólido (47) o que para a metodologia de espalhamento não representa um problema se este já estiver dispensado em placas *Petri* ou tenha sido adquirido desta forma. Porém, a metodologia de incorporação requer meio agar no estado líquido sendo necessário proceder à fusão do meio na autoclave, banho-maria ou micro-ondas (48) aumentando o tempo de preparação para esta metodologia em relação à metodologia de espalhamento. Adicionalmente, não é recomendável reutilizar o meio após fusão o que aumenta desperdícios para esta metodologia. A redução do tempo de preparação do meio de cultura, a diminuição de possíveis desperdícios de meio e a possibilidade de facilitar a visualização de colónias tornaram a metodologia de espalhamento apelativa para a empresa.

## **1.2. Avaliação do método de espalhamento**

A maioria dos métodos microbiológicos estão descritos em compêndios como farmacopeias ou outros documentos regulatórios e não necessitam de validações (49), estes métodos já foram sujeitos a validações extensas e foram considerados aptos para o seu propósito (50). É, no entanto, necessário que uma instituição demonstre através de testes adequados e documentação que o laboratório executa o método de forma confiável (49). A introdução de um novo método num laboratório em que é pretendida a substituição de um método pelo outro requer um nível de comparação (50,51). Os métodos microbiológicos são inerentemente diferentes de métodos analíticos e apresentam grandes variações, a razão para estas é que a microbiologia é uma ciência logarítmica. Métodos microbiológicos permitem a distinção entre 100 e 1000 colónias, mas não diferenças menores. Em função disto, métodos baseados em culturas não oferecem contagens exatas, mas sim estimativas (51). A variabilidade pode resultar em dificuldades a comparar métodos, em geral, apenas uma comparação de 50% é possível entre dois métodos (51). Na avaliação de um novo método não é necessária uma correspondência elevada, sendo mais pertinente que o método alternativo permita ao utilizador fazer uma decisão equivalente e consistente em relação à amostra ou qualidade do produto (51). Ou seja, a verificação dentro de condições de uso deve ser demonstrada satisfazendo especificações estabelecidas para o método. Em todo o caso, a demonstração de exatidão e precisão e outros parâmetros devem ser demonstrados para o método em causa (50).

O desempenho do método pode ser demonstrado por:

- Amostras brancas, ou meio não inoculado para avaliar contaminação;
- Amostras de controlo do laboratório (exemplo controlos de culturas positivas) para avaliar exatidão;
- Duplicados para avaliar precisão;
- Padrões de verificação da calibração analisados periodicamente no lote analítico para análises quantitativas;
- Participação em programas de controlo de qualidade externos (50).

Os principais parâmetros a serem considerados no processo de verificação dependem da natureza do método e da variedade de tipos de amostras que podem ser encontradas. Um número estatisticamente significativo de amostras deve ser utilizado no processo de avaliação e estes devem abranger toda a gama de resultados para o uso pretendido (50).

### **1.3. Objetivo**

O objetivo deste estudo foi comparar a metodologia de espalhamento com a metodologia de incorporação no procedimento de demonstração da aptidão do método de forma a iniciar a análise da substituição de uma metodologia pela outra para os ensaios realizados na COSMETEK.

## 2. Métodos

Como já foi referido no Capítulo I a enumeração de microrganismos consiste em dois passos, o de enumeração dos microrganismos presentes na amostra e o de demonstração da aptidão do método (13,14). Para a substituição do método de incorporação pelo de espalhamento é necessário demonstrar que o laboratório consegue executar de forma fiável os dois processos da enumeração de microrganismos pela metodologia de espalhamento. No entanto, este estudo apenas se focou na avaliação de resultados da aptidão do agente neutralizante, ou seja, a demonstração de aptidão do método. Este processo consiste na contaminação de uma amostra suspensa em agente neutralizante com estirpes representativas sensíveis a agentes antimicrobianos a fim de demonstrar que os microrganismos podem crescer dentro das condições do ensaio (13,14).

Para este projeto foi estabelecido que o ensaio de demonstração da aptidão do método iria ser realizado por dois operadores para ambas as metodologias, incorporação e espalhamento.

### 2.1. Seleção de amostras

Para este estudo foram utilizados produtos cosméticos para os quais é apropriado realizar o procedimento descrito nas ISO 21149 e 16212 (13,14). Foram utilizados 12 produtos cosméticos, maioritariamente pós soltos e compactos, com quantidade suficiente de produto para permitir a análise por espalhamento e incorporação em paralelo e por dois operadores diferentes. Estes produtos foram analisados em dias diferentes e para cada dia foi realizado um controlo. No total foram realizados 7 controlos para as estirpes *C. albicans* e *S. aureus* e 3 e 4 controlos para as estirpes *E. coli* e *P. aeruginosa*, respetivamente.

Para a seleção das amostras/controlos para avaliação foram definidos os seguintes parâmetros:

- Os valores das contagens deveriam estar compreendidos entre 15 a 150 colónias para os bolores e leveduras (14) e 30 a 300 colónias para bactérias (13), estando fora destes valores as contagens foram excluídas;
- Apenas foram incluídas amostras de dias em que os controlos foram validados;
- Para uma amostra/controlo a diferença entre duplicados deveria ser inferior a 50% (13,14), quando isto não se verificava a amostra/controlo foi excluída;

- A diferença entre as médias dos duplicados da amostra e do controlo deveria ser inferior a 50% (13,14), nos casos em que isto não era verdade a amostra foi excluída.

## **2.2. Procedimento**

O procedimento laboratorial realizado foi o descrito nas normas internacionais ISO para cosméticos (13,14,52) e que é realizado no laboratório por rotina. Inicialmente, realizou-se a preparação do material segundo a norma ISO 21148 (52) e para os meios de cultura foi utilizado meio desidratado tendo-se seguido as indicações do fornecedor. Da ISO 21148 foi ainda adotado o processo de preparação e calibração de inóculos para as estirpes *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (52). Após a obtenção do inóculo colocou-se em prática o procedimento de demonstração da aptidão do método descrito nas normas ISO 21149 e 16212, nestas normas é descrito o procedimento para os métodos de incorporação e espalhamento (13,14). A demonstração da aptidão do método foi realizada em paralelo por dois operadores e para ambas as metodologias de incorporação e espalhamento. Dos possíveis diluentes, neutralizantes e meios de cultura referidos nas normas (13,14) foram selecionados os meios já referidos no Capítulo I, TSA (para bactérias), SDCA (para *C. albicans*) e Eugon e TSC como neutralizante e diluente, respetivamente. Adicionalmente, na norma das bactérias mesófilas é necessária a utilização de apenas um representante de bactéria Gram negativo, sendo indicada a utilização de *E. coli* ou *P. aeruginosa* (52), no entanto, foram utilizadas as duas bactérias alternadamente. Após a incubação das placas de incorporação e espalhamento foram realizadas contagens nos contadores de colónias e os dados foram registados num ficheiro Excel.

## **2.3. Tratamento de dados**

Para as análises e representações gráficas foi utilizado o Software Graphpad prism® (versão 10.0.2) e o Excel (versão 2308). Os resultados obtidos foram organizados por categorias começando com a divisão por estirpes, seguido da separação de resultados de amostras e de controlos. Por fim, foram ordenados por operador e metodologia. Posteriormente foi calculado o número de UFC por mL através da Equação 1 e todos os valores de N foram transformados em logaritmos de base 10 e utilizados para a análise estatística e construção de gráficos. De forma a comparar as metodologias de incorporação e espalhamento era necessário juntar os dados de

ambos operadores para cada metodologia, contudo, diferenças significativas entre operadores não iriam permitir obter conclusões. A pretexto disto e do facto da reprodutibilidade ser outro fator importante na avaliação dos métodos foi necessário realizar uma análise estatística dos operadores e apenas de seguida foram analisadas as diferenças entre metodologias.

$$N_x = \frac{\text{média dos duplicados}}{(\text{Volume} \times \text{diluição})} \text{ UFC/mL}$$

Equação 1 – Cálculo do N da amostra/controlo em UFC/mL.

### 2.3.1. Análise operadores

Em cada estirpe foi realizada a análise estatística descritiva para cada operador e metodologia. Simultaneamente foram construídos gráficos *Box plot*, pelo método de *Tukey* que permite identificar os *outliers*, com exceção dos controlos das estirpes *E. coli* e *P. aeruginosa* que não apresentavam um número de amostras suficiente. Os *outliers* foram observados, no entanto, não alteraram os resultados por isso foram considerados nos cálculos seguintes. Foi definido que a análise seria pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney* e foram formuladas as hipóteses: Hipótese nula ( $H_0$ ) – Não há diferença significativa entre as médias dos operadores para a metodologia de incorporação/espalhamento; Hipótese alternativa ( $H_1$ ) – Há diferença significativa entre as médias dos operadores para a metodologia de incorporação/espalhamento. Ou seja, realizou-se uma comparação entre o Operador 1 e Operador 2 para ambas as metodologias de incorporação e espalhamento. Para esta análise a diferença significativa foi considerada como  $p < 0,05$ .

### 2.3.2. Análise metodologia de incorporação e espalhamento

Após verificar que não havia diferenças entre operadores os valores de logaritmo dos dois operadores foram agregados e procedeu-se a nova análise. Novamente foi realizada a estatística descritiva seguida da construção de *Box plot* pelo método de *Tukey*, tendo sido possível a construção dos gráficos dos controlos das estirpes *E. coli* e *P. aeruginosa*. O resultado de uma das populações demonstrou-se diferente quando analisado com e sem *outliers*, logo, serão apresentados neste documento ambos os resultados. Seguiu-se o teste de *Mann-Whitney* com

as seguintes hipóteses: Hipótese nula ( $H_0$ ) – Não há diferença significativa entre as médias do método de incorporação e de espalhamento; Hipótese alternativa ( $H_1$ ) – Há diferença significativa entre as médias do método de incorporação e de espalhamento. Para esta análise a diferença significativa foi considerada como  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Análise Operadores

Neste estudo os métodos de espalhamento e de incorporação foram comparados para verificar se seria possível a substituição de um método pelo outro. Os ensaios realizados para esta avaliação foram executados por dois operadores distintos, pelo que, antes da comparação das metodologias houve uma necessidade de comparar estatisticamente os operadores. A comparação entre operadores foi iniciada com uma análise estatística descritiva representada na Tabela 2 (Amostras) e Tabela 3 (Controlos). Nestas tabelas destaca-se o número de amostras/controlos (n), a média e o desvio-padrão.

Tabela 2 – Resultados da Análise de Estatística Descritiva para as amostras de produtos cosméticos.

Amostra		Operador 1		Operador 2	
		Incorporação	Espalhamento	Incorporação	Espalhamento
<i>C. albicans</i>	n	12	12	12	11
	Média	6,681	6,681	6,680	6,712
	Desvio-padrão	0,08826	0,1116	0,1175	0,08655
	Mínimo	6,519	6,462	6,491	6,544
	Máximo	6,799	6,863	6,848	6,839
<i>S. aureus</i>	n	12	12	11	12
	Média	8,159	8,062	8,185	8,166
	Desvio-padrão	0,1818	0,2708	0,1691	0,2225
	Mínimo	7,748	7,550	7,940	7,580
	Máximo	8,394	8,433	8,460	8,377
<i>E. coli</i>	n	6	5	6	6
	Média	7,995	8,076	8,036	8,052
	Desvio-padrão	0,1794	0,2135	0,2063	0,2740
	Mínimo	7,699	7,724	7,756	7,544
	Máximo	8,161	8,254	8,212	8,275
<i>P. aeruginosa</i>	n	6	6	6	5
	Média	8,056	7,983	8,002	8,005
	Desvio-padrão	0,2042	0,1902	0,2420	0,2245
	Mínimo	7,813	7,667	7,633	7,833
	Máximo	8,339	8,143	8,290	8,281

No total foram analisadas 12 amostras e realizados 7 controlos com exceção das estirpes *E. coli* e *P. aeruginosa* que foram realizadas alternadamente tendo 6 amostras cada e 3 e 4 controlos, respetivamente. As amostras e controlos foram sujeitos aos parâmetros já descritos e na tabela o n indica o número de amostras/controlos que não foram excluídos. As médias, embora

aparentem ser semelhantes, não permitem retirar conclusões pelo que é necessária a avaliação estatística destas. Já o desvio-padrão fornece informação quanto à dispersão de valores, sendo que, quanto maior o desvio-padrão maior a dispersão e vice-versa (53). Na Tabela 2 verifica-se que o Operador 1 apresenta o maior desvio-padrão na metodologia por espalhamento para a estirpe *S. aureus* e que o menor desvio foi obtido pelo Operador 2 na metodologia por espalhamento para a estirpe *C. albicans*. Em termos de controlos (Tabela 3) a maior e menor dispersão dos dados pertence ao Operador 2 na metodologia por espalhamento para as estirpes *S. aureus* e *C. albicans*, respetivamente. A dispersão dos valores também pode ser observada nos gráficos *Box plot* na Figura 1 e Figura 2.

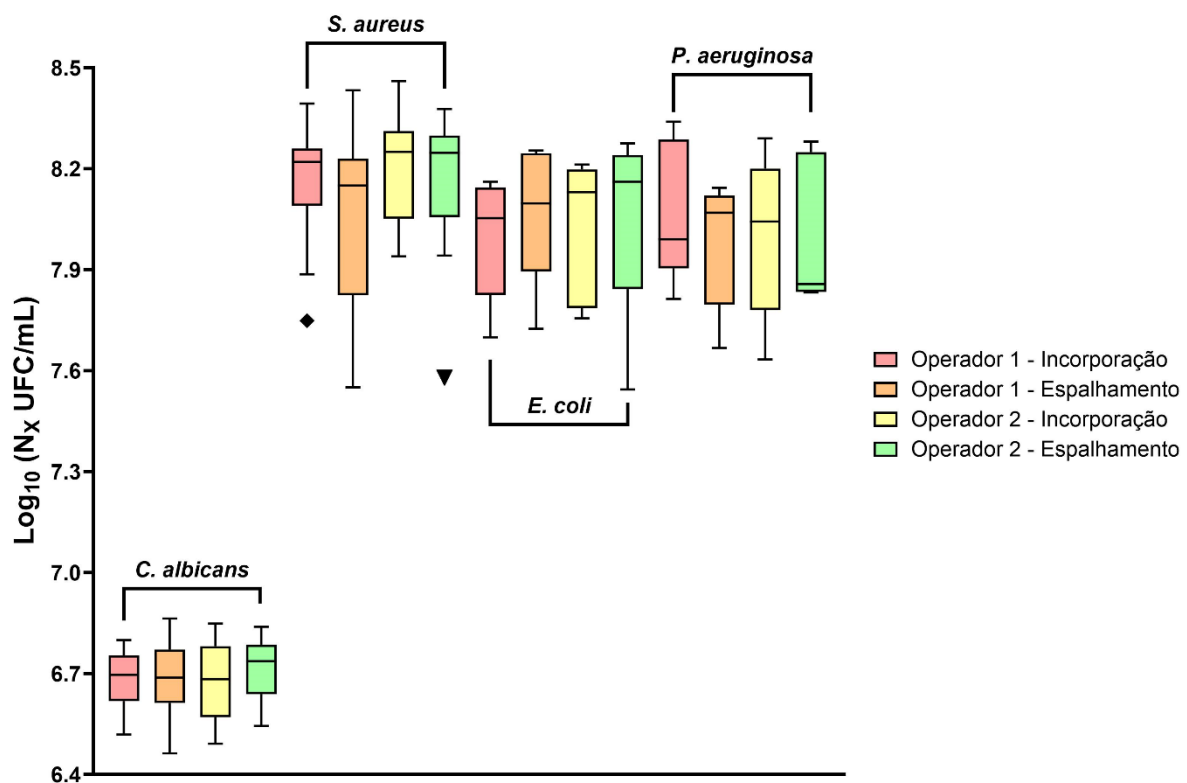


Figura 1 – Gráfico *Box plot* das estirpes *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* para os Operadores 1 e 2 por as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos *outliers*.

Os gráficos *Box plot* apresentados foram construídos utilizando o método de *Tukey*, o que permite a observação de *outliers* (54). Na Figura 1 e Figura 2 é possível observar uma grande diferença entre a *C. albicans* e as bactérias, contudo, esta diferença é prevista uma vez que os intervalos de contagens utilizados são diferentes – 15 a 150 colónias para bolores e leveduras (14) e 30 a 300 colónias para bactérias (13). Observando a Figura 1 verifica-se que em geral as

medianas são razoavelmente semelhantes por estirpe, com exceção da estirpe *P. aeruginosa* na qual até a assimetria dos resultados é diferente entre Operadores/Metodologias. Na Figura 2 apenas foi possível a construção dos gráficos para as estirpes *C. albicans* e *S. aureus*, visto que, as restantes estirpes apresentam um  $n < 5$  (Tabela 3) (55). Na mesma figura observa-se uma diferença entre as medianas da estirpe *S. aureus*. Em ambas os gráficos é possível visualizar *outliers*, todavia estes não alteram os resultados das análises seguintes pelo que não foram removidos (56).

Tabela 3 – Resultados da Análise de Estatística Descritiva dos controlos do estudo.

Controlo		Operador 1		Operador 2	
		Incorporação	Espalhamento	Incorporação	Espalhamento
<i>C. albicans</i>	n	7	7	7	7
	Média	6,714	6,711	6,687	6,691
	Desvio-padrão	0,08987	0,09809	0,07075	0,07018
	Mínimo	6,556	6,550	6,580	6,574
	Máximo	6,863	6,826	6,785	6,760
<i>S. aureus</i>	n	7	7	6	7
	Média	8,214	8,110	8,284	8,100
	Desvio-padrão	0,1439	0,1826	0,08722	0,2373
	Mínimo	8,004	7,732	8,127	7,585
	Máximo	8,369	8,280	8,389	8,283
<i>E. coli</i>	n	3	3	3	3
	Média	8,022	8,114	8,063	8,046
	Desvio-padrão	0,1875	0,2125	0,1710	0,2241
	Mínimo	7,813	7,881	7,875	7,803
	Máximo	8,176	8,297	8,210	8,244
<i>P. aeruginosa</i>	n	4	4	4	4
	Média	8,044	8,000	8,040	8,033
	Desvio-padrão	0,1471	0,1091	0,1850	0,2149
	Mínimo	7,954	7,881	7,869	7,740
	Máximo	8,262	8,107	8,217	8,256

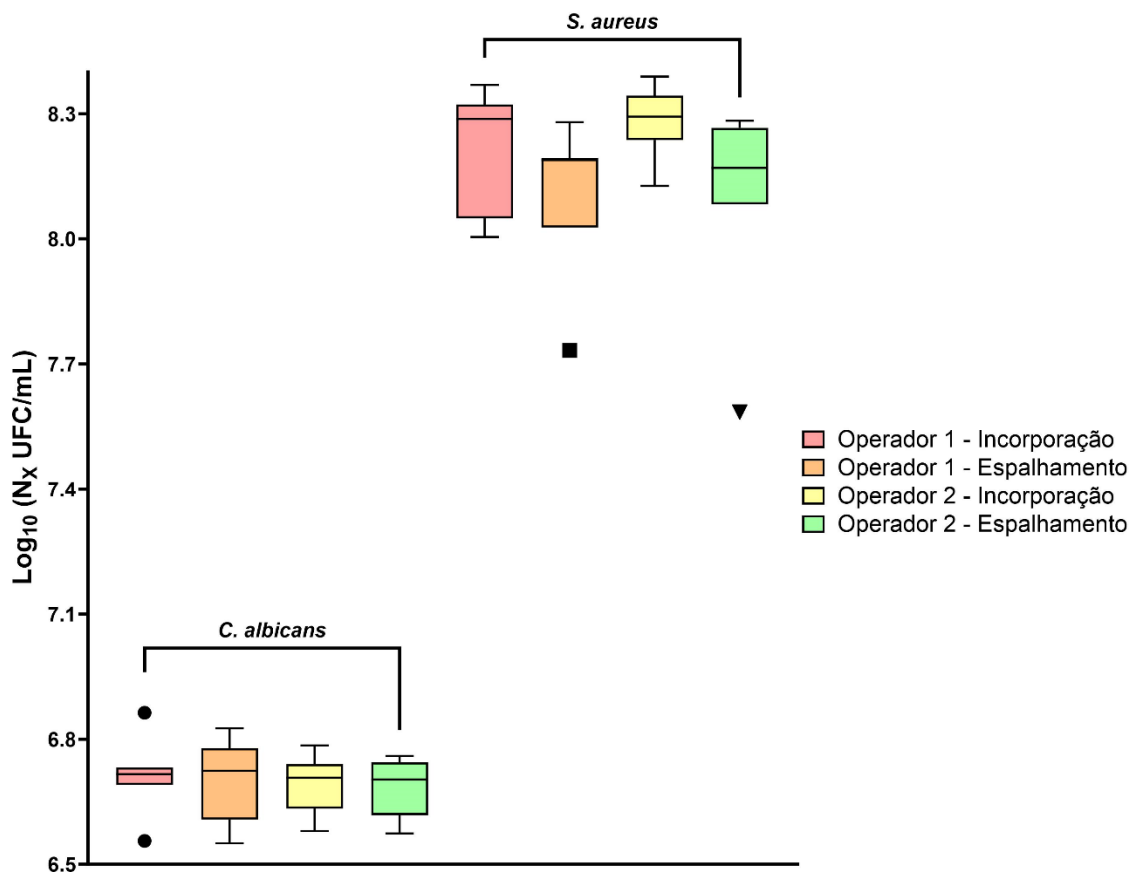


Figura 2 – Gráfico *Box plot* dos controles da estirpe *C. albicans* e *S. aureus* para os Operadores 1 e 2 por as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos *outliers*.

A observação dos dados obtidos na Tabela 2 e Tabela 3 e na Figura 1 e Figura 2 não permitem obter conclusões sobre diferenças significativas, logo foi necessária a análise estatística das médias. Em microbiologia, frequentemente, os dados não seguem distribuições normais, no entanto, estes podem ser transformados em logaritmos para normalizar a distribuição (57). Ademais, a distribuição em muitos casos aparenta ser assimétrica e o tamanho amostral é pequeno ( $n < 30$ ) para assumir uma distribuição normal (58). Tudo isto levou à decisão de realizar o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* estando os valores de  $p$  obtidos indicados na Tabela 4. Todos os valores representados são superiores a 0,05 e como foi definido que para se concluir que haveria uma diferença significativa  $p < 0,05$  deduz-se que não há diferenças significativas entre as médias do Operador 1 e 2 quer seja por incorporação ou espalhamento.

**Tabela 4** – Resultados do teste estatístico não paramétrico de *Mann-Whitney* da comparação entre o Operador 1 e Operador 2 para as metodologias de incorporação e espalhamento.

Mann-Whitney		Operador 1 vs. Operador 2		
		Incorporação	Espalhamento	
Amostra	<i>C. albicans</i>	Valor P	0,9210	0,4397
	<i>S. aureus</i>		0,6180	0,1782
	<i>E. coli</i>		0,3939	>0,9999
	<i>P. aeruginosa</i>		0,8182	0,9307
Controlo	<i>C. albicans</i>		0,6830	0,5134
	<i>S. aureus</i>		0,6282	0,9015
	<i>E. coli</i>		0,7000	0,7000
	<i>P. aeruginosa</i>		0,6857	0,8857

### 3.2. Análise metodologia de incorporação e espalhamento

Após a conclusão de que não há diferenças significativas entre as médias do Operador 1 e Operador 2 para o método de incorporação/espalhamento os dados dos dois Operadores foram agregados de forma a poder comparar as metodologias.

**Tabela 5** – Resultados da Análise de Estatística Descritiva para as amostras de produtos cosméticos após junção dos valores do Operador 1 e 2.

Amostra		Incorporação	Espalhamento
<i>C. albicans</i>	n	24	23
	Média	6,680	6,696
	Desvio-padrão	0,1016	0,09945
	Mínimo	6,491	6,462
	Máximo	6,848	6,863
<i>S. aureus</i>	n	23	24
	Média	8,171	8,114
	Desvio-padrão	0,1723	0,2481
	Mínimo	7,748	7,550
	Máximo	8,460	8,433
<i>E. coli</i>	n	12	11
	Média	8,016	8,063
	Desvio-padrão	0,1856	0,2365
	Mínimo	7,399	7,544
	Máximo	8,212	8,275
<i>P. aeruginosa</i>	n	12	11
	Média	8,029	7,993
	Desvio-padrão	0,2154	0,1959
	Mínimo	7,633	7,667
	Máximo	8,339	8,281

Novamente iniciou-se a avaliação dos resultados com uma análise estatística descritiva que está apresentada na Tabela 5 e Tabela 6. O valor de n provém da junção dos valores dos dois operadores e a observação direta da média não permite retirar conclusões. Já no desvio-padrão verifica-se que a maior dispersão de resultados nas amostras (Tabela 5) e controlo (Tabela 6) ocorre na estirpe *S. aureus* por espalhamento e a menor na estirpe *C. albicans* nos métodos de espalhamento e incorporação, respetivamente.

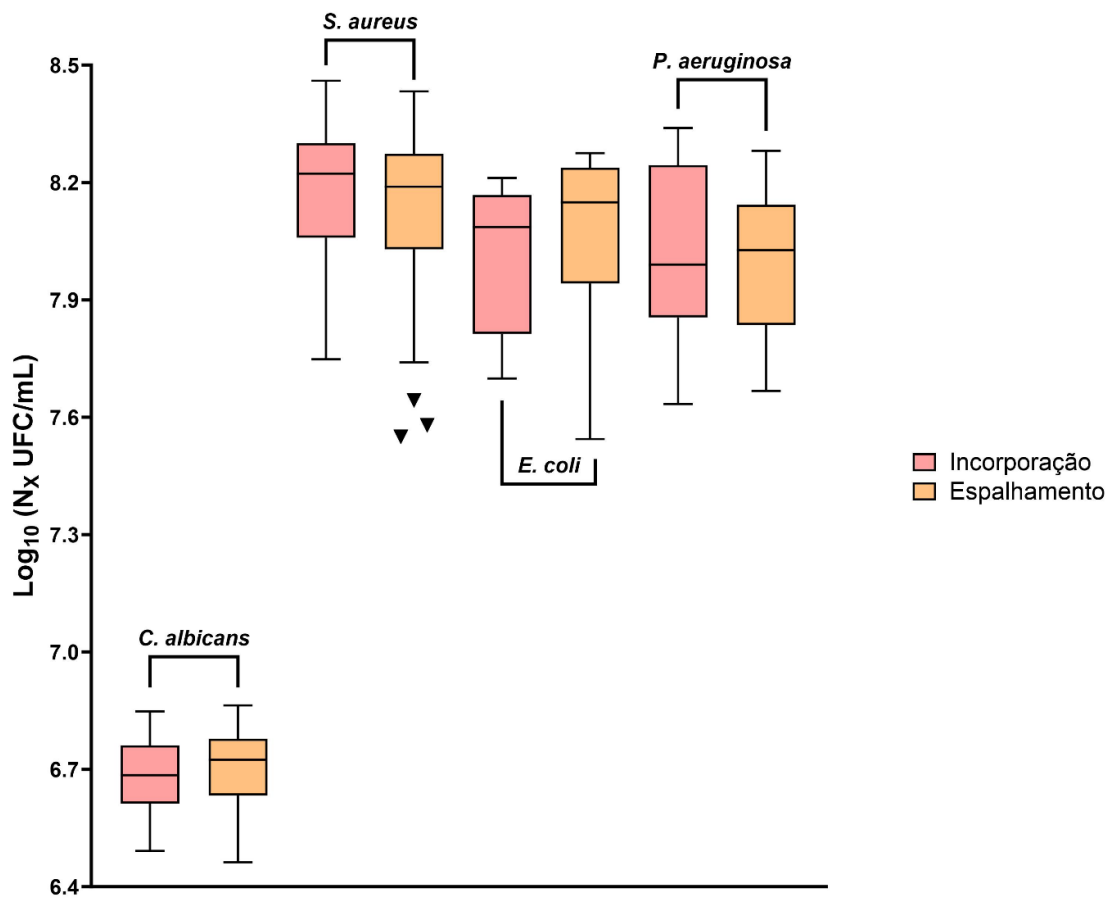


Figura 3 – Gráfico *Box plot* das estirpes *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* para as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos *outliers*.

Foram construídos novos gráficos *Box plot* e estes apresentam-se na Figura 3 e Figura 4. Em ambos os gráficos estão indicados *outliers*, todavia apenas na Figura 4 os *outliers* da estirpe *S.*

*aureus* alteram os resultados, por conseguinte, foram analisados e representados os resultados com e sem *outliers* para esta estirpe.

**Tabela 6** – Resultados da Análise de Estatística Descritiva dos controlos do estudo após junção dos valores do Operador 1 e 2.

Controlo	Incorporação	Espalhamento
<i>C. albicans</i>	n	14
	Média	6,700
	Desvio-padrão	0,07900
	Mínimo	6,556
	Máximo	6,863
<i>S. aureus</i>	n	13
	Média	8,246
	Desvio-padrão	0,1218
	Mínimo	8,004
	Máximo	8,389
<i>E. coli</i>	n	6
	Média	8,042
	Desvio-padrão	0,1621
	Mínimo	7,813
	Máximo	8,210
<i>P. aeruginosa</i>	n	8
	Média	8,042
	Desvio-padrão	0,1547
	Mínimo	7,869
	Máximo	8,262

Na Figura 3 as medianas aparentam ser semelhantes entre os métodos, por estirpe. Ora na Figura 4 as medianas nas estirpes *S. aureus* e *P. aeruginosa* parecem estar mais afastadas tendo esta última estirpe uma distribuição diferente entre os métodos.

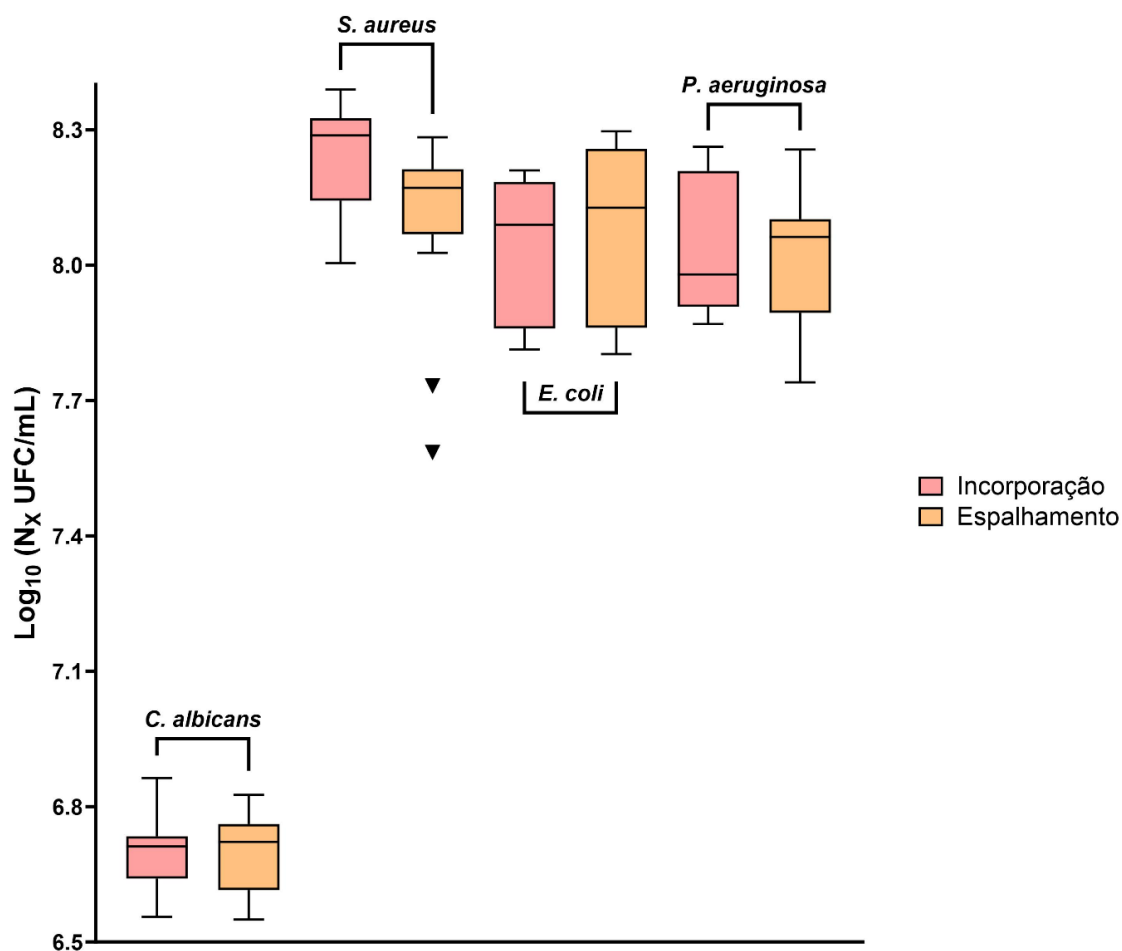


Figura 4 - Gráfico Box plot do controle das estirpes *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* para as metodologias de incorporação e espalhamento com indicação dos outliers.

A comparação dos métodos realizou-se através do teste *Mann-Whitney* e os valores de p estão apresentados na Tabela 7 e Tabela 8.

Tabela 7 - Resultados do teste estatístico não paramétrico de *Mann-Whitney* da comparação entre as metodologias de incorporação e espalhamento.

Mann-Whitney			Incorporação vs. Espalhamento
Amostra	<i>C. albicans</i>	Valor P	0,6846
	<i>S. aureus</i>		0,5441
	<i>E. coli</i>		0,3164
	<i>P. aeruginosa</i>		0,7859
Controlo	<i>C. albicans</i>		0,7429
	<i>E. coli</i>		0,6991
	<i>P. aeruginosa</i>		0,8785

**Tabela 8** – Resultados do teste estatístico não paramétrico de *Mann-Whitney* da comparação entre as metodologias de incorporação e espalhamento da estirpe *S. aureus* com e sem *outliers*.

Mann-Whitney			Incorporação vs. Espalhamento
Controlo <i>S. aureus</i>	Com Outliers	Valor P	0,0193
	Sem Outliers		0,0597

Para a estirpe *S. aureus* (Tabela 8) foi necessário realizar o teste com e sem a presença de *outliers*, visto que estes alteram as conclusões. Na Tabela 7 todos os valores de p são superiores a 0,05, logo conclui-se que não há diferenças significantes entre as médias do método de incorporação e de espalhamento. Na Tabela 8 a remoção dos *outliers* permite retirar a mesma conclusão.

#### 4. Discussão

Geralmente, antes da utilização de um método em laboratório é necessário realizar dois processos, um para provar que o método é apto para o propósito e outro para demonstrar que o laboratório executa o método de forma confiável (59). Todavia, os métodos descritos em documentos como as ISO já foram sujeitos a validações extensas e foram considerados aptos para o seu propósito (49,50). Conquanto, continua a ser necessário que uma instituição demonstre através de testes adequados e documentação que o laboratório executa o método de forma confiável (49). Este processo de verificação foi iniciado no presente estudo com a avaliação do método de espalhamento na demonstração da aptidão do método nas normas de enumeração de microrganismos da ISO (13,14). A microbiologia é uma ciência extremamente variável o que pode resultar em dificuldades em comparar dois métodos (51). Por esta razão nas normas ISO são aceites diferenças nas contagens até 50% tanto entre duplicados como entre as amostras e controlo (13,14). Como já foi referido na avaliação de um novo método é pertinente que o método alternativo permita ao utilizador tomar uma decisão equivalente e consistente em relação à amostra ou qualidade do produto (51). Devido aos critérios de exclusão o número de amostras em que foi possível retirar a conclusão pretendida está representado na Tabela 2 no número de valores analisados. Ou seja, em  $n$  amostras (Tabela 2) as contagens encontravam-se entre as 15 e 150 colónias para bolores e leveduras (14) ou 30 e 300 colónias para bactérias (13) e as diferenças entre duplicados e entre amostra e controlo era inferior a 50% podendo-se demonstrar que o método (neutralizante) é apto (13,14). Independentemente desta conclusão foi necessário realizar um teste de hipóteses para apurar se havia diferenças significativas entre as médias dos Operadores para ambas as metodologias de forma a verificar se seria possível associar os dados dos operadores. Como já foi referido considerou-se que havia uma diferença significativa entre dois grupos quando  $p < 0,05$ . Foi possível concluir que não há diferenças significativas entre as médias dos Operadores para as metodologias de incorporação e espalhamento tanto nas amostras como nos controlos (Tabela 4). Esta comparação permite analisar outro conceito, a reprodutibilidade. A reprodutibilidade é importante para a avaliação de metodologias, visto que é uma forma de avaliar diferenças entre operadores (60). Uma vez que, não há diferenças significativas entre operadores pode-se deduzir que tal como o método de incorporação o método de espalhamento é reprodutível no laboratório. Contudo, estes resultados não eliminam a necessidade de treinar e demonstrar as competências dos operadores (49,61).

Visto não se ter observado diferenças entre operadores os dados do Operador 1 e 2 foram agregados de forma a comparar as metodologias. Os dados agregados foram novamente analisados pelo teste de *Mann-Whitney* (Tabela 7 e 8). Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de ambas as metodologias para as estirpes *C. albicans*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Através destes resultados (Tabela 7) demonstra-se que o método de incorporação e de espalhamento são intercálaveis para estas estirpes no laboratório. No entanto, para o controlo da estirpe *S. aureus* o resultado é alterado quando este é analisado com e sem os *outliers* identificados na Figura 4. Quando se realiza o teste não paramétrico com os *outliers* verifica-se que há diferenças significativas entre os dois métodos, no entanto sem *outliers* verifica-se que não há diferenças estatisticamente significativas, embora o valor p seja muito próximo do limite. No teste estatístico de *Mann-Whitney* é realizada uma comparação da média de dois grupos (62) as quais são influenciadas por valores extremos, *outliers* (56). Os dois *outliers* observados na Figura 4 foram causados por uma amostra na qual ambos os Operadores obtiveram valores de contagens por espalhamento relativamente inferiores quando comparados com os valores obtidos por incorporação (valores não apresentados). Para o Operador 2 nesta amostra há uma diferença superior a 50% entre as metodologias e para o Operador 1, embora a diferença não chegue aos 50% encontra-se extremamente próxima. Como já foi referido a microbiologia é uma ciência variável o que dificulta a comparação de métodos (51), contudo, estas diferenças elevadas podem ter sido devido a erros nas diluições ou de pipetagem. Esta é uma das limitações de testes estatísticos em que apenas se compara as médias de dois grupos, uma vez que, existem casos pontuais que alteram os resultados (63).

Sumarizando, através das análises estatísticas das médias (Tabela 7 e Tabela 8) e do número de amostras não rejeitadas (Tabela 2) é possível concluir que o método de espalhamento e de incorporação são permutáveis. Desta forma demonstra-se que o laboratório possui competências para realizar a técnica de espalhamento no processo de demonstração da aptidão do método das ISO de enumeração de microrganismos.

Similarmente uma comparação entre os métodos de incorporação e espalhamento foi realizada por Hoben *et al.* (64). Nesse artigo foram comparadas três metodologias para a enumeração de inóculo de *Rhizobium spp.* e os resultados obtidos foram similares ao do presente estudo. Ou seja, comprovou-se que as metodologias são permutáveis (64). Porém no estudo por Taylor *et al.* (65) verificou-se que o método de espalhamento permite obter contagens superiores em relação ao método de incorporação (65). Todavia, neste artigo as instâncias em que isto ocorreu

foram na enumeração de microrganismos viáveis em amostras recolhidas (65) ao oposto do que acontece neste estudo em que são quantificadas amostras contaminadas por um inóculo calibrado. Isto demonstra uma das limitações deste estudo que foi apenas os ensaios utilizando o procedimento de demonstração da aptidão do método. Seria de interesse realizar um estudo similar para o passo de enumeração de microrganismos viáveis descrito nas ISO (13,14) para verificar se iria observar-se a mesma tendência. Outra limitação foi o número de amostras analisadas. Seria importante para a verificação dos resultados obtidos neste estudo realizar um novo ensaio com um número superior de amostras. Ademais, a realização da análise de padrões de calibração iria permitir avaliar a repetibilidade do método de espalhamento e obter mais evidências das competências do laboratório.

## 5. Conclusão

Um produto cosmético para entrar no mercado europeu deve passar por um moroso e dispendioso processo, no qual, todo o produto desde os seus ingredientes base até à sua embalagem final são analisados e avaliados. Durante este processo vários testes são realizados ao produto cosmético em termos da sua qualidade, quer esta seja química, física ou microbiológica. Para este último os ensaios realizados aos cosméticos passam da enumeração e deteção de microrganismos até à avaliação das propriedades antimicrobianas.

A enumeração de microrganismos pode ser realizada seguindo normas internacionais, como as ISO 21149 e 16212. Uma instituição deve demonstrar através de testes adequados e documentação que o laboratório microbiológico executa os métodos de forma confiável, um processo que foi iniciado com este projeto para a metodologia de espalhamento. Através da análise de dados obtidos pelo procedimento de demonstração da aptidão do método foi possível concluir que para as estirpes *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* não havia evidências de diferenças significativas entre operadores e entre dois dos métodos (incorporação e espalhamento) pelos quais se pode realizar esta análise.

O objetivo deste estudo foi concluído, uma vez que foi possível comparar as metodologias de espalhamento e incorporação no procedimento de demonstração da aptidão do método. No entanto, a substituição do método de incorporação pelo método de espalhamento ainda não será possível sendo necessários mais estudos. Os objetivos de aprendizagem definidos no Capítulo I também foram atingidos através da familiaridade teórica e prática com o controlo de qualidade do produto cosmético, assim como das normas internacionais ISO.

Para perspetivas futuras seria de interesse utilizar um maior número de amostras, de forma a validar os resultados obtidos. Seria também importante realizar a análise de padrões de calibração para avaliar a repetibilidade do método de espalhamento e para obter mais evidências das competências do laboratório. Para proceder à substituição do método de incorporação seriam necessários estudos abrangentes de toda a gama de resultados para o uso pretendido, ou seja, incluir o processo de quantificação de microrganismos na amostra ("amostra tal e qual"). Para isso a utilização de amostras brancas, amostras de controlo e participação de testes interlaboratoriais seria benéfico para a verificação do novo método.

## Referências Bibliográficas

1. COSMETEK [Internet]. [cited 2022 Feb 21]. COSMETEK - Cosmetic Lab & Consulting. Available from: <https://www.cosmetek.org/>
2. ISO 9001:2015 - Quality management systems – Requirements.
3. ISO 22716:2007 - Cosmetics – Good Manufacturing Practices (GMP) – Guidelines on Good Manufacturing Practices.
4. Regulamento (CE) n. 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de Novembro de 2009, relativo aos produtos cosméticos. Nov 30, 2009.
5. March GA, Garcia-Loygorri MC, Eiros JM, Bratos MA, Ortiz de Lejarazu R. Chapter 18 - Microbiological Quality in Cosmetics. In: Salvador A, Chisvert A, editors. Analysis of Cosmetic Products (Second Edition). Boston: Elsevier; 2018. p. 585–97.
6. Cosmetri [Internet]. [cited 2022 Jul 4]. EU Regulation 1223/2009. Available from: <https://www.cosmetri.com/eu-regulation-1223-2009/>
7. Cosmetri [Internet]. [cited 2022 Jul 4]. GMP for Cosmetics ISO 22716. Available from: <https://www.cosmetri.com/gmp-for-cosmetics/>
8. ISO/TR 18811:2018 - Cosmetics – Guidelines on the stability testing of cosmetic products.
9. Cosmetek. Testes de estabilidade. 2019.
10. ISO 29621:2017 - Cosmetics – Microbiology – Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products.
11. ISO 17516:2014 - Cosmetics – Microbiology – Microbiological limits.
12. ISO 11930:2019 - Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.
13. ISO 21149:2017 - Cosmetics – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria.
14. ISO 16212:2017 - Cosmetics – Microbiology – Enumeration of yeast and mould.
15. ISO 18415:2017 - Cosmetics – Microbiology – Detection of specified and non-specified microorganisms.
16. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. Int J Mol Sci. 2021 Sep 14;22(18):9922.
17. York MK, Baron EJ, Clarridge JE, Thomson RB, Weinstein MP. Multilaboratory validation of rapid spot tests for identification of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2000 Sep;38(9):3394–8.

18. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol.* 2017 Sep;123(3):570–81.
19. Celeiro M, Varela E, Rodriguez R, Penedo M, Lores M. Tracking Bacterial Spoilage in Cosmetics by a New Bioanalytical Approach: API-SPME-GC-MS to Monitor MVOCs. *Cosmetics.* 2020 Jun;7(2):38.
20. Tuttle AR, Trahan ND, Son MS. Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Curr Protoc.* 2021;1(1):20.
21. WHO [Internet]. [cited 2022 Jul 6]. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
22. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 17;21(22):8671.
23. LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol.* 2012 May;0 6:Unit-6E.1.
24. Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019 Nov 7;35(11):178.
25. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today.* 2019 Jan 1;24(1):350–9.
26. Aryee A, Edgeworth JD. Carriage, Clinical Microbiology and Transmission of *Staphylococcus aureus*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;409:1–19.
27. Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Rev.* 2018 Jun;39(6):287–98.
28. Missiakas DM, Schneewind O. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr Protoc Microbiol.* 2013 Feb;Chapter 9:Unit-9C.1.
29. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence.* 2021 Dec;12(1):547–69.
30. Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Jul 16;18(14):7602.
31. Microbe Online [Internet]. [cited 2022 Jul 6]. *Candida albicans*: Pathogenesis, Diseases, Lab Diagnosis. Available from: <https://microbeonline.com/candida-albicans-pathogenesis-diagnosis/>
32. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi Basel Switz.* 2021 Jan 22;7(2):79.

33. Förster TM, Mogavero S, Dräger A, Graf K, Polke M, Jacobsen ID, et al. Enemies and brothers in arms: *Candida albicans* and gram-positive bacteria. *Cell Microbiol.* 2016 Dec;18(12):1709–15.
34. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022 Dec;13(1):89–121.
35. Sanar | Medicina [Internet]. [cited 2022 Jul 6]. Resumo de *Candida*: definição, micologia e infecções. Available from: <https://www.sanarmed.com/resumo-de-candida-definicao-micologia-e-infecoes>
36. Sanders ER. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *JoVE J Vis Exp.* 2012 May 11;(63):e3064.
37. Ferone M, Gowen A, Fanning S, Scannell AGM. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020 Nov;19(6):3106–29.
38. Microbe Notes [Internet]. [cited 2022 Aug 25]. Pour Plate Method- Definition, Principle, Procedure, Uses. Available from: <https://microbenotes.com/pour-plate-technique-procedure-significance-advantages-limitations/>
39. Microbe Notes [Internet]. [cited 2022 Aug 25]. Spread Plate Method- Definition, Principle, Procedure, Uses. Available from: <https://microbenotes.com/spread-plate-technique/>
40. Terrones-Fernandez I, Casino P, López A, Peiró S, Ríos S, Nardi-Ricart A, et al. Improvement of the Pour Plate Method by Separate Sterilization of Agar and Other Medium Components and Reduction of the Agar Concentration. *Microbiol Spectr.* 11(1):e03161–22.
41. Microbe Online [Internet]. [cited 2022 Aug 25]. Pour Plate Method: Procedure, Uses, (Dis) Advantages. Available from: <https://microbeonline.com/pour-plate-method-principle-procedure-uses-dis-advantages/>
42. Silva N da, Taniwaki MH, Junqueira VC, Silveira N, Nascimento M da S do, Gomes RAR. *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual.* CRC Press; 2012. 474 p.
43. Biology LibreTexts [Internet]. [cited 2023 Sep 16]. Media Preparation. Available from: [https://bio.libretexts.org/Learning\\_Objects/Laboratory\\_Experiments/Microbiology\\_Labs/Microbiology\\_Labs\\_I/01%3A\\_Media\\_Preparation](https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/01%3A_Media_Preparation)
44. Sigmaaldrich [Internet]. [cited 2023 Aug 29]. Types of Media in Microbiology. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/microbial-culture-media-preparation/types-of-media-in-microbiology>
45. Cabri [Internet]. [cited 2023 Sep 18]. Preparation and Storage of Culture Media. Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M203Ap1.html>

46. Microbe Online [Internet]. [cited 2023 Sep 18]. Best Practices for Preparation of Culture Media. Available from: <https://microbeonline.com/preparation-of-culture-media/>
47. Zeece M. Chapter Seven – Food additives. In: Zeece M, editor. Introduction to the Chemistry of Food. Academic Press; 2020. p. 251–311.
48. Teknova [Internet]. [cited 2023 Sep 18]. Protocol How to melt agar. Available from: <https://teknova.com/en/resources/protocol-how-to-melt-agar.html#accordion-952b625976-item-b644193044>
49. Gupta R. Validation of Microbiological Methods – Expectations for Regulatory Compliance. BioPharma Asia. 2014 Sep 1;3:24.
50. NATA Technical Note 17– Guidelines for validation and verification of quantitative and qualitative test methods.
51. Sandle T. Approaching Microbiological Method Validation. J GXP Compliance. 2015 Dec 20;19:1–15.
52. ISO 21148:2017 - Cosmetics – Microbiology – General instructions for microbiological examination.
53. NIH [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Finding and Using Health Statistics. Available from: <https://www.nlm.nih.gov/oet/ed/stats/02-900.html>
54. GraphPad Prism [Internet]. [cited 2023 Sep 19]. GraphPad Prism 10 User Guide – Box and whiskers graphs. Available from: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/user-guide/box-and-whiskers.htm>
55. Krzywinski M, Altman N. Visualizing samples with box plots. Nat Methods. 2014 Feb 1;11(2):119–20.
56. Statology [Internet]. [cited 2023 Sep 19]. The Complete Guide: When to Remove Outliers in Data. Available from: <https://www.statology.org/remove-outliers/>
57. Gao A, Martos P. Log Transformation and the Effect on Estimation, Implication, and Interpretation of Mean and Measurement Uncertainty in Microbial Enumeration. J AOAC Int. 2019 Jan 1;102(1):233–8.
58. Chin R, Lee BY. Chapter 15 – Analysis of Data. In: Chin R, Lee BY, editors. Principles and Practice of Clinical Trial Medicine. New York: Academic Press; 2008. p. 325–59.
59. ISO [Internet]. [cited 2023 Sep 19]. Method validation and method verification. Available from: <https://committee.iso.org/sites/tc34sc9/home/essential-information/content-left-area/validation-of-methods/method-validation-and-method-ver.html>
60. Minitab [Internet]. [cited 2023 Sep 19]. O que é um estudo de medição de repetibilidade e reprodutibilidade (R&R)? Available from: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/20/help-and-how-to/quality-and-process-improvement/measurement-system-analysis/supporting-topics/gage-r-r-analyses/what-is-a-gage-r-r-study/>

61. Schwarz R. Qualification of Microbiological Laboratory Personnel and Equipment. In: Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control. John Wiley & Sons, Ltd; 2019. p. 57–77.
62. Statistics Solutions [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Mann-Whitney U Test. Available from: <https://www.statisticssolutions.com/free-resources/directory-of-statistical-analyses/mann-whitney-u-test/>
63. EduKedar [Internet]. [cited 2023 Sep 28]. Limitations of Statistics: Disadvantages, Assumptions. Available from: <https://edukedar.com/limitations-of-statistics/>
64. Hoben HJ, Somasegaran P. Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of Rhizobium spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat. Appl Environ Microbiol. 1982 Nov;44(5):1246–7.
65. Taylor RH, Allen MJ, Geldreich EE. Standard plate count: A comparison of pour plate and spread plate methods. J Am Water Works Assoc. 1983;75(1):35–7.