

Portaria nº 1.480, de 31 de dezembro de 1990
(Publicada em D.O.U. 7 de janeiro de 1991)

O **Ministro de Estado da Saúde**, no uso das atribuições que lhe confere o art. 87, Parágrafo Único, inciso I e II, da Constituição e tendo em vista os resultados da revisão procedida quanto aos requisitos de qualidade aplicáveis aos produtos absorventes higiênicos descartáveis, destinados ao asseio corporal, **resolve**:

1 Os produtos absorventes higiênicos descartáveis, destinados ao asseio corporal estão isentos de registro na Secretaria de Vigilância Sanitária (SNVS), continuando porém sujeitos ao regime de Vigilância Sanitária, para os demais efeitos da Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1.976, Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1.977 e legislação correlata complementar.

2 A comercialização dos produtos supracitados fica condicionada à comunicação prévia a ser feita pela empresa produtora, sediada no Brasil, à área de produtos do Departamento Técnico Normativo da SNVS, por escrito, de que os mesmos atendem o disposto nesta Portaria e no Regulamento Técnico anexo.

2.1 Em se tratando de produto importado, a empresa responsável por sua importação ou distribuição apresentará como condição prévia para a respectiva comercialização no Brasil, declaração emitida pela autoridade sanitária do país de origem, de que o produto atende o disposto nesta Portaria e no seu Regulamento Técnico anexo.

3 Os rótulos das embalagens dos produtos de que trata esta Portaria deverão estampar a expressão: "DISPENSADO DE REGISTRO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE", sem prejuízo dos demais requisitos de rotulagem, estabelecidos na legislação de vigilância sanitária.

3.1 No caso de produtos importados, é obrigatório que todos os dizeres de rotulagem sejam estampados em idiomas português, sem prejuízo de sua inscrição paralela no idioma do país de origem.

4 Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário, especialmente as da Resolução Normativa nº 9, de 29 de novembro de 1.978, da extinta Câmara Técnica de Medicamentos, do Conselho Nacional de Saúde.

Alceni Guerra

REGULAMENTO TÉCNICO PARA CONTROLE DE PRODUTOS ABSORVENTES HIGIÊNICOS DESCARTÁVEIS, DE USO EXTERNO E INTRAVAGINAL

ANEXO I

PRODUTOS ABSORVENTES DESCARTÁVEIS, DE USO EXTERNO

1. Definição

- 1.1 São considerados produtos absorventes descartáveis de uso externo os artigos destinados ao asseio corporal, aplicados diretamente sobre a pele, com a finalidade de absorver ou reter excreções e secreções orgânicas, tais como urina, fezes, leite materno e as excreções de natureza menstrual e intermenstrual.
- 1.2 Estão compreendidas nesse grupo os absorventes higiênicos femininos de uso externo, as fraldas para bebês, as fraldas para adultos e os absorventes de leite materno.

2. Composição

Os produtos absorventes descartáveis, de uso externo, são compostos por:

- 2.1 Uma capa de tela polimérica, que permita a passagem de fluídos orgânicos e que retenha fezes;
- 2.2 Um núcleo absorvente, destinado a armazenar fluídos orgânicos que atravessam a primeira camada, composto por algodão hidrófilo, polpa de celulose virgem e/ou materiais poliméricos absorventes;
- 2.3 Uma capa de apoio estrutural.

3. Requisitos de Qualidade

- 3.1 As matérias-primas presentes na composição desses produtos deverão ser de natureza atóxica, para confirmação da qual serão submetidas, obrigatoriamente, aos seguintes ensaios pré-clínicos: irritação cutânea primária e sensibilização. Esses ensaios serão efetuados para cada tipo de matéria-prima empregada na confecção desses produtos, e deverão ser repetidos toda vez que for(em) mudada(s) a(s) matéria(s)-prima(s) especificada(s) no processo de fabricação;
- 3.2 Os produtos acabados deverão ser submetidos aos seguintes ensaios pré-clínicos: irritação cutânea primária, irritação cutânea cumulativa e

sensibilização. Esses ensaios deverão ser repetidos toda vez que for alterado o respectivo processo de fabricação.

4. Controle de Fabricação

- 4.1 As fábricas deverão estar devidamente habilitadas a funcionar pela autoridade competente, adotando as “Boas Práticas de Fabricação” preconizadas pela Organização Mundial da Saúde;
- 4.2 Todas as matérias-primas e os produtos acabados deverão ser analisados de acordo com métodos capazes de aferir sua inocuidade e submetidos a avaliação microbiológica de orientação, com periodicidade variável, de acordo com a natureza de cada material.
 - 4.2.1 As avaliações microbiológicas deverão responder aos seguintes limites de aceitabilidade para uma amostra de 5g: ausência de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp ou *Clostridium sulfitorredutor*. A contagem de germes aeróbios mesófilos não devem ultrapassar a 1000 unidades formadoras de colônia (ufc), por grama de amostra. A contagem de fungos e leveduras não devem ser superior a 100 ufc, por grama de amostra.
 - 4.2.2 Em todos os casos, serão empregados métodos de ensaios de reconhecida validade, descritos no Anexo 3, deste Regulamento.
 - 4.2.3 Os ensaios deverão ser realizados em laboratórios da empresas ou instituições que estejam sob controle da autoridade competente.
- 4.3 Cada lote do produto deverá ser identificado mediante codificação, impressa no respectivo rótulo, que permita localizar e rever, nos registros próprios, todas as operações de fabricação e inspeção, praticadas durante os ciclos de produção.
 - 4.3.1 Os rótulos deverão conter a marca do produto, o nome do estabelecimento produtor, ou fracionador, o nome do responsável técnico e a expressão “Dispensado de Registro no Ministério da Saúde”.
- 4.4 Os documentos em que estejam registrados os resultados dos ensaios de controle de fabricação, aludidos no item 4.2, deverão ser arquivados na empresa fabricante, por um período de cinco anos, para permitir, a qualquer momento, a ação de vigilância sanitária.

5. Armazenagem

- 5.1 Os produtos absorventes descartáveis, de que trata este Regulamento, deverão ser armazenados em local seco e limpo, livre de roedores e insetos.

ANEXO 2

PRODUTOS ABSORVENTES DESCARTÁVEIS, DE USO INTRAVAGINAL

1. Definição

- 1.1 São considerados produtos absorventes descartáveis, de uso intravaginal, os artigos destinados a absorver ou reter excreções e secreções menstruais e intermenstruais, aplicadas por inserção vaginal.

2. Composição

- 2.1 Os produtos de que trata este Regulamento deverão ser compostos de fibras de algodão hidrófilo e/ou outros materiais absorventes, que não contenham quaisquer ingredientes farmacologicamente ativos.

3. Requisitos de Qualidade

- 3.1 As matérias-primas presentes na composição dos produtos devem ser de natureza atóxica, para confirmação da qual serão submetidas, obrigatoriamente, aos seguintes ensaios pré-clínicos: citotoxicidade, irritação cutânea primária e sensibilização. Esses ensaios serão efetuados para cada tipo de matéria-prima empregada na confecção desses produtos, e deverão ser repetidos toda vez que for(em) mudada(s) a(s) matéria(s)-prima(s) especificada(s) no processo de fabricação.
- 3.2 Os produtos acabados deverão ser submetidos aos seguintes ensaios pré-clínicos: irritação cutânea primária, irritação cutânea cumulativa e sensibilização. Esses ensaios deverão ser repetidos toda vez que for alterado o respectivo processo de fabricação.

4. Controle de Fabricação

- 4.1 Todas as matérias-primas componentes dos produtos deverão ser analisados de acordo com métodos capazes de aferir sua inocuidade e submetidas a avaliação microbiológica de orientação, com periodicidade variável, de acordo com a natureza de cada material.
- 4.2 Os produtos acabados também deverão ser analisados através de métodos capazes de aferir sua inocuidade.

- 4.2.1 A contagem de germes deverá ser inferior a 1000 microrganismos, por unidade elaborada. Garantida essa condição, o ensaio microbiológico posterior deverá demonstrar ausência de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e de microrganismos anaeróbios. Quando a contagem microbiana estiver ente 500 e 1000 ufc por unidade de produto, deverá ser procedida a imediata revisão das condições de operação fabril.
- 4.2.2 Em todos os casos, serão empregados métodos de ensaio de reconhecida validade, descritos no Anexo 3, deste Regulamento.
- 4.2.3 Os ensaios deverão ser realizados em laboratórios da indústria ou instituição que estejam sob controle da autoridade competente.
- 4.3 As empresas que intervenham na elaboração e/ou fracionamento de produtos compreendidos neste Regulamento deverão obter autorização prévia de funcionamento por parte da autoridade sanitária competente e a fabricação dos referidos produtos deverá estar sob a responsabilidade técnica de profissional habilitado.
- 4.3.1 Os estabelecimentos, seus equipamentos e instalações, dedicados às atividades enunciadas no item anterior, assim como os processos de fabricação e de controle químico-microbiológico, deverão responder às "Boas Práticas de Fabricação", enunciadas pela Organização Mundial da Saúde.
- 4.3.2 A área e os equipamentos onde se realiza a fabricação desses produtos deverão ser de uso exclusivo.
- 4.4 A embalagem dos produtos contemplados neste Regulamento deverá reunir condições que impeçam sua contaminação.
- 4.4.1 Os rótulos deverão conter a marca do produto, o nome do estabelecimento produto, ou fracionador, o nome do responsável técnico e a expressão "Dispensado de Registro no Ministério da Saúde".
- 4.5 Cada lote do produto deverá ser identificado mediante codificação, impressa no respectivo rótulo, que permita localizar e rever, nos registros próprios, todas as operações de fabricação e inspeção praticadas durante os ciclos de produção.
- 4.6 Os documentos em que estejam registrados os resultados dos ensaios de controle de fabricação, aludidos nos itens 4.1 e 4.2, deverão ser arquivados na empresa fabricante, por um período de cinco anos, para permitir, a qualquer momento, a ação de vigilância sanitária.

5. Armazenagem

- 5.1 Os produtos absorventes descartáveis, de que trata este Regulamento, deverão ser armazenados em local seco e limpo, livre de roedores e insetos.

ANEXO 3

ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS PARA PRODUTOS ABSORVENTES DESCARTÁVEIS, DE USO EXTERNO E DE USO INTRAVAGINAL

1. Irritação Cutânea Primária

1.1 OBJETIVO

O presente método visa à avaliação do potencial de Irritação Cutânea Primária, após uma única aplicação, da substância a ser ensaiada.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 EQUIPAMENTOS

- estufa
- erlenmeyer
- tesoura
- pipeta de 1,0 ml
- tricotomizador
- seringa de 1,0 ml
- espátula
- balança analítica
- agulha de injeção esterilizada
- gaze estéril
- fita adesiva hipo-alérgico
- esparadrapo
- paquímetro
- lente de aumento

1.2.2 SOLUÇÕES

- Solução isotônica de cloreto de sódio esterilizada
- Água destilada esterilizada

1.2.3 ANIMAIS

- Seis (6) coelhos albinos, machos ou fêmeas, e de peso corpóreo de 2 Kg a 3 Kg.
- Os animais devem ser mantidos em gaiolas individuais, durante todo o período do ensaio, em sala de temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) e de umidade relativa entre 30% e 70%.

1.2.4 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

- 1.2.4.1 O animal que apresentar reação positiva, em ensaio anterior de irritação cutânea, não deverá ser utilizado para um novo ensaio de irritação cutânea (vide critério para reação positiva, item 1.2.10.2).
- 1.2.4.2 O animal que tenha apresentado reação negativa, em ensaio anterior de irritação cutânea, só poderá ser utilizado para um novo ensaio de irritação cutânea uma semana após o final do ensaio anterior (ver item 1.2.10.2, para a validade desta reutilização).
- 1.2.4.3 Após a tricotomização dos animais, observar se a pele dos mesmos se encontra íntegra, isto é, sem nenhuma lesão. Rejeitar os portadores de problemas na pele.

OBSERVAÇÕES:

- Registrar o peso corpóreo dos animais, no início e no final do ensaio.
- Animais que forem usados para ensaio com substância que altere a cor da pele não devem ser usados para ensaio de irritação cutânea.

1.2.5 PREPARO DOS ANIMAIS

- Tricotomizar cuidadosamente cada animal em 4 (quatro) áreas dorsais (duas superiores e duas inferiores), de 250 mm² cada uma, 6 h a 24 h antes do início do ensaio.
- Fazer 2 (duas) ranhuras paralelas, com agulha de injeção esterilizada, evitando-se sangramento, nas áreas tricotomizadas, superior e inferior, do lado direito do animal (áreas 2 e 4 da Figura 1).
- As áreas tricotomizadas, superior e inferior, do lado esquerdo do animal, devem permanecer intactas (áreas 1 e 3, da Figura 1).

1.2.6 PREPARO DA AMOSTRA

A amostra a aplicar deve ter uma área de 250 mm² e ser previamente umedecida, à saturação, com solução fisiológica estéril.

1.2.7 APLICAÇÃO DO PRODUTO

- Segurar o animal delicadamente, até que se acalme.
- Aplicar o produto, através de massagens leves, sobre as 2 (duas) áreas tricotomizadas superiores (áreas 1 e 2, da Figura 1), enquanto que as 2 (duas) áreas inferiores (áreas 3 e 4, da Figura 1) servirão como controle.

1.2.8 COLOCAÇÃO DO "PATCH" OCLUSIVO

- Após aplicação do produto, cobrir cada uma das 4 (quatro) áreas tricotomizadas com gaze estéril de 250 mm², a qual deve se fixada, aos pêlos do animal, com esparadrapo.

- Todas as áreas tricotomizadas devem ser conjuntamente cobertas com gaze estéril, a qual deve ser passada em torno do animal e fixada com fita adesiva hipo-alérgica.

1.2.9 LEITURA DAS REAÇÕES CUTÂNEAS

- As reações cutâneas devem ser analisadas 24 h e 72 h após a aplicação do produto.
- Retirar o "patch" oclusivo 24 h após a aplicação do produto, e efetuar a leitura.
- As áreas-controles têm, como finalidade única, facilitar a comparação com as áreas-testes.
- A avaliação de edema deve ser procedida mediante mensuração através de paquímetro, e o cálculo do valor do edema é feito através da fórmula:

$$\frac{\text{Lat}}{2} - \frac{\text{Lac}}{2} = \text{Edmm}$$

Onde:

Lat = Leitura da área-teste (íntegra e com ranhura)

Lac = Leitura da área-controle (íntegra e com ranhura)

Edmm = Valor do Edema em milímetros

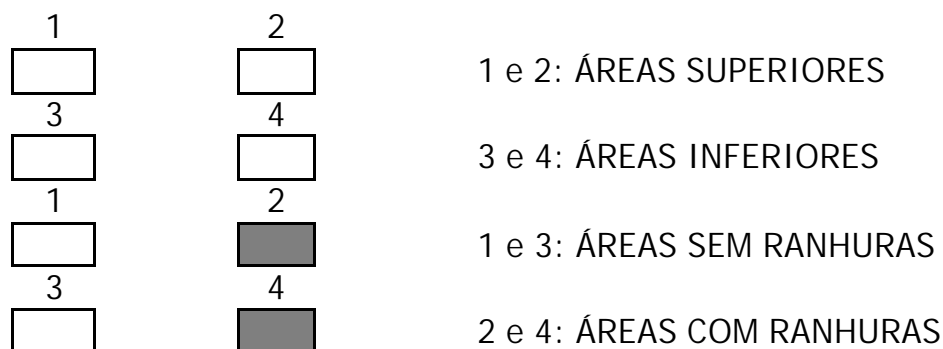
A graduação da intensidade das reações cutâneas é baseada no método de Draize (1,2). Ver tabela I.

Obs.: LEITURA DAS REAÇÕES CUTÂNEAS QUE ALTERA A COR DA PELE

- No caso de produtos corantes que alteram a cor da pele, dificultando a visualização e eritema, a avaliação é feita da seguinte forma:
 - 1) Na leitura de 24 h, é feita a biópsia das áreas-teste, em 3 (três) animais. O mesmo procedimento será realizado nos 3 (três) animais restantes, na leitura de 72 h.
 - 2) É efetuado o exame macro e microscópico das biópsias (Método de Coloração HE e Van Gienson).
 - 3) A graduação microscópica das reações cutâneas encontra-se descrita na Tabela II.

Figura 1

ILUSTRAÇÃO DAS ÁREAS TRICOTOMIZADAS



Denominação das áreas tricotomizadas para o teste

ÁREA 1	Pele íntegra (área-teste)
ÁREA 2	Pele com ranhura (área-teste)
ÁREA 3	Pele íntegra (área-controle)
ÁREA 4	Pele com ranhura (área-controle)

Tabela I

GRADUAÇÃO DAS REAÇÕES CUTÂNEAS

1. FORMAÇÃO DE ERITEMA

- Grau 0** - Pele normal:
Geralmente, de cor branca, podendo apresentar-se rósea.
- Grau 1** - Eritema leve:
A pele apresentar-se levemente avermelhada, em toda a área-teste.
- Grau 2** - Eritema moderado:
A pele apresenta-se vermelha, geralmente em toda a área-teste.
- Grau 3** - Eritema definido:
A pele apresenta-se com vermelhidão intensa e difusa, em toda a área-teste.
- Grau 4** - Eritema severo:

A pele apresenta-se vermelho-escuro, com leve formação de escaras (injúrias em profundidade).

2. FORMAÇÃO DE EDEMA

Grau 0 - Nenhum edema:

O valor do edema (Edmm) é igual a 0 (zero).

Grau 1 - Edema leve:

O valor do edema (Edmm) deve estar compreendido entre 0,25 mm e 0,49 mm.

Grau 2 - Edema moderado:

O valor do edema (Edmm) deve estar compreendido entre 0,5 mm e 0,74 mm.

Grau 3 - Edema definido:

O valor do edema (Edmm) deve estar compreendido entre 0,75 mm e 1 mm.

Grau 4 - Edema severo:

O valor do edema (Edmm) é maior do que 1 mm, podendo às vezes ser maior do que a área de exposição.

Tabela II

GRADUAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES CUTÂNEAS DETERMINADAS POR PRODUTOS QUE ALTERAM A COR DA PELE

1. CONGESTÃO

Grau 0 - Normal:

Os vasos do tecido cutâneo apresentam-se normais.

Grau 1 - Discreta:

Os vasos mostram-se ligeiramente túrgidos em decorrência do aumento do fluxo sanguíneo.

Grau 2 - Intensa:

Há excessivo fluxo de sangue nos vasos.

2. INFLAMAÇÃO

Grau 0 - Normal:

Não se percebe infiltrado inflamatório nos diversos planos do tecido cutâneo.

Grau 1 - Discreto:

O infiltrado inflamatório é caracterizado por um pequeno número de células inflamatórias dispersas (polimorfonucleares e/ou mononucleares), podendo estas serem observadas ou não nos diferentes planos do tecido cutâneo.

Grau 2 - Moderado:

Infiltrado inflamatório expressivo (polimorfonucleares e/ou mononucleares), o qual poderá ou não ser observado nos vários planos do tecido cutâneo.

Grau 3 - Intensa:

Neste caso, o número de células inflamatórias é de tal grandeza que, às vezes, prejudica a visualização da estrutura da pele.

3. EDEMA

Grau 0 - Ausência:

Não há presença de líquido nos espaços intersticiais.

Grau 1 - Presença:

Há acúmulo de líquido nos espaços intersticiais.

1.2.10 RESULTADOS

1.2.10.1 CÁLCULO DO ÍNDICE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA

- Cálculo do índice de irritação cutânea primária, para produtos que não alteram a cor da pele

- Obter a média aritmética das seguintes observações:

Edema na pele íntegra 24 h

Edema na pele com ranhura 24 h

Eritema na pele íntegra 24 h

Eritema na pele com ranhura 24 h

Edema na pele íntegra 72 h

Edema na pele com ranhura 72 h

Eritema na pele íntegra 72 h

Eritema na pele com ranhura 72 h

- Obter o somatório dessas 8 (oito) médias aritméticas e dividi-lo por 4 (quatro). O valor encontrado é o ÍNDICE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA do produto.
- Cálculo do índice de irritação cutânea primária, para produtos que alteram a cor da pele
- Obter a média aritmética das seguintes observações:
 - Congestão na pele íntegra e pele com ranhura dos 3 (três) animais 24 h
 - Inflamação na pele íntegra e pele com ranhura dos 3 (três) animais 24 h
 - Edema na pele íntegra e pele com ranhura dos 3 (três) animais 24 h
 - Congestão na pele íntegra e pele com ranhura dos 3 (três) animais 72 h
 - Inflamação na pele íntegra e pele com ranhura dos 3 (três) animais 72 h
 - Edema na pele íntegra e pele com ranhura dos 3 (três) animais 72 h
- Obter o somatório dessas 6 (seis) médias aritméticas e dividi-lo por 3 (três). O valor encontrado é o ÍNDICE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA do produto.

1.2.10.2 CLASSIFICAÇÃO DE IRRITANTE CUTÂNEO PRIMÁRIO

- Classificação de irritante cutâneo primário, para produtos que não alteram a cor da pele.
- De acordo com o índice de irritação cutânea primária obtido, o produto pode ser classificado em:

Valor do índice		Classificação
0	- 0,9	Não irritante
1	- 1,9	Ligeralmente irritante
2	- 4,9	Moderadamente irritante
5	- 8	Severamente irritante

- Classificação de irritante primário cutâneo, para produtos que alteram a cor da pele
- De acordo com o índice de irritação cutânea primária obtido, o produto pode ser classificado em:

Valor do índice	Classificação
-----------------	---------------

0	-	0,59	Não irritante
0,6	-	0,9	Ligeralmente irritante
1,0	-	1,3	Moderadamente irritante
1,3	-	2	Severamente irritante

Observação: No caso de ensaio realizado com animais que foram utilizados anteriormente em ensaios de irritação cutânea, não será válido o resultado positivo (produto irritante), devendo o ensaio ser repetido.

- Critério de animal positivo:
 - O animal será considerado positivo quando apresentar um ou mais das reações positivas, citadas a seguir, em qualquer período do ensaio.
 - As reações cutâneas são classificadas como positivas ou negativas, de acordo com o esquema abaixo:

	Reação Negativa		Reação Positiva	
Eritema	0	-	1	2 - 4
Edema	0			1 - 4

1.2.10.3 CRITÉRIO DE PRODUTO SATISFATÓRIO

- Produtos que não alteram a cor da pele:
O produto ensaiado é considerado como satisfatório se seu índice de irritação cutânea estiver compreendido entre 0 (zero) e 0,9.
- Produtos que alteram a cor da pele:
O produto ensaiado é considerado como satisfatório se seu índice de irritação cutâneo estiver compreendido entre 0 (zero) e 0,59.

1.2.10.4 DURAÇÃO DO ENSAIO

5 DIAS

1.2.10.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Draize, J.H. Dermal Toxicity. Appraisal of the Safe Chemicals In Foods, Drugs and Cosmetics, pp. 46-59, The Association of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas, 1965.
- 2) Draize, J.H. Woodard, G., Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin, and mucous membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 83, 377-390, 1944.

2. IRRITAÇÃO CUTÂNEA CUMULATIVA

2.1 OBJETIVO

O presente método visa à avaliação do potencial de irritação cutânea, após a administração repetida de substâncias a ser ensaiadas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 EQUIPAMENTOS

Seguir como descrito no item 1.2.1 para o ensaio de "Irritação Cutânea Primária".

2.2.2 SOLUÇÕES

Seguir como descrito no item 1.2.2 para o ensaio de "Irritação Cutânea Primária".

2.2.3 ANIMAIS

Seguir como descrito no item 1.2.3 para o ensaio de "Irritação Cutânea Primária".

2.2.4 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Seguir como descrito no item 1.2.4 para o ensaio de "Irritação Cutânea Primária".

2.2.5 PREPARO DOS ANIMAIS

Seguir como descrito no item 1.2.5 para o ensaio de "Irritação Cutânea Primária".

2.2.6 PREPARO DA AMOSTRA

Seguir como descrito no item 1.2.6 para o ensaio de "Irritação Cutânea Primária".

2.2.7 APLICAÇÃO DO PRODUTO

Aplicar o produto sobre as duas áreas tricotomizada superiores (área 1 e 2 – Figura 1), enquanto que as duas áreas inferiores (áreas 3 e 4 – Figura 1) servirão como controle.

- A aplicação do produto deverá ser feita durante 10 (dez) dias consecutivos. Durante esse período, raspagem e escarificação das áreas tricotomizadas devem ser alteradas.

2.2.8 COLORAÇÃO DO "PATCH" OCLUSIVO

Seguir conforme descrito no item 1.2.8, para "Irritação Cutânea Primária", para cada dia de aplicação.

2.2.9 LEITURA E GRADUAÇÃO DAS REAÇÕES CUTÂNEAS

As leituras deverão ser feitas 24 h e 72 h após a última aplicação, seguindo as Tabelas de Graduação das Lesões, descritas nos itens 1.2.9 e 1.2.10, para "Irritação Cutânea Primária".

2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Draize, J.H. (1965). Dermal Toxicity. Food Drug Cosmetic Law journal 10 : 722, 1955.
- 2) Somers, G.F. Testing drugs for Dermal Toxicity. J. Soc. Cosmetic Chemists 5 : 385-404, 1964.
- 3) Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ. Protocolo de irritação cutânea primária. Rio de Janeiro.

3. ENSAIO DE SENSIBILIZAÇÃO

3.1 ESTUDO PRELIMINAR

Não é necessário realizar o Ensaio de Sensibilização, no caso de haver resultado positivo no Ensaio de Irritação Cutânea Primária do produto.

3.2 REAGENTES E MATERIAIS

- Amostra de 600 mm² das matérias-primas utilizadas e do produto acabado, embebido em solução fisiológica
- Solução fisiológica estéril
- Veículo oleoso: adjuvante completo de Freund (FCA)
- Agulhas hipodérmicas
- Gase estéril
- Plástico adesivo impermeável
- Cinta adesiva hipoalergênica

3.3 ANIMAIS

20 cobaias albinos (10 fêmeas e 10 machos), com peso de 30g e 400 g, no início do ensaio.

3.4 EXECUÇÃO DO ENSAIO

3.4.1 FASE DE INDUÇÃO

3.4.1.1 Preparar a solução e injetar no grupo-ensaio e no grupo-controle:

- 0,1 ml de adjuvante completo de Freund (FCA)
- 0,1 ml de solução fisiológica estéril

3.4.1.2 Tritocomizar um área de 900 mm², na região dorsal dos cobaios do grupo-ensaio e do grupo-controle.

3.4.1.3 Aplicar, topicamente, a matéria-prima embebida em solução fisiológica estéril, usando "patch" oclusivo, e duas injeções intradérmicas de adjuvante completo de Freund, para o grupo-ensaio (10 animais). Realizar, para o grupo-controle, o mesmo procedimento anterior, porém, em lugar de aplicar a matéria-prima embebida em solução fisiológica estéril, aplicar, em 10 animais, gase embebida em solução fisiológica estéril.

Na segunda-feira de cada semana, tricotomizar a região a tratar. Nos dias 1º e 10º, os animais recebem uma injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund, diluído a 50%, em solução fisiológica estéril. Os dois locais de injeção devem estar o mais perto possível do centro da área tricotomizada. A substância de ensaio é aplicada 3 vezes por semana, com 2 dias de intervalo, durante 3 (três) semanas, e uma vez no começo da 4ª (quarta) semana. A amostra deve ser aplicada sobre o local da injeção.

Retirar o "patch" a cada 48 h.

O último (patch" (10º) é retirado no 24º dia, depois de 48 h de contato com a pele.

3.4.1.4 SUSPENSÃO DO TRATAMENTO

Suspender o tratamento, a partir do 24º dia e até o 35º dia, inclusive. Esse é o tempo necessário para que o organismo produza a resposta imunológica.

3.4.2 FASE DESAFIO

Tricotomizar, no 36º dia, a região abdominal (flanco esquerdo). Colocar um "patch" oclusivo, do material a ensaiar, por 48 h e remover no 38º dia.

3.5 AVALIAÇÃO

Realizar as leituras no local de desafio, em 1 h, 6 h, 24 h e 48 h depois de removido o "patch" oclusivo. Proceder à avaliação de acordo com a escala descrita no ensaio de irritação cutânea-primária (Tabela I e II).

Realizar exame histológico da pele, quando houver lesão macroscópica ou quando a reação for duvidosa.

3.6 RESULTADOS

O resultado é positivo quando um ou mais animais apresentarem reação macroscópica, confirmada histologicamente como reação de sensibilização.

O resultado é negativo quando nenhum animal apresentar evidência de reação macroscópica ou quando seu exame histológico não confirmar a leitura macroscópica.

O resultado é duvidoso quando há evidência de reação macroscópica, não confirmada histologicamente.

3.7 ACEITABILIDADE

Somente deve ser liberado, para uso, material de ensaio que apresente resultado negativo no ensaio de sensibilização dérmica.

3.8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1) *Animais and alternatives in toxicity testing (modification of the method of Magnusen e Kligman)*. ACADEMIC PRESS, INC. London, 1987.

4. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (“in vitro”)

4.1 APARELHAGEM E REAGENTES

- Estufa a 37°C
- Câmara úmida, contendo CO₂ a 5%
- Microscópio de fase invertida
- Células ATCC, CCL 1, NCTC, Clone 929 de fibroblastos de camundongos ou outra linhagem sensível ao ensaio.
- Ágar
- Corante vital: vermelho neutro
- Meio de cultura: Eagle (MEM), pH 7,3
- Frasco de cultura de plástico neutro, de 250 mm²
- Placas de Petri
- Pipetas
- Solução tampão de fosfato (pH neutro) (PBS)
- Pinça estéril

4.2 AMOSTRA

100 mm² ou 100 mg de peso

4.3 EXECUÇÃO DO ENSAIO

4.3.1 Montar a cultura de células em câmara úmida com CO₂ a 5%, inoculando 5 ml de uma suspensão celular, com concentração de 130×10^3 /ml, em meio Eagle e incubar a 37°C por 48 h.

4.3.2 Descartar o meio, com pipeta estéril e, em seguida, lavar com solução tampão de fosfato (PBS).

- 4.3.3 Adicionar 4 ml de ágar pré-aquecido, em placas de Petri com corante vital.
- 4.3.4 Colocar a amostra, com pinça estéril, na parte central da placa e incubar novamente a 37°C.
- 4.3.5 Retirar a amostra, após 24 H, anotar e marcar a área de inibição.
- 4.3.6 Observar ao microscópio de fase invertida.

4.4 RESULTADOS

Observar o índice de Zona (IZ), ou seja, área não corada, e o índice de Lise (IL) que indica a porcentagem de células degeneradas. Ambos os índices fornecem índices Resposta (IR), conforme relação constante do Quadro I.

$$IR = IZ/IL$$

Quadro I
ÍNDICE DE ZONA/LISE

ÍNDICE DE ZONA (IZ)	ÍNDICE DE LISE (IL)
0. Nenhuma zona sob e ao redor da amostra	0. Nenhum lise
1. Zona limitada sob a amostra	1. Menos que 20%
2. Zona não maior que 2 mm	2. Menos que 40%
3. Zona não maior que 2 mm e menor que 10 mm	3. Menos que 60%
4. Zona maior entre 10 – 20 mm	4. Menos que 80%
5. Zona maior que 20 mm	5. Mais que 80%

4.5 ACEITABILIDADE

Somente deve ser liberado, para uso, material de ensaio (matéria-prima ou produto acabado) cujos resultados sejam idênticos aos do controle negativo.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Guess W.I, Rosenblush S.A., Schimidt B & Autian, J. Agar Diffusion Method for toxicity Screening of Plastics on Cultured Cell Monolayer, Pharmaceutical Journal Science, 1965.

- 2) Revista do Instituto Adolfo Lutz, volume 47, fascículo ½, 1987.

5. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

5.1 INTRODUÇÃO

As técnicas microbiológicas aqui apresentadas avaliam o número de microrganismos aeróbicos viáveis presentes e a presença ou não de determinadas espécies microbianas.

5.2 CAPACIDADE DE GERMINAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Incubar os seguintes microrganismos, em tubos contendo caldo de caseína-soja: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P ou ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739, por 18 h a 24 h, a 30°C-35°C e *Candida albicans* ATCC 10231 ou 2091, por 48 h, a 20°C-25°C.

Diluir cada cultura em tampão fosfato pH 7,2, de modo a obter 100 células/ml e empregar o inóculo dos microrganismos separadamente, como controle dos meios de cultura utilizados.

5.3 MATERIAL E APARELHAGEM

- pipetas graduadas de 1 ml, 2 ml, 10 ml e 20 ml, estéreis
- erlenmeyers, balões de vidro e bechers, estéreis
- placas de Petri de 20 mm x 100 mm, estéreis
- bastões de vidro, estéreis
- tubos de ensaio, estéreis
- panos de gaze, estéreis
- pinças, tesouras, bisturis, lâminas e espátulas, estéreis
- balança analítica, com sensibilidade para 0,01 g
- estufas reguladas a 20°C-25°C e a 30°C-35°C
- jarras para anaerobiose, envelopes geradores de atmosfera anaeróbica, e indicadores
- sistema de vela para microerofilia ou envelopes geradores de atmosfera microerófila

5.4 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

- Caldo Sabouraud-dexirose
- Caldo de caseína-soja
- Caldo lactosado
- Caldo tioglicolato 135 C ou Meio "Cooked Meat", fervido por 10 min antes de sua utilização e esfriado imediatamente ou caldo de infusão de cérebro e coração pré-reduzido (BHI)
- Ágar batata-dextrose ou Ágar Sabouraud-dextrose
- Ágar sultito-polimixina-sulfadiazina (Ágar de Angelotti)
- Ágar MacConkey

- Ágar manitol-sal ou Ágar Vogel-Johnson ou Ágar Baird-Parker
- Ágar cetrimida
- Ágar de caseína-soja
- Meio de cultura para provas de identificação microbiana
- Tampão fosfato de sódio, pH 7,2

5.5 REAGENTES

- tween 80 (Polisorbato 80)
- álcool etílico a 70°
- plasma liofilizado de coelho com EDTA, para prova de coagulase
- soluções para coloração pelo método de Gram
- soluções necessárias, segundo os meios de cultura utilizados nas provas bioquímicas
- solução de cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamino a 0,5%, para teste da oxidase
- parafina estéril

5.6 MANIPULAÇÃO DA AMOSTRA

A manipulação das amostras, para análise microbiológica, deverá seguir as seguintes recomendações:

- 1) analisar as amostras o mais cedo possível, após a chegada ao laboratório; se for necessário estocá-las, é recomendada a temperatura ambiente;
- 2) inspecionar as amostras cuidadosamente, antes de abri-las, verificando irregularidades em suas embalagens;
- 3) desinfetar a embalagem individual da amostra, com gaze estéril embebida em um desinfetante que não ataque o material de embalagem;
- 4) para a análise microbiológica, é preciso utilizar uma porção representativa da amostra, não inferior a 10 g;
- 5) se houver necessidade de análises múltiplas, isto é, microbiana, toxicológica e química, a subamostra para o exame microbiológico deverá ser retirada em primeiro lugar.

5.7 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

No preparo da amostra a ser ensaiada, não deverá ocorrer alteração do número e tipo de microrganismos originalmente presentes.

A amostra deverá ser removida assepticamente, pesando-se 10 g num becher estéril, para cada um dos ensaios descritos a seguir.

Pode-se utilizar um pequeno volume de um agente emulsificante estéril, como o polisorbato 80, no preparo da suspensão.

5.8 CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS

Utilizar o método de contagem em placa. Suspender 10 g da amostra em tampão fosfato pH 7,2 ou caldo de caseína-soja de modo a obter um volume final de 100 ml.

5.8.1 MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA

Diluir a suspensão, de modo a obter uma contagem entre 30 colônias e 300 colônias. Pipetar 1 ml de cada diluição em placas de Petri, em duplicata. Acrescentar 15 ml a 20 ml de ágar de caseína-soja, previamente fundidos e esfriados à aproximadamente 45°C. Misturar a amostra com o meio de cultura, com movimentos rotatórios. Deixar solidificar à temperatura ambiente e incubar a 30°C-35°C, por 48 h a 72 h. Se não forem observadas colônias microbianas a partir das placas representativas da diluição de 1:10, expressar os resultados como "menor que 10 ufc/g de amostra".

5.9 TESTE para "Staphylococcus aureus" e "Pseudomonas aeruginosa"

Acrescentar, à amostra, caldo de caseína-soja, para completar o volume de 100 ml. Incubar por 24 h a 48 h, a 30°C-35°C. Se houver evidência de crescimento, com o auxílio de uma alça bacteriológica, semear a superfície de uma placa com ágar Vogel-Johnson e de uma placa com ágar cetrimida. Incubar as placas a 30°C-35°C, por 24 h a 48 h. Se, ao final do período de incubação, não forem observadas colônias típicas de "Staphylococcus aureus" e "Pseudomonas aeruginosas" a amostra deve ser considerada isenta de contaminação por esses microrganismos.

Quadro II

Características de "Staphylococcus aureus", em meios seletivos

Meio Seletivo Características	Ágar Vogel-Johnson	Ágar Manitol-Sal	Ágar Baird-Parker
Colônia	Negra, circundada por halo amarelo	Amarela, com halo amarelado	Negra, brilhante, circundada por halos claros de 2 mm a 5 mm
Coloração pelo Gram	Cocos Gram-positivos	Cocos Gram-positivos	Cocos Gram-positivos

5.9.1 TESTE DA COAGULASE para "Staphylococcus aureus"

Inocular pequena quantidade, do crescimento em ágar, em 0,2 ml de caldo BHI. Incubar por 18 h a 24 h, a 35°C. Acrescentar 0,5 ml de coagulase

plasmática de coelho reconstituída (com EDTA) e homogeneizar. Incubar a 35°C e observar. As cepas que produzem coagulase, fracamente, podem requerer mais 24 h de incubação, para que a formação do coágulo se torne evidente. Controles positivos e negativos deverão ser utilizados. Se não for observado nenhum grau de coagulação, a amostra satisfaz as exigências do teste para ausência de "Staphylococcus aureus".

Quadro III
Características de "Pseudomonas aeruginosa" em meios seletivos

Meio Seletivo Características	Ágar Cetrimida	Ágar para Detecção de Fluoresceína	Ágar para Detecção de Píocianina
Coloração da colônia	Geralmente esverdeada	Geralmente incolor a amarelada	Geralmente esverdeada
Fluoresceína à luz ultravioleta	Esverdeada	Amarelada	Azul
Teste de oxidase	Positivo	Positivo	Positivo
Coloração pelo Gram	Bastonetes Gram- negativos	Bastonetes Gram- negativos	Bastonetes Gram- negativos

5.9.2 TESTE DA OXIDASE DE PIGMENTOS para "Pseudomonas aeruginosas"

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, inocular colônias suspeitas, a partir de ágar cetrimida, na superfície de placas com os meios ágar para detecção de fluoresceína, e ágar para Pseudomonas, para detecção de píocianina. Incubar a 35°C, por um período de tempo não inferior a 3 (três) dias. Examinar as estrias de crescimento à luz ultravioleta, observando as características descritas no Quadro III. Submeter o crescimento suspeito ao teste da oxidase. Se o teste for negativo, a amostra satisfaz as exigências para ausência de "Pseudomonas aeruginosa".

Se necessário, e para as cepas de "Pseudomonas aeruginosa" apíocianogênicas, outros testes serão necessários para a sua caracterização.

5.10 TESTES para "Escherichia coli"

Acrescentar, à amostra, caldo lactosado, de modo a obter um volume final de 100 ml. Incubar por 24 h a 48 h, a 30°C-35°C. Se houver evidência de crescimento, com o auxílio de uma alça bacteriológica, inocular uma placa de

ágar MacConkey. Incubar por 24 h a 48 H, a 30°C-35°C. Se houver colônias sugestivas da presença de "Escherichia coli", semear uma placa com ágar levine – Eosina-Azul de Metileno. Se não houver colônias com o brilho metálico característico e um aspecto negro-azulado, a amostra satisfaz as exigências para ausência de "Escherichia coli".

A presença de "Escherichia Coli" poderá ser confirmada por testes bioquímicos adicionais.

Quadro IV
Características de "Escherichia Coli", em Ágar MacConkey

Colônia	Vermelho-tijolo: pode apresentar halo circunjacente de bile precipitada
Coloração pelo Gram	Bastonetes Gram-negativos (coco-bacilos)

5.11 PESQUISA de clostrídios

5.11.1 Clostrídios sp

Transferir 1 ml da preparação da amostra para 90 ml de caldo tioglicolato 135 C ou caldo BHI com extrato de levedura pré-reduzido, em caldo "cooked meat". Incubar por 48 h a 30°C-35°C, em ambiente de anaerobiose, exceto o caldo BHI pré-reduzido.

Semear com alça bacteriológica, a partir dos caldos que se mostrarem turvos, placas de ágar para anaeróbios e incubar por 48 h, a 35°C, em ambiente de anaerobiose. Isolar as colônias diferentes para tubos contendo BHI pré-reduzido ou caldo tioglicolato 135 C, ou caldo "cooked meat". Incubar, conforme recomendado acima. Todos os caldos que apresentarem crescimento, deverão ser submetidos aos seguintes testes:

- 1) coloração de Gram (evidência de pureza de cultivo e morfologia compatível com o gênero "Clostrídium");
- 2) tipo de respiração;
- 3) termo-resistência

O tipo de respiração será determinado semeando-se o crescimento de cada tudo BHI em 3 placas, contendo ágar para anaeróbios. Incubar uma placa em anaerobiose, por 48 h, a 35°C, uma placa em microaerofilia por 48 h, a 35°C, e uma placa em aerobiose, por 24 h, a 35°C.

A termo-resistência será estabelecida semeando-se 0,1 ml dos crescimentos em BHI, em tubos contendo caldo BHI pré-reduzido ou tioglicolato 135 C, ou caldo "cooked meat" e submetendo-se à temperatura de 80°C, durante 15 min. Em seguida, incubá-los, conforme recomendação descrita anteriormente. Paralelamente, incubar um controle positivo não submetido à prova de resistência.

Findo o período de incubação, observar o crescimento de cada placa nos diferentes sistemas e caracterizar a presença, ou não, de microrganismos anaeróbios, no produto. Se positivo, proceder à coloração pelo Gram e ao teste da catalase. Da mesma forma, observar os tubos de BHI, submetidos à termo-resistência.

Se houver evidência de crescimento, pesquisar a presença de esporos, pelo método de coloração de Gram.

5.11.2 Clostrídios sulfitorredutores

Suspender 10 g da amostra em tampão fosfato (pH 7,2) ou caldo caseína-soja, de modo a obter um volume final de 100 ml. Inocular 50 ml da diluição em 50 ml de caldo tioglicolato de duplas concentração, com 0,02% de azida sódica, previamente aquecido por 10 min em banho-maria a 100°C e resfriar. Cobrir com parafina estéril e incubar durante 48 h a 35°C.

Colocar alíquotas de 0,1ml desses cultivos em tubos estéreis, cobrir com ágar SPS fundido e resfriado a 40°C. Cobrir com parafina estéril e incubar durante 72 h, a 37°C.

O desenvolvimento de colônias de cor preta indica a presença de Clostrídios sulfitorredutores.

5.12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Microbiological Tests, Microbial Limit Tests, USP XXI.
- 2) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ) – Manual de Análises Microbiológicas de Cosméticos, Jan/Fev 89.
- 3) Farmacopéia Brasileira, 4ª edição.