Lílian Ferreira Barbosa Amaral

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO MONOÉSTER DE C-8 XILITOL COMO ALTERNATIVA CONSERVANTE PARA PRODUTOS COSMÉTICOS

ORIENTADORA: Profª. Drª. PRISCILA GAVA MAZZOLA
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. CARLOS EMÍLIO LEVY

Campinas
2010

Lílian Ferreira Barbosa Amaral

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO MONOÉSTER DE C-8 XILITOL COMO ALTERNATIVA CONSERVANTE PARA PRODUTOS COSMÉTICOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Area de concentração: Ciências Biomédicas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. PRISCILA GAVA MAZZOLA

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. CARLOS EMÍLIO LEVY

UNICAMP

Campinas

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

Am13a

Amaral, Lilian Ferreira Barbosa
Avaliação da eficácia antimicrobiana do monoéster de C-8 xilitol como alternativa conservante para produtos cosméticos / Lilian Ferreira Barbosa Amaral. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Priscila Gava Mazzola; Carlos Emílio Levy
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Contaminação. 2. Cosméticos. 3. Xilitol. I. Mazzola, Priscila Gava. II. Levy, Carlos Emílio III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetic products

Keywords:
- Contamination
- Cosmetics
- Xylitol

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profª. Drª. Priscila Gava Mazzola
Profª. Drª. Célia Regina Garlipp
Profª. Drª. Ângela Faustino Jozala

Data da defesa: 17-11-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Lilian Ferreira Barbosa Amaral

Orientador(a): Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola

Membros:

1. Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola -
2. Profa. Dra. Célia Regina Garlipp -
3. Profa. Dra. Angela Faustino Jozala -

Curso de pós-graduação em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/11/2010

DEDICATÓRIA

A Deus que é meu amparo e o meu refúgio.

Aos meus pais, Zélia e Santiago, pelo amor incondicional.

Ao amor da minha vida, Helberth, pelo amor e carinho com que sempre me apoiou nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Rany e Polly que são um presente de Deus.

Aos meus sogros Toninho e Luzia pela amizade e oração.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, que cumula a minha vida de bênçãos, por orientar cada um dos meus passos.

Aos meus pais que me formaram na fé e especialmente à minha mãe que é um exemplo de superação.

Ao meu marido por compreender as minhas ausências e por acreditar em mim.

À Profa. Dra. *Priscila Gava Mazzola*, orientadora deste trabalho, pela determinação, confiança, incentivo e dedicação.

À *Carmen Velazquez*, *Marcelo Golino* e *Márcio Polezel*, diretores da Chemyunion Química LTDA, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Às amigas *Jéssica Sanches* e *Samara Eberlin* pela motivação e companheirismo antes e durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao *Gustavo de Campos Dieamant* pela contribuição técnica e apoio a este trabalho.

À *Isis Ximenes*, pela colaboração no desenvolvimento e validação das técnicas microbiológicas e por me acolher em seu laboratório.

Ao professor *Carlos Emílio Levy* pela confiança, sem a qual nada teria começado.

À *Aline Dutra*, *Ana Paula Vilar* e *Sílvia Bueno* pela ótima convivência no ambiente de trabalho.

À Faculdade de Ciências Médicas (FCM).

Aos colaboradores do programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas.

Ao departamento de Patologia Clínica pela oportunidade.

A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a realização deste trabalho.

” Só quem já perdeu na vida sabe o que é ganhar,
porque encontrou na derrota o motivo para lutar.
E assim viu no outono a primavera,
descobriu que é no conflito que a vida faz crescer."

Pe. Fábio de Melo

SUMÁRIO

RESUMO xvi

ABSTRACT xix

1. INTRODUÇÃO 21

1.1 Contaminações microbiológicas 23

1.2 Conservantes 28

1.3 Xilitol 40

1.4 Concentração Inibitória Mínima 45

1.5 Teste de Desafio (Challenge Test) 49

2. OBJETIVOS 53

3. MATERIAL E MÉTODOS 55

3.1 Microrganismos utilizados 55

3.2 Meios de cultura 55

3.3 Loção hidratante 55

3.4 Preparo dos meios de cultura 56

3.5 Obtenção e conservação dos microrganismos 57

3.6 Padronização dos inóculos 57

3.7 Determinação da concentração inibitória mínima 58

3.8 Preparo da formulação 60

3.9 Avaliação microbiológica da loção hidratante 60

3.10 Neutralização/Inativação do sistema conservante 61

3.11 Teste de desafio do sistema conservante (Challenge Test) 62
3.12 Critérios de aceitação 64
3.13 Avaliação da estabilidade da loção hidratante 65
3.14 Avaliação estatística 65
4. RESULTADOS 68
4.1 Determinação da concentração inibitória mínima 68
4.2 Avaliação microbiológica da loção hidratante 69
4.3 Neutralização do sistema conservante 70
4.4 Teste de desafio do sistema conservante 71
4.5 Avaliação da estabilidade da loção hidratante 78
5. DISCUSSÃO 84
6. CONCLUSÃO 94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96

Figura 1. Faturamento liquido das Indústrias de Produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (Fonte: ABIHPEC) 22

Figura 2. Estruturas químicas de conservantes do grupo dos parabenos..... 33

Figura 3: Isopropilenação do xilitol 44

Figura 4: Reações de esterificação do diacetonídeo..... 44

Figura 5. Estrutura química do monoéster de C-8 Xilitol 45

Figura 6. Determinação da concentração inibitória mínima..... 59

Figura 7. Esquema do teste de desafio do sistema conservante. 63

Figura 8. Avaliação de pH da loção hidratante testada durante o estudo de estabilidade. 79

Tabela 1. Conservantes utilizados em preparações cosméticas 31

Tabela 2. Características e propriedades físico-químicas do xilitol 41

Tabela 3. Composição da loção hidratante 56

Tabela 4. Concentração inibitória mínima do monoéster de C-8 xilitol 68

Tabela 5. Avaliação da sensibilidade antimicrobiana 69

Tabela 6. Recuperação microbiana após neutralização do sistema conservante . 70

Tabela 7. Número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol 72

Tabela 8. Número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol 72

Tabela 9. Número de UFC/g de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol 73

Tabela 10. Número de UFC/g de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol 73

Tabela 11. Número de UFC/g de *Escherichia coli* (ATCC 25922) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol 74

Tabela 12. Número de UFC/g de *Escherichia coli* (ATCC 25922) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol 74

Tabela 13. Número de UFC/g de *Candida albicans* (ATCC 10231) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol 76

Tabela 14. Número de UFC/g de *Candida albicans* (ATCC 10231) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol 76

Tabela 15. Número de UFC/g de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol 77

Tabela 16. Número de UFC/g de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol 77

Tabela 17. Número de UFC/g de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 Xilitol (pH=7,0) 78

Tabela 18. Estudo de estabilidade da loção hidratante com 1% de Monoéster de C-8 Xilitol 81

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CTFA - The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association

DMDM - Dimetiloldimetil

EUA - Estados Unidos da América

GNPD - Global New Products Database

HPMC - Hidroxipropilmeillcelulose

IARC - International Agency for Research on Cancer

IPBC - 3-iodo-2-propinil-butilcarbamato

LOG - Logarítmo

MCI - Metilcloroisotiazolinona

MDBGN - Metildibromo Glutaronitrilo

MI - Metilisotiazolinona

MIC - Minimum Inibitory Concentration

NaCl - Cloreto de Sódio

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

NF - National Formulary

PCPC - Personal Products Council

PCT - Patent Cooperation Treaty

pH - Potencial Hidrogeniônico

PTS - Phosphotransferase system

P/P - Peso por peso

PPM - Parte por Milhão

Q.S.P - Quantidade suficiente para

TSA - Trypticase Soy Agar

TSB - Trypticase Soy Broth

UFC - Unidade Formadora de Colônias

USP - United States Pharmacopoeia

RESUMO

A contaminação microbiológica apresenta um risco potencial à qualidade do produto, mas, sobretudo pode afetar a saúde do consumidor. Conservantes são substâncias adicionadas a produtos cosméticos, farmacêuticos, de limpeza e alimentícios com o objetivo de inibir o desenvolvimento de microrganismos, durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto. Embora alguns conservantes já estejam consagrados na literatura, os mesmos têm sido relacionados ao desencadeamento de reações alérgicas, motivando a procura do conservante ideal. O Xilitol é um açúcar natural proveniente de plantas, frutas e vegetais, que possui propriedades antimicrobianas descritas na literatura. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia antimicrobiana do monoéster de C-8 Xilitol (patente PCT/IB 2008/054321), visando sua utilização como conservante em bases cosméticas, através de testes de desafio conservante (*challenge test*) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos na determinação da concentração mínima inibitória estão entre 1,0 e 1,25 % para *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* e *Candida albicans* e entre 1,0 e 1,5% para *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger*, indicando a faixa de concentração do monoéster de C-8 Xilitol que inibiu totalmente o crescimento do microrganismo, no teste de diluições. A loção hidratante utilizada no teste de desafio foi conservada com a concentração de 1% do monoéster de C-8 Xilitol, verificando-se um rápido declínio na contagem de UFC/g nos primeiros tempos de avaliação após a contaminação do produto, para todas as bactérias testadas. Após o período de avaliação, incluindo a reinoculação do produto, o monoéster de C-8 Xilitol mostrou-se eficaz frente às bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*, atendendo à especificação de redução de 99,9% do número de células viáveis estabelecida em compêndios oficiais. O mesmo ocorre em relação à *C. albicans* que apresenta uma redução de 90% do número de células viáveis e também em relação ao *A. niger*, quando o pH da loção testada é ajustado de 5,5 para 7,0. Nas condições em que os testes foram conduzidos, podemos concluir que o monoéster de C-8 Xilitol, apresenta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados e atende aos requisitos de uma substância dotada de atividade conservante, podendo ser considerado uma alternativa conservante para produtos cosméticos.

ABSTRACT

Microbiological contamination presents a potential risk to product quality, but specially can affect the health of consumers. Preservatives are substances added to cosmetic, pharmaceuticals, cleaning agents and food in order to inhibit growth of microorganisms during product manufacturing and storage and to protect consumers from inadvertent contamination during the use of the product. Although some preservatives are already well established in the literature, they have been linked to the allergic reactions, motivating the search for the ideal preservative. Xylitol is a natural sugar derived from plants, fruits and vegetables, which antimicrobial properties are described in the literature. This study aimed to evaluate the antimicrobial effectiveness of C-8 Xylitol monoester (patent pending PCT/IB 2008/054321), for its use as a preservative in cosmetic formulations. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth macrodilution method and the antimicrobial effectiveness of C-8 Xylitol monoester was determined by using challenge test method. The results obtained in the determination of minimum inhibitory concentration are between 1.0 and 1.25% for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* and between 1.0 and 1.5% for *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus niger*. The amount of 1% of C-8 Xylitol monoester was added to the lotion used in the challenge test, observing a rapid decline in the number of CFU/g in stages of evaluation after contamination of the product by all bacteria. After the evaluation period, including reinoculation product, the C-8 xylitol monoester was effective against *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus*, according to the specification of 99.9% reduction in the number of viable cells established in the official compendia. The same occurs in relation to *C. albicans*, which shows a 90% reduction in the number of CFU/g. Regarding *A. niger*, similar reduction is observed when pH value of the lotion is adjusted from 5.5 to 7.0. Under the tests conditions used, we concluded that C-8 Xylitol monoester has antimicrobial activity and could be considered as an alternative preservative for cosmetic formulations.

INTRODUÇÃO

A palavra cosmético vem do grego *kosmetikós*, que quer dizer "o que serve para ornamentar". Estima-se que o seu uso de tenha se iniciado há pelo menos 30.000 anos. Os povos primitivos tinham o hábito de pintar o corpo para fins ornamentais e religiosos. Os primeiros registros da utilização de cosméticos datam no Egito antigo. Os egípcios pintavam os olhos para evitar a contemplação direta do deus Sol, recorrendo à gordura animal e vegetal, cera de abelhas, mel e leite no preparo de cremes para a pele. Na Idade Média, o açafrão servia para colorir os lábios; o negro da fuligem, para escurecer os cílios; a sálvia, para clarear os dentes; a clara de ovo e o vinagre, para aveludar a pele (1).

No século XVI, a preocupação com a higiene pessoal diminuiu e somente no século XX, com os avanços da indústria química fina, os cosméticos se tornaram produtos de uso geral. No final da década de 80, tem-se o lançamento das fórmulas evoluídas para cosméticos (1).

De acordo com a Resolução 79 (2), produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são definidos como preparações constituídas por substâncias naturais e sintéticas ou suas misturas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (2).

A Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos apresentou um crescimento médio deflacionado composto de 10,5% nos últimos

14 anos, tendo passado de um faturamento líquido, de R$ 4,9 bilhões em 1996 para R$ 24,9 bilhões em 2009, pricipalmente, devido aos lançamentos constantes de novos produtos atendendo cada vez mais às necessidades do mercado (3).

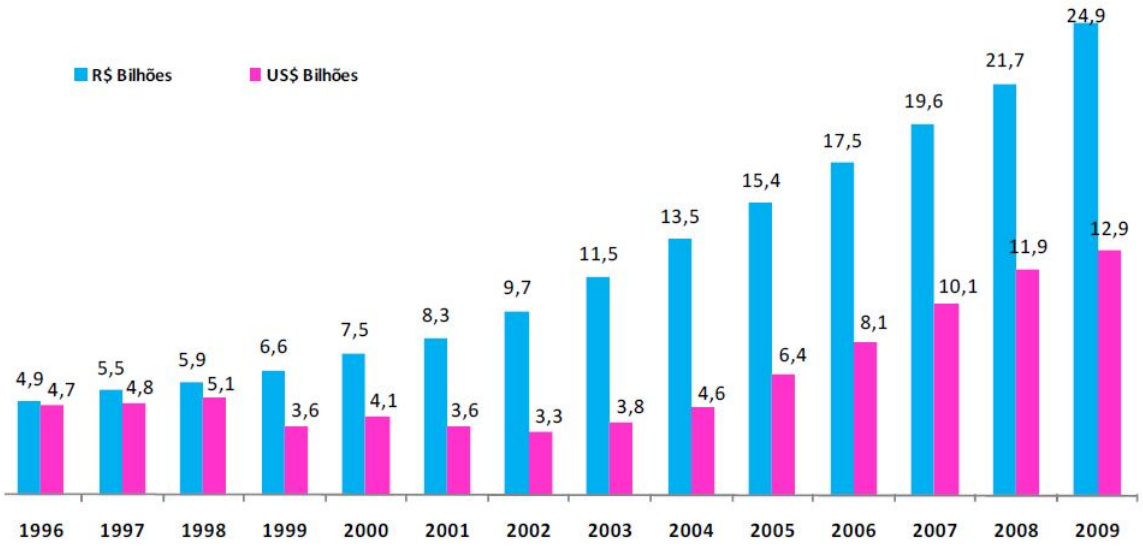


Figura 1. Faturamento liquido das Indústrias de Produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (Fonte: ABIHPEC)

O lançamento de novos produtos cosméticos no mercado é fruto do grande desenvolvimento alcançado pela cosmetologia e do crescente apelo ao uso de produtos naturais. Estes produtos oferecem nutrientes para a proliferação de microrganismos, o que exige maior eficácia dos sistemas conservantes e de um controle microbiológico adequado (4). Baixos níveis de contaminação de algumas cepas microbianas são inevitáveis, não apresentando ameaça significativa aos produtos cuidadosamente formulados. Mas, se o crescimento bacteriano não for detectado, pode causar deterioração do produto (5).

Os cosméticos, em geral, são excelentes meios para existência e proliferação de microrganismos, pois são fontes de elementos essenciais ao seu

desenvolvimento. As contaminações, que podem ser de origem física, química ou microbiológica, são as principais causas de insucesso na obtenção de cosméticos de qualidade e eficácia percebidas pelos consumidores. As contaminações microbiológicas são sem dúvida as mais difíceis de serem evitadas, pois, na maioria das vezes, quando em seu estágio inicial, não podem ser detectadas visualmente, mas sim por métodos de análises específicas, que demandam mais tempo que as análises físico-químicas usuais (6).

1.1 Contaminações microbiológicas

Contaminações microbiológicas são causadas por microrganismos, sendo bactérias e fungos os mais comuns. Para que os microrganismos se desenvolvam é necessário que encontrem condições adequadas para sua nutrição, reprodução e mobilidade no meio onde estão localizados (7).

A contaminação microbiana tem sido um dos problemas mais importantes da indústria cosmética, pois estes produtos são reconhecidos por serem substratos para a sobrevivência e desenvolvimento de uma ampla variedade de microrganismos, já que possuem alguns nutrientes que facilitam o crescimento, tais como: lipídeos, polissacarídeos, álcool, proteínas, aminoácidos, glucosídeos, esteróides, peptídeos e vitaminas. As condições adequadas de oxigenação, valor de pH, temperatura, grau osmótico, atividade superficial, perfume e óleos essenciais presentes nos cosméticos, favorecem a multiplicação microbiana (8).

A qualidade microbiológica dos produtos cosméticos é afetada não apenas pelos tipos e quantidade de organismos introduzidos durante a fabricação,

estocagem e uso, mas também depende da interação dos mesmos com a formulação. Muitos fatores físico-químicos são fundamentais, assim como o sistema conservante que pode atuar minimizando os contaminantes a níveis não detectáveis durante a estocagem do produto. Como os microrganismos apresentam absoluta exigência quanto à presença de água, esta exerce efeito fundamental, embora também formas sólidas possam se deteriorar em decorrência de contaminantes (9).

Na indústria, a contaminação microbiológica pode ser introduzida em produtos cosméticos pelas mais diferentes formas, podendo ser provenientes de equipamentos ou recipientes usados na manipulação, ou estar presentes em alguma matéria-prima (10). Mesmo depois de ter sido produzido e embalado com êxito, outra importante fonte de contaminação pode ser o uso inadequado do usuário, podendo transferir microrganismos ao produto. A adição de água com a finalidade de obter um melhor rendimento, também favorece a contaminação microbiana (11).

Um produto contaminado por microrganismos apresenta um risco potencial à qualidade do produto e à saúde do consumidor, devido à presença de substâncias geradas pelo metabolismo microbiano, sendo que alguns incidentes já foram relatados, como infecção por *Klebsiella pneumoniae* em creme para as mãos e *Pseudomonas* em máscara para os olhos (12).

A contaminação de um produto cosmético pode acarretar, entre outras alterações, a separação das fases emulsionadas, mudança de coloração, pois alguns microrganismos produzem pigmentos ou ácidos que alteram o pH e afetam

os próprios pigmentos adicionados à formulação; formação de odores, em virtude da produção de compostos sulfurados responsáveis pelo mau cheiro e liberação de gases, em função do metabolismo microbiano (13).

Em estágios mais avançados da contaminação, aparecem alterações nas características reológicas, mudando a viscosidade devido à produção de enzimas microbianas, que degradam espessantes; desestabilização da emulsão, em função de alterações dos emulsificantes; formação de biofilme e danos às embalagens flexíveis (14).

A capacidade de o microrganismo promover o processo de deterioração depende da sua capacidade em produzir enzimas adequadas, e o risco maior no caso de produtos cosméticos reside na extrema versatilidade de caminhos bioquímicos dos microrganismos, possibilitando a síntese de enzimas degradativas. Na dependência de natureza das moléculas, características do produto, número e tipo de organismos, o processo degradativo, pode demandar horas, meses ou mesmo anos (9).

Açúcares, aminoácidos e glicerol, que possuem baixo peso molecular, são degradados pelos caminhos metabólicos primários. Já a quebra de proteínas, polissacarídeos e lipídeos exige enzimas específicas. Aquelas capazes de hidrolisar o amido, ágar e celulose são produzidas por muitos organismos incluindo *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Clostridium*. A produção de alfa-amilase é particularmente relevante em *Bacillus* spp. Estes microrganismos, juntamente com *Aspergillus* e *Penicillium spp*. são as fontes mais comuns de proteinase e peptidase que quebram compostos como a gelatina. A produção de lipase é

largamente distribuída e ocorre mais comumente entre os fungos, daí a associação da deterioração ao desenvolvimento de fungos em cremes e emulsões (9).

O controle da contaminação durante o processo de fabricação do produto pode ser executado, porém, a manipulação e principalmente o uso incorreto pelo consumidor podem favorecer o crescimento microbiano (11).

Os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* são os principais organismos patogênicos associados a produtos cosméticos. O crescimento de certos microrganismos pode levar à liberação de toxinas microbianas ou ao desenvolvimento de produtos metabólicos tóxicos que são freqüentemente resistentes às formas atuais de esterilização e persistem após a morte das células microbianas (14).

A comprovação da qualidade microbiana em cosméticos visa prevenir a transmissão de doenças quando da utilização correta destes produtos, além de assegurar a estabilidade e, conseqüentemente, sua eficácia. Os cosméticos necessitam de conservantes que sejam capazes de reduzir a carga microbiana a níveis aceitáveis durante todo o prazo de validade (9).

Muitos produtos cosméticos são introduzidos diariamente no mercado, devido ao crescente apelo ao uso de produtos eficazes. Baixos níveis de contaminação de certas cepas microbianas são inevitáveis, não apresentando ameaça significativa a produtos formulados com cuidado. Mas, se não for detectável o crescimento bacteriano, pode causar deterioração do produto (5).

A qualidade microbiológica exigida para um produto cosmético não pode

ser obtida mediante a aplicação de um processo esterilizante, como calor ou radiação, pois não é aceitável pelas autoridades sanitárias a utilização de matérias primas e processos de fabricação de baixa qualidade, para depois tentar “limpar” o produto final, além do fato de que muitos produtos não suportariam processos de aquecimento, resultando em quebra de proteínas (9).

A presença de um sistema conservante em uma formulação cosmética não significa que a mesma esteja protegida da contaminação microbiana, uma vez que os microrganismos utilizam diversos compostos orgânicos como substrato. Para que esta proteção ocorra, é necessária intensa investigação durante o desenvolvimento da fórmula cosmética (15).

A grande maioria dos produtos cosméticos necessita ter conservantes em sua formulação, particularmente, as soluções aquosas, as emulsões e os géis, devido à grande atividade de água em suas formulações, contribuindo para a proliferação de microrganismos. A adição de conservantes tem como objetivo principal prevenir a proliferação ou limitar o número de microrganismos durante as condições normais de estocagem e uso (16).

É importante que a formulação se constitua em ambiente hostil, no qual os microrganismos não possam crescer ou sobreviver, preferencialmente conferindo características microbicidas a microbiostáticas. Ainda, a atividade conservante deve ser suficientemente rápida para garantir que qualquer contaminação introduzida pelo consumidor seja eliminada no período entre os usos (15).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais,

associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (17). O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético.

Assim, a seleção do agente antimicrobiano a ser incorporado em produtos cosméticos ou farmacêuticos é tarefa bastante difícil, devendo ser feita à luz do conhecimento técnico específico disponível sobre sua estrutura química, aspectos microbiológicos e legais pertinentes ao conservante e suas combinações, buscando-se um conservante natural ou semi-sintético que seja eficiente contra bactérias e fungos e não apresente efeitos tóxicos ou irritantes.

1.2 Conservantes

No século passado, a descoberta de substâncias antimicrobianas revolucionou a saúde pública mundial, evitou mortes, diminuiu infecções e contaminações oriundas do meio ambiente, alimentos, medicamentos e cosméticos. A indústria cosmética, preocupada com a possibilidade de fornecer produtos contaminados ao usuário, se rendeu aos conservantes (18).

Conservantes são substâncias adicionadas a produtos cosméticos, farmacêuticos, de limpeza e alimentícios com o objetivo de inibir o desenvolvimento de microrganismos, durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto (19). Um produto livre de microorganismos que possam causar danos à saúde humana constitui uma exigência crescente, por parte dos consumidores e também dos órgãos responsáveis pela vigilância sanitária do País.

Embora as formulações cosméticas não necessitem de esterilidade, devem cumprir com as exigências da legislação quanto à ausência de microrganismos específicos, bem como obedecer ao número máximo permitido de Unidades Formadoras de Colônia, determinado pela Resolução n° 481, de 23 de setembro de 1999 (20).

De acordo com Giovanni *et al*. (21), a indústria cosmética utiliza cerca de 13.000 ingredientes, que correspondem a mais de 30.000 diferentes denominações comerciais. Segundo Markowetz (13), aproximadamente, 50 conservantes, com grandes diferenças na estrutura química, estão aprovados para uso em cosméticos, mas apenas alguns apresentam ampla atividade antimicrobiana. Estes fatos estimulam o uso de associação de conservantes, para que as deficiências de um possam ser corrigidas pelo outro, além das incompatibilidades que possam ocorrer, como diminuição da atividade em determinados pHs, solubilidade e incompatibilidades com ingredientes da formulação.

A ciência de conservação de produtos cosméticos e farmacêuticos é relativamente nova, somente nos últimos 60 anos tem sido tratada de maneira científica. Nos momentos iniciais, a conservação foi obtida com agentes germicidas, apesar das conseqüências envolvendo riscos. Hoje, grande importância é dada ao assunto, devido à preocupação não apenas do aspecto microbiológico, mas de potencial de irritação e toxicidade ao consumidor (9).

A necessidade da introdução de novos antimicrobianos torna-se evidente ao considerar-se o aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrentes,

principalmente, do uso indiscriminado e mal orientado deste tipo de substância (22, 23).

Para se definir se a susceptibilidade do produto é maior à contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, avalia-se inicialmente a atividade de água do produto. Quanto mais aquosa, mais susceptível a bactérias. Em geral, cremes e loções exigem atividade tanto bacteriostática quanto fungistática, fazendo-se necessário utilizar misturas de conservantes de amplo espectro de atividade (10).

O segundo passo para se selecionar um sistema conservante é conhecer suas propriedades físico-químicas para se prever possíveis incompatibilidades químicas com os componentes da fórmula e até de inativação do conservante. As propriedades organolépticas também devem ser consultadas, a fim de se prever possíveis interferências na cor, no odor e também no sabor, em caso de produtos para os lábios (10).

O conservante ideal deve ser estável, compatível com outros ingredientes da formulação, sem interferir com a cor ou odor do produto, ter amplo espectro de ação em baixa concentração, permanecer ativo em diferentes valores de pH, distribuir-se de forma apropriada em sistemas emulsionados, inativar contaminantes rapidamente, prevenindo a adaptação microbiana, além de não provocar efeitos tóxicos, irritantes e hipersensibilizantes (25).

O conservante deve ainda manter sua atividade antimicrobiana na presença de outros insumos da fórmula e apresentar, preferencialmente, ação biocida. Por esta razão, tanto o espectro de ação como a concentração de uso deve ser preciamente calculada para garantir a integridade do produto (11).

Tabela 1. Conservantes utilizados em preparações cosméticas

	Concentrações Usuais (%)
Parabenos	
Metilparabeno Etilparabeno Propilparabeno Butilparabeno	0,1-1
Formaldeído e liberadores de formaldeído	
Formaldeído (metanal)	0,1-0,2
Quaternuim-15	0,02-0,3
Imidazolidinil uréia	0,03-0,2
Diazolidinil uréia	0,1-0,5
2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (bronopol)	0,01-1
Dimetiloldimetil hidantoína (DMDM hidantoína)	0,1-1
Isotiazolinonas	
Metilcloroisotiazolinona (MCI) Metilisotiazolinona (MI)	0,1
Benziotiazolinona	50 ppm
Fenoxietanol	1
Fenoxietanol + Metildibromoglutaronitrilo	0,0075-0,06
Sorbato de potássio	0,6
3-iodo-2-propinil-butilcarbamato (IPBC)	0,1

Adaptado de Steinberg (25) e Sasseville (26).

Poucos agentes se aproximam deste ideal, e todos, sem exceção, têm demonstrado causar sensibilização de contato (24, 27, 28, 29, 30,31, 32, 33, 34). A Tabela 1 mostra os principais conservantes utilizados em produtos cosméticos e farmacêuticos.

Paralelamente à capacidade conservante, o sistema não deve apresentar característica tóxica ou irritante. Partindo-se do princípio que a toxicidade consiste em problema devido à similaridade do metabolismo celular de diferentes seres vivos, de distinta complexidade, um composto que mostra toxicidade a células microbianas, de forma semelhante pode ser tóxico a células humanas. Há, porém

características que tornam cada célula particular. Além disso, os cosméticos não são agressivos a muitos microrganismos, pelo mesmo motivo que não devem ser agressivos às células humanas (35).

A exposição a um agente conservante pode ocorrer por meio da ingestão, inalação ou permeação cutânea, porém sendo este uma molécula biologicamente ativa, o simples contato com a pele pode desencadear uma irritação ou sensibilização de contato (25, 30). Em relação aos produtos cosméticos, estima-se que aproximadamente 12% da população apresenta efeitos adversos a produtos cosméticos, especialmente reações alérgicas, sendo que os conservantes estão em segundo lugar neste *ranking*, atrás apenas das fragrâncias (27, 33, 36, 37).

Entre muitos produtos potencialmente indicados para este emprego, apenas uma parte tem sido efetivamente usada na indústria, e dentre estes, três quartos são representados por parabenos. Os parabenos são compostos utilizados como conservantes antimicrobianos em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Constituem uma série homóloga de ésteres do ácido p-hidroxi-benzóico (metil-parabeno, etil-parabeno, propil-parabeno, isopropil-parabeno, butil-parabeno, isobutil-parabeno, e benzil-parabeno, ver Figura 2) e são utilizados na forma pura ou combinados para exercer efeito antimicrobiano – efeito este decorrente da atividade antifúngica desses compostos. Embora seja o grupo mais popular de conservantes, eles podem apresentar falhas em proporcionar os requisitos necessários para grande parte das formulações, quando aplicados individualmente (38).

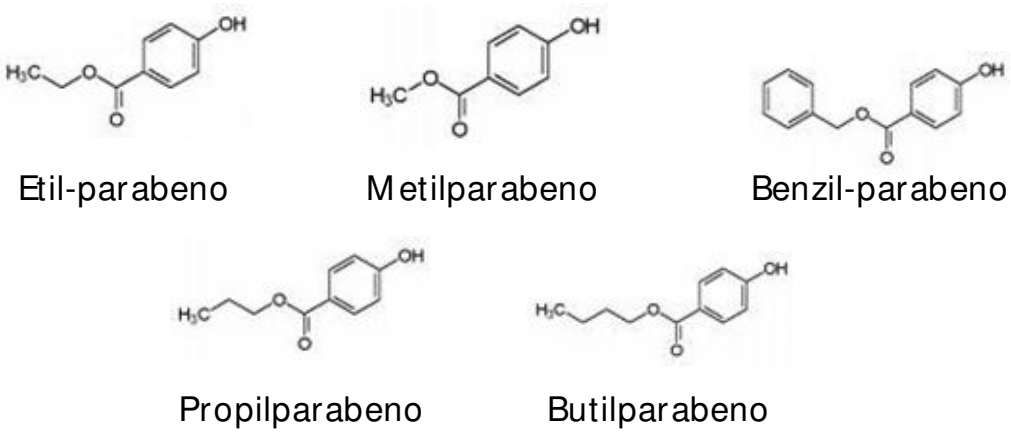


Figura 2. Estruturas químicas de conservantes do grupo dos parabenos

A limitação no uso dos parabenos está na quantidade que pode ser dissolvida na água, pois os mesmos só agem em fase aquosa. Os parabenos são inativados (parcialmente ou completamente) por fortes ligantes de hidrogênio, tais como os compostos altamente etoxilados, como os polisorbatos e outros compostos, como os derivados de celulose, proteínas e lecitinas. Podem também ser absorvidos por muitos tipos de argilas ou compostos semelhantes. Os parabenos são pH dependentes e a ordem de adição ou o método pelo qual os parabenos são acrescentados às formulações freqüentemente determina se eles serão inativados (39).

Nos últimos anos, o uso dos parabenos vem sendo descontinuado devido aos estudos demonstrando a sua ação hipersensibilizante (32). Apesar dos parabenos já estarem no mercado há quase 80 anos e demonstrarem de modo geral estabilidade, eficácia e segurança, estudos mostram que estes compostos podem causar reação de sensibilização, particularmente em indivíduos que apresentam disfunções na barreira cutânea, traumas ou eczema (39, 40).

Outro grupo de conservantes bastante utilizados, desde 1889, são o formaldeído e os liberadores de formaldeído. Estes compostos são provavelmente os mais problemáticos em termos de alergenicidade e incluem DMDM Hidantoína, imidazolidinil uréia, diazolidinil uréia, bronopol e quaternium-15, sendo este último a principal causa de alergia a cosméticos nos Estados Unidos (36, 41).

O formol foi classificado como carcinogênico, de acordo com a Monografia nº 88 publicada pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer) em 2006 e o bronopol foi substituído em diversos medicamentos tópicos, pois quando aplicado causava dermatite aguda e severa (41).

O formaldeído livre em produtos cosméticos está em desuso devido ao seu potencial irritante, hipersensibilizante e carcinogênico, sendo proibido em países como Japão e Suécia. Nos Estados Unidos e no Brasil é proibido o uso em aerosóis (26). Os compostos liberadores de formaldeído vêm substituindo o uso do formaldeído livre, porém este é ainda encontrado em xampus, esmaltes e fortalecedores de unha. Estes compostos possuem em sua estrutura química uma molécula de formaldeído, a qual é facilmente liberada podendo causar reações alérgicas e também interagir com outras substâncias produzindo nitrosaminas que são conhecidos agentes carcinogênicos (36).

Os doadores de formaldeído, como o quaternário de amônio, são altamente solúveis em água, estáveis e ativos frente a uma ampla faixa de pH, sendo efetivos contra leveduras, fungos filamentosos e bactérias, especialmente, *Pseudomonas aeruginosa*. A concentração utilizada varia de 0,2 a 0,3%, e apresenta-se com maior potencial de liberação de formaldeído. Imidazolidinil uréia

é um doador de formaldeído muito utilizado nas concentrações de 0,03 a 0,2%, sendo mais efetivo contra bactérias. O 2-bromo-2nitropropanodiol é utilizado nas concentrações de 0,01 a 1%, apresentando notável potencial irritante em concentrações superiores ao máximo estipulado. Tanto o quaternário de amônio quanto imidazolidinil uréia apresentaram 1% de sensibilizações (26, 41).

A imidazolidinil uréia foi introduzida em 1970 e rapidamente se tornou o segundo conservante mais utilizado atrás apenas dos parabenos. A sensibilização causada pela imidazolidinil uréia é decorrente da molécula inteira e não da liberação de formaldeído (26, 42). A diazolidinil uréia, lançada em 1982 possui um espectro de ação maior que a imidazolidinil uréia, porém um maior potencial irritativo (43).

O bronopol é utilizado em xampus e emulsões na concentração de 0,2%, o que pode atingir o equivalente a 30 ppm de formaldeído livre e desencadear uma dermatite de contato. O uso deste composto vem diminuindo nos últimos 15 anos (44). A DMDM hidantoína contém 2% de formaldeído livre e é o composto desta classe com o maior espectro de ação e largamente utilizado em xampus. De Groot e colaboradores demonstraram que 57% dos voluntários apresentaram hipersensibilidade ao teste de contato com este composto (37, 45). O bronopol foi substituído em diversos medicamentos tópicos destinados à pele sensível, pois quando aplicado causava dermatite aguda e severa (44).

Um sistema conservante comumente utilizado em cremes hidratantes, xampus e maquiagem é a mistura de metilcloroisotiazolinona com metilisotiazolinona (MCI/MI) na proporção de 3:1, respectivamente, introduzido na

Euroa em 1970 e nos Estados Unidos, por volta de 1980 (26). Este sistema é efetivo em baixas concentrações contra uma ampla variedade de fungos, leveduras e bactérias (Gram-positivas e negativas), mas também é irritante em concentrações acima de 200 ppm. Testes em animais têm revelado que esta classe de conservantes é potencialmente alergênica, sendo o MCI em maior intensidade (45, 46).

Existem mais de 100 publicações relatando alergia pela associação MCI/MI. Um exemplo típico é o de mulheres que apresentam dermatite nas mãos ou na face, particularmente nas pálpebras (47). A maioria dos cosméticos responsáveis pela dermatite de contato alérgica a esta associação são produtos *leave-on*. Também tem sido relatada dermatite na região dos glúteos e períneo devido à presença deste composto em papel higiênico (37). Os níveis permitidos de MCI/MI em produtos cosméticos são de no máximo 0,1% (15 ppm de ingredientes produtos) no Brasil, EUA, Canadá, Europa e Japão. Porém, para produtos *leave-on* nos EUA e Canadá é permitido somente o uso de 7 ppm (25).

O fenoxietanol é o produto da reação de óxido de etileno com fenol, esse produto ainda é chamado de 2-fenoxietanol, fenoxietol ou éter monofenílico de etilenoglicol. É um conservante bastante utilizado em produtos de higiene pessoal e que possui ação antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativas. O fenoxietanol contém fenol o qual possui um importante efeito na inibição da fagocitose, reduzindo desta maneira a eficiência da resposta imunológica primária. Este composto também é utilizado em vacinas e pode causar envenenamento sistêmico, cefaléia, choque, fraqueza, convulsões, danos renais e cardíacos (48).

Este conservante também pode conter resíduos de óxido de etileno o qual é um potencial agente causador de dermatite, queimaduras, bolhas e eczema (49, 50).

O fenoxietanol é aprovado no Brasil, na concentração máxima de 1%, sem restrições para todas as aplicações de *personal care* (51). O fenoxietanol é amplamente usado na indústria de fragrâncias como solvente e, também, pelo seu aroma floral. O nível de fenol livre é um ponto crítico para o setor cosmético, porque o mesmo é irritante. Normalmente, deve ser inferior a 0,1%. O fenoxietanol é um excelente solvente para parabenos e outros conservantes e, por isto, existem muitos *blends* de conservantes que o incorporam como solvente. O fenoxietanol é um biocida fraco, sendo mais ativo contra as bactérias. O fenoxietanol é inativado por compostos altamente etoxilados (52).

O conservante fenoxietanol também é utilizado em associação com a metildibromoglutaronitrila (MDBGN) na proporção de 4:1. Na América do Norte, o uso dessa associação é restrito para produtos de banho e cosméticos na concentração de 0,0075 - 0,06%. Na Europa esta associação tem sido muito utilizada como substituta daquela composta por MCI/MI (53). Apesar disso, reações alérgicas a associação fenoxietanol/MDBGN têm sido descritas principalmente devido à presença do MDBGN. Na maioria dos casos uma dermatite de contato aparece nas mãos de forma severa, aguda e vesicular, mas também na face, região genital e extremidades dos membros (37, 54). O MDBGN não é permitido no Japão.

Sorbato de potássio é outro agente conservante ativo contra fungos e leveduras, mas pouco efetivo contra bactérias. Outra desvantagem do sorbato de

potássio é que sua atividade é dependente do pH, sendo que esta diminui em pH abaixo de 4,5. Alguns estudos demonstraram que em testes clínicos de irritabilidade e sensibilização cutânea, o sorbato de potássio provocou eritema e edema (25, 45).

O 3-iodo-2-propinil-butilcarbamato (IPBC) é um composto halogenado com efetiva ação fungicida, bactericida e parasiticida. O uso do IPBC na indústria cosmética vem crescendo uma vez que possui baixa toxicidade e baixo risco de sensibilização (55). Entretanto, algumas reações alérgicas têm sido relatadas (56).

Considerando que os conservantes disponíveis no mercado apresentam, sem exceção, algum risco de hipersensibilidade, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de compostos naturais com atividade antimicrobiana com o propósito de reduzir ou até mesmo substituir o conservante tradicional.

Dentre estes compostos, os derivados vegetais são muito utilizados devido as suas propriedades antimicrobianas e por isso têm sido propostos como alternativa conservante aos agentes sintéticos. Alcalóides, esteróides, flavonóides, cumarinas, quinonas, compostos fenólicos e polifenólicos, glicoproteínas, carboidratos, terpenos e uma vasta variedade de óleos essenciais têm demostrado importante atividade antimicrobiana (57, 58, 59, 60, 61, 62). Os óleos essenciais, apesar de apresentarem um potencial antimicrobiano produzem reações de hipersensibilidade, especialmente foto-alergias, quando aplicados topicamente, limitando sua utilização como agentes conservantes em produtos destinados a aplicação tópica (63, 64). Os óleos essenciais mais documentados pelo potencial alergênico são: óleo de melaleuca, lavanda, jasmin, limão, laranja,

citronela, cássia, *ylang-ylang*, pau-rosa e cravo-da-Índia (64).

Outros compostos naturais ou semi-sintéticos têm sido desenvolvidos na tentativa de alcançar moléculas mais seguras e eficazes para a conservação de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Dentre eles, destacam-se os derivados de açucares, ácidos graxos e aminoácidos, que apresentam excelente compatibilidade biológica.

A atividade antimicrobiana de monoésteres de ácidos graxos está condicionada a presença de algum grupo hidrofílico em sua molécula. Embora os ésteres de ácidos graxos com álcoois monohídricos sejam inativos contra microrganismos, ésteres alfa-hidróxi-ácidos graxos com álcoois monohídricos e ésteres de ácidos graxos com álcoois polihídricos possuem atividade biológica ativa (65). Os ésteres de sacarose, como por exemplo, o do ácido láurico se mostrou ativo contra bactérias Gram positivas, Gram-negativas e fungos. Porém, estudos demonstram que os diésteres de sacarose são mais potentes do que os monoésteres (65, 66).

Açúcares também desempenham um importante papel nas propriedades sensoriais, físicas e químicas de alimentos, cosméticos e medicamentos. A sacarose possui três grupos hidroximetil disponíveis para esterificação o que pode determinar a formação de surfactantes lipofílicos ou hidrofílicos (65).

Este processo pode ser realizado sem a utilização do óxido de etileno, o que torna a molécula menos irritante. Neste sentido, a ausência de óxido de etileno, as características da solubilidade, a compatibilidade com outros conservantes e o baixo potencial alergênico, tornam os ésteres de sacarose

potenciais agentes na prevenção da contaminação microbiana (65). Os ácidos láurico, esteárico e esteárico acetilado podem ser utilizados nos ésteres de sacarose, sendo reportada uma ação bacteriostática contra bactérias Gram positivas e menos contra as Gram negativas. Lerk e Sucker (67) estudaram o laurato de sacarose sobre *E. coli, P aeruginosa* e *S. aureus* e encontraram um importante papel na preservação de preparações orais líquidas.

Um exemplo de mercado, que apresenta um forte impacto na área de produtos cosméticos e dermatológicos é o SENSIVA® SC-10 (Schülke & Mayr, Norderstedt, Germany), o qual é constituído de uma mistura de etilhexilglicerina (octoxiglicerina) e caprilil glicol, podendo ser aplicado como emoliente e umectante, além de contribuir para a estabilidade microbiológica da formulação. Outro produto de mercado utilizado com o mesmo propósito é o LIPACIDE® C8G (Seppic, Paris, France) constituído de capriloil glicina. Cabe ressaltar que estes compostos apresentam excelentes atividades coadjuvantes de formulação, ausência de potencial alergênico e irritante, mas não possuem atividade antimicrobiana capaz de substituir os conservantes do produto, possibilitando apenas a redução da concentração dos mesmos. De acordo com o GNPD (Global New Products Database), estes dois excipientes são encontrados em aproximadamente 155 e 385 produtos cosméticos, respectivamente.

1.3 Xilitol

O xilitol é um poliálcool cuja fórmula molecular é $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano), derivado do açúcar proveniente de plantas, frutas e vegetais,

que possui propriedades antimicrobianas descritas na literatura e tem sido amplamente utilizado como adoçante em goma de mascar. O nome xilitol relaciona-se à xilose, o açúcar da madeira, a partir da qual o xilitol foi obtido pela primeira vez. Na nomenclatura química, o xilitol é classificado similarmente ao sorbitol e ao manitol, ou seja, como um açúcar-álcool ou um poliol (68). A Tabela 2 mostra as propriedades físico-químicas do xilitol.

Estudos demonstraram que o xilitol na concentração de 5% inibiu o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* alterando sua ultraestrutura, evidenciando-se alterações na sua parede celular e diminuição do diâmetro da sua cápsula polissacarídica, além das alterações no crescimento bacteriano, com diminuição do número de divisões, da formação de cadeias e aumento das autólises de otopatógenos *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* nas células epiteliais nasofaríngeas (69).

Tabela 2. Características e propriedades físico-químicas do xilitol

Propriedades	**Características ou Valores**
Fórmula empírica	$C_5H_{12}O_5$
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Odor	Nenhum
Ponto de Fusão	92-96 °C
Ponto de Ebulição	216 °C (1 atm)
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa a 10%)	1,03 g/mL
Solubilidade em água a 20 °C	63 g/100 g
Viscosidade (solução aquosa a 10%)	1,23 cP
Índice de Refração (25 °C)	1,3471
Estabilidade	Estável a 120 °C

Adaptado de Bar (70).

O xilitol é também amplamente estudado pela inibição do crescimento de *S. mutans*, o principal agente causador da cárie (71). O mecanismo pelo qual o xilitol inibe o crescimento das bactérias *S. pneumoniae* e *S. mutans* foi sugerido por Kontiokari *et al.* (72) e por Trahan *et al.* (73). Segundo esses autores, o xilitol é transportado pelo sistema frutose fosfotransferase (PTS) para dentro da célula, onde é fosforilado a xilitol-5-fosfato. Como essas espécies bacterianas não possuem as enzimas responsáveis pelo metabolismo do xilitol-5-fosfato formado, ocorre um acúmulo intracelular desse composto. Uma vez acumulado dentro da célula, o xilitol-5-fosfato torna-se tóxico, causando inibição das enzimas glicolíticas e do crescimento das bactérias, cujo tempo de sobrevivência fica reduzido.

Uma das vantagens do xilitol é que, em virtude de sua elevada estabilidade química e microbiológica, ele atua mesmo em baixas concentrações, como conservante de produtos alimentícios, oferecendo resistência ao crescimento de microrganismos e prolongando a vida de prateleira desses produtos (70).

O uso de xilitol em produtos industrializados já foi aprovado em mais de quarenta países, e as indústrias que mais o utilizam são, pela ordem, a de alimentos, a de fármacos e a de cosméticos. Na Escandinávia e em outras partes da Europa, o xilitol vem sendo amplamente utilizado nesses três setores industriais há mais de 20 anos. No Brasil, as indústrias estão começando a incluir o xilitol na formulação de produtos (74).

Ferreira *et al*. (75) avaliaram a toxicidade dérmica aguda com doses repetidas de formulações terapêuticas sob as formas farmacêuticas de cremes e géis contendo xilitol a 5% e 10%, visando garantir a segurança no uso destas. Dez

doses de cada formulação teste e de seu respectivo controle foram aplicadas, em intervalos de 24h sobre a pele tosada de coelhos albinos adultos de ambos os sexos da raça Nova Zelândia. O aparecimento de edemas, eritemas e escaras nas regiões de teste e de controle foi observado diariamente até o final dos experimentos, não sendo observada qualquer irritação na pele dos animais.

Alterações na estrutura da molécula do xilitol podem gerar compostos com atividade mais promissora, mas para que sejam utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos devem ser testados quanto à eficácia e à segurança (76).

A molécula de xilitol, apesar de todas as características acima descritas, não é capaz de promover, sozinha, a completa preservação de uma formulação. Além disso, altas concentrações de aplicação inviabilizam a sua utilização como conservante principal do sistema.

A síntese dos compostos derivados de xilitol foi realizada nos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento da Chemyunion Química Ltda. Inicialmente o Xilitol foi submetido às condições de isopropilenação de acordo com o descrito por Zarif *et al*. (77), levando a formação dos acetonídeos (Figura 3). Na reação de isopropilenação foi utilizada a acetona anidra juntamente com sulfato de cobre anidro, tendo como catalisador o ácido sulfúrico concentrado.

O diacetonídeo deve ser o produto principal da reação. A separação dos compostos foi feita por coluna de cromatografia em sílica gel.

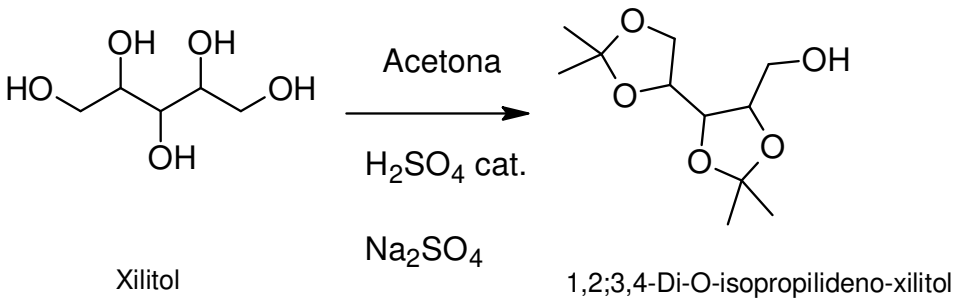


Figura 3: Isopropilenação do xilitol

O composto resultante da separação foi submetido à reação de esterificação (Figura 4) com a utilização do cloreto de octanoila ou cloreto de 2-etiloctanoila (preparados a partir dos respectivos ácidos carbonílicos). A reação é tradicionalmente realizada em diclorometano como solvente na presença de trietilamina.

A etapa final consistiu na desproteção dos acetonídeos presentes nos compostos, mediante tratamento com uma mistura de ácido trifluoracético/água conduzindo aos compostos interesse.

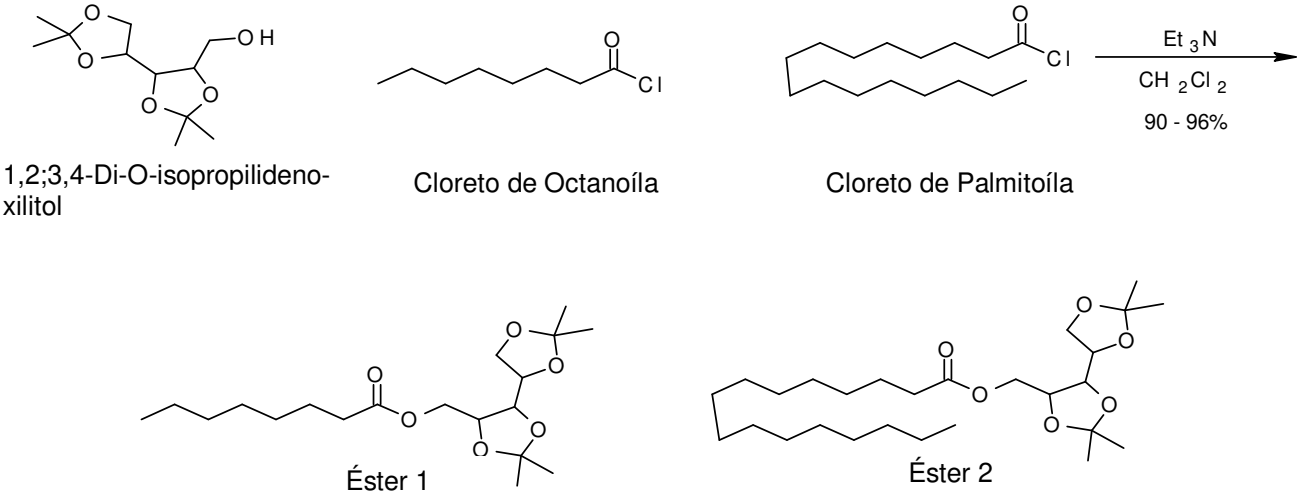


Figura 4: Reações de esterificação do diacetonídeo

Posteriormente, os compostos sintetizados foram caracterizados por métodos espectroscópicos e cromatográficos. A caracterização dos compostos pelos métodos espectroscópicos e cromatográficos mostra a pureza, assim como conectividade das ligações químicas formadas e grupos funcionais presentes.

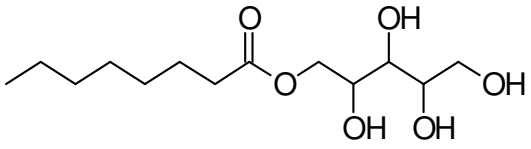


Figura 5. Estrutura química do monoéster de C-8 Xilitol

1.4 Concentração Inibitória Mínima

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta de espécies microbianas uma vez que Hipócrates (460–337 a.C.) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Documentos datados de 2500 a 3000 anos atrás, mostram que alguns povos como chineses e indianos, ainda primitivos, utilizavam mofo, papa de soja e outros produtos correlatos para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios (78).

As substâncias antibióticas ou antimicrobianas representam um imenso avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas. Os antimicrobianos atuam sobre microrganismos patogênicos e oportunistas que podem conduzir a uma incapacitação prolongada ou ao óbito (79).

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de produtos

naturais aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Considerando que a atividade antimicrobiana de determinada substância deve-se à sua capacidade de impedir o crescimento ou mesmo, destruir os microrganismos-teste, a avaliação da atividade antimicrobiana torna-se possível. Nestes casos, o principal objetivo é avaliar as concentrações em que determinada substância apresenta ação sobre fungos e bactérias (80). Atualmente existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica destes agentes. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (81).

As variações referentes à determinação concentração mínima inibitória de produtos naturais ou semi-sintéticos podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, solubilidade e outras propriedades físico-químicas. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais ou semi-sintéticos (82).

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (83).

A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço,

até a margem onde há crescimento de microrganismos (82). De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior, ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm (83).

No método há a necessidade de controle positivo, empregando-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (84).

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37ºC para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27ºC por 48 a 72 horas (85).

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana pelo método de difusão são por meios de difusão em disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro, e perfuração em ágar (9).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (9, 83). O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. (82). Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição. A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando entre

1 e 10 mL e a microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (83).

Diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição, havendo assim a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa da execução do teste (82).

Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado dos organismos a serem desafiados e não devem conter substâncias antagônicas à atividade antimicrobiana em estudo. No método de difusão a concentração do ágar e a sua origem podem influenciar os resultados dos ensaios (9).

Segundo Barry e Thornsberry (82) e Collins (83) há substâncias no meio de cultura que influenciam a susceptibilidade do teste, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais agentes.

O pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano e com a atividade e a estabilidade das substâncias testadas (9). Barry e Thornsberry (82) afirmam que a atmosfera com concentração de CO_2 elevada, deve ser evitada, já que altera o pH da superfície, sendo então capaz de afetar a atividade antimicrobiana de alguns agentes.

O aumento da acidez do meio diminui a atividade antibacteriana de substâncias básicas como a estreptomicina, e por outro lado, provoca o aumento da atividade de substâncias ácidas como a penicilina (9).

Conforme o metabolismo do microrganismo desafiante, aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos, as condições de disponibilidade de oxigênio podem influenciar na sua multiplicação. Nos trabalhos desenvolvidos para a determinação

da atividade da estreptomicina utilizando *Staphylococcus aureus*, por diluição em tubos, verificou-se que houve pouca influência da disponibilidade de oxigênio (9).

A suscetibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A padronização do inóculo se faz, portanto, necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. Para os testes de diluição em caldo, o padrão é de 10^5 UFC/inóculo no início do período de incubação (83, 86).

A incubação dos microrganismos deve ser feita a 35-37 ºC para o crescimento de bactérias e 25 a 27 ºC para fungos. No método de diluição, as condições de crescimento dos microrganismos nos tubos devem ser semelhantes, propiciando-se a mesma temperatura e agitação. No método de difusão as placas devem ser incubadas com o cuidado de se manter a temperatura homogênea na estufa (85).

Condições alternativas só devem ser utilizadas se forem essenciais para o crescimento do microrganismo em teste (87).

1.5 Teste de Desafio (Challenge Test)

Demonstrar a eficácia conservante de uma substância requer que esta tenha sua atividade antimicrobiana mantida na presença de outros insumos da fórmula (88). O uso correto de conservantes durante o desenvolvimento de um produto é um aspecto que deve ser considerado na qualidade microbiológica de cosméticos. No entanto, para se definir o conservante ideal à determinada formulação, é necessário que se faça o teste de desafio do conservante, a fim de

se determinar a substância química e a concentração mínima efetiva para garantir que o produto se mantenha sem contaminação, conforme a legislação específica, durante sua fabricação, na embalagem e distribuição, além de resistir a possíveis contaminações introduzidas pelo usuário em função do mau uso (9).

O teste de desafio (*Challenge Test*) ou teste de desafio de conservantes é um procedimento para determinar se o conservante utilizado em uma formulação, seja ela cosmética ou farmacêutica, previne a contaminação microbiana proveniente de matérias-primas, processo produtivo ou durante o uso pelo consumidor. Consiste na inoculação da amostra com suspensão de microrganismos, com carga conhecida, avaliações periódicas do número de sobreviventes e comparação dos resultados com as especificações (89).

Os microrganismos utilizados no teste de desafio dependem do tipo de produto, pois seus comportamentos podem não ser semelhantes. Por esta razão, vários microrganismos testes são recomendados na análise, tais como bactérias Gram negativas com diversas capacidades metabólicas, como *Pseudomonas aeruginosa*; bactérias do grupo coliforme, como *Escherichia coli*; cocos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*; Gram positivos esporulados, como *Bacillus cereus* ou *Bacillus subtilis*; Leveduras, como *Candida albicans* e fungos filamentosos como *Aspergillus niger* ou *A. flavus* (90).

O teste de desafio pode ser realizado de forma simples, contaminando-se o produto por cada microrganismo individualmente; em *pool*, com a contaminação do produto por todos os microrganismos determinados para o teste ou em

desafios múltiplos, que consistem na reinoculação do produto em intervalos de tempos definidos (89).

Segundo Orth (90), o uso de culturas puras, apesar do tempo despendido, em detrimento das mistas, é mais apropriado, pois permite conhecer as taxas de morte de cada microrganismo e determinar o perfil de resistência para determinada formulação.

Além do teste de eficácia conservante tradicional, existem também métodos rápidos como o de regressão linear e análise acelerada para definição do conservante na formulação. A escolha do método a ser utilizado depende de vários fatores, no entanto, o tempo disponível para a análise é decisivo. O método de regressão linear fornece a taxa de inativação dos microrganismos, que é obtida pelo tempo de redução decimal (valor D), sendo o tempo necessário para matar 90%, ou seja, 1 log dos microrganismos (91). A utilização deste método possibilita redução no tempo de análise de 28 dias no teste de eficácia conservante para 24 horas (92).

Segundo os critérios do *Personal Care Products Council* (93), o conservante será aprovado quando a redução do número de bactérias for maior que 99,9% dentro de sete dias, com contínua redução na duração do teste e a redução do número de fungos filamentosos e leveduriformes for maior que 90% dentro de sete dias, sem qualquer aumento durante todo o tempo de teste.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia antimicrobiana do monoéster de C-8 Xilitol visando sua aplicação como conservante cosmético. Os parâmetros avaliados foram:

- Atividade antimicrobiana, por meio da determinação da concentração inibitória mínima;
- Qualidade microbiológica de uma formulação conservada com o monoéster de C-8 xilitol;
- Eficácia conservante, por meio teste de desafio do sistema conservante;
- Estabilidade físico-química de uma formulação conservada com o monoéster de C-8 Xilitol.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos utilizados

Os microrganismos testes utilizados foram os preconizados pelo Microbiology Guidelines (93) e pelas normas do NCCLS ou CLSI (94, 95, 96), que concede permissão à ANVISA para utilização das metodologias definidas por este órgão. As cepas liofilizadas foram adquiridas na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz e incluem: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

3.2 Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura ágar soja tripticaseína (TSA), caldo soja tripticaseína (TSB), caldo Brain and Heart Infusion (BHI), ambos adquiridos do fabricante Difco®; ágar e caldo de Sabouraud dextrose e caldo Mueller Hinton adquiridos do fabricante Merck®.

3.3 Loção hidratante

A loção hidratante utilizada no teste de desafio conservante foi preparada em escala laboratorial utilizando-se as matérias-primas álcool cetoestearílico (5% p/p), óleo mineral (4% p/p), glicerina (2%p/p), álcool de lanolina (1% p/p), monoéster de C-8 Xilitol (1% p/p) e água purificada (q.s.p 100%).

Tabela 3. Composição da loção hidratante

Componentes	Porcentagem	Função
Àlcool cetoestearílico	5,0	Espessante
Óleo mineral	4,0	Emoliente
Glicerina	2,0	Emoliente
Àlcool de lanolina	1,0	Emoliente
Monoéster de C-8 Xilitol	1,0	Conservante
Àgua deionizada q.s.p	100	Solvente

3.4 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, sendo esterilizados a 121ºC por 15 minutos. Uma quantidade representativa (5%) de placas e tubos dos lotes de meio de cultura utilizados para pesquisa de bactérias foram incubados a 32,5ºC ± 2,5ºC por 24 horas e dos meios utilizados para pesquisa de fungos foram incubados 22,5ºC ± 2,5ºC por 48 horas para verificação de sua esterilidade (97).

Finalizado o período de incubação, os meios de cultura foram avaliados quanto à ausência de microrganismos. Os lotes que apresentaram qualquer crescimento foram descartados.

Após a aprovação no teste de esterilidade, os meios de cultura foram testados quando à fertilidade para avaliação da capacidade e qualidade da promoção do crescimento do meio de cultura ao microrganismo específico e esterilidade. Os meios de cultura caldo e ágar de soja tripticaseína, BHI e Mueller Hinton foram inoculados com as bactérias separadamente e incubados a 32,5ºC ± 2,5ºC por 24 horas. Os meios ágar e caldo de Sabouraud dextrose e o caldo BHI foram inoculados com fungos e incubados a 22,5ºC ± 2,5ºC por 48 horas. Após o

período de incubação, os meios foram verificados quanto ao crescimento/ recuperação dos microrganismos. Os lotes dos meios de cultura que não promoveram o crescimento de microrganismos durante a realização do teste de fertilidade foram descartados.

Após a finalização dos testes de esterilidade e fertilidades dos meios de cultura, os mesmos foram armazenados em geladeira a 4,0ºC ± 0,5ºC.

3.5 Obtenção e conservação dos microrganismos

As cepas liofilizadas foram hidratadas com aproximadamente 0,5mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e transferidas para 5 tubos de ensaio contendo meio de cultura, com auxílio de alça bacteriológica. As bactérias foram semeadas em tubo contendo ágar tripticaseína soja esterilizado e inclinado, e incubadas a 32,5ºC ± 2,5ºC, por 24 horas.

Os fungos foram semeados em tubo contendo ágar Sabouraud esterilizado e inclinado, incubados a 22,5ºC ± 2,5ºC, por 48 horas. Após os períodos de incubação, os tubos contendo os microrganismos foram armazenados em geladeira, a 4.0ºC ± 0,5ºC. Para a realização dos testes de concentração inibitória mínima e de desafio conservante, o repique foi efetuado a partir de um tubo armazenado de cada microrganismo.

3.6 Padronização dos inóculos

A partir de culturas estoques armazenadas em geladeira, as bactérias foram repicadas em estrias na superfície de meio de cultura ágar de soja

tripticaseína inclinado e incubadas a 32,5ºC ± 2,5ºC por 24 horas. Os fungos foram repicados em meio ágar Sabouraud dextrose e incubados a 22,5ºC ± 2,5ºC por 48 horas (*C. albicans*) e por 7 dias para bolores (*A. niger*). A suspensão dos microrganismos foi preparada utilizando-se solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), ajustando a concentração do inóculo para 1,0 x 10^8 UFC/mL, cuja leitura foi realizada no equipamento Densimat®, um fotômetro usado para determinar a densidade óptica de um inóculo bacteriano, fornecendo resultados equivalentes ao padrão da escala de MacFarland.

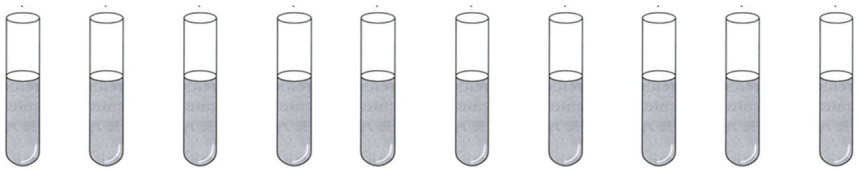
3.7 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima foi determinada através do método de macrodiluição em caldo. Foi preparada uma série de 10 tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura para cada microrganismo testado, sendo o caldo Mueller Hinton utilizado para bactérias e o caldo Sabouraud dextrose utilizado para fungos.

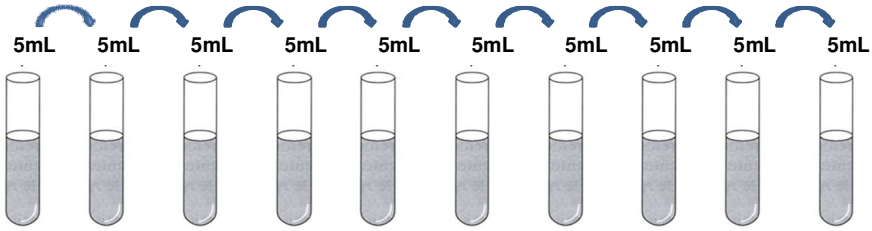
Foram adicionados 5g do monoéster de C-8 Xilitol, previamente solubilizado em butilenoglicol, no tubo 1 da série de cada microrganismo. A solução foi homogeneizada e foram transferidos 5mL do tubo 1 para o tubo 2. Este procedimento (diluição seriada) foi repetido até o tubo 10.

O inóculo padronizado foi diluído em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) de forma a obter uma concentração de 10^5 UFC/mL para bactérias e 10^4 UFC/mL para fungos. A cada tubo de ensaio da série de concentrações foi acrescido 0,1mL do inóculo ajustado. Os tubos com bactérias foram incubados a 32,5ºC ± 2,5ºC

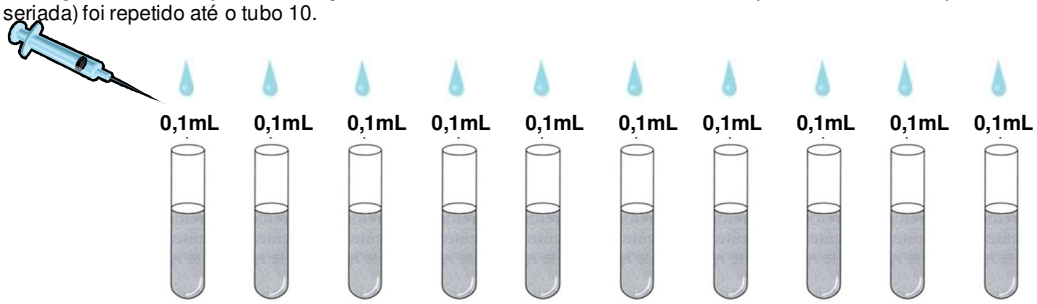
durante 24 horas e os tubos com fungos foram incubados a 22,5ºC ± 2,5ºC, durante o período de 48 horas. Foi utilizado um tubo com meio de cultura e diluente, como controle negativo. Foram obtidas soluções aquosas de padrões secundários de ciprofloxacino e fluconazol (fabricante Sigma®) na concentração de 1,0 mg/mL. A cada experimento as soluções foram desafiadas frente aos microrganismos testados e o resultado foi considerado o controle positivo de atividade antimicrobiana. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.



1. Foi preparada uma série de 10 tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura para cada microrganismo testado, sendo o caldo Mueller Hinton utilizado para bactérias e o caldo Sabouraund dextrose utilizado para fungos.



2. Foram adicionados 5g do monoéster de C-8 Xilitol, previamente solubilizado em butilenoglicol, no tubo 1 da série de cada microrganismo. A solução foi homogeneizada e foram transferidos 5mL do tubo 1 para o tubo 2. Este procedimento (diluição seriada) foi repetido até o tubo 10.



3. O inóculo padronizado foi diluído em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) de forma a obter uma concentração de 10^5 UFC/mL para bactérias e 10^4 UFC/mL para fungos. A cada tubo de ensaio da série de concentrações foi acrescido 0,1mL do inóculo ajustado. Os tubos com bactérias foram incubados a 32,5ºC ± 2,5ºC durante 16-20 horas e os tubos com fungos foram incubados a 22,5ºC ± 2,5ºC, durante o período de 46 a 50 horas.

Figura 6. Determinação da concentração inibitória mínima.

Após o período de Incubação foi realizado o plaqueamento a partir dos tubos que não apresentaram crescimento visível, para verificação quantitativa da

redução do número de microrganismos, retirando-se 1mL de cada tubo e distribuindo-se em placas de petri, às quais adicionou-se meio TSA para avaliação do crescimento de bactérias e o meio ágar Sabouraud dextrose para avaliação do crescimento de fungos, através da técnica *pour plate*. As placas com o meio TSA foram incubadas a 32,5ºC ± 2,5ºC por 48 horas e as placas com ágar Sabouraud dextrose foram incubadas a 22,5ºC ± 2,5ºC por 5 dias.

3.8 Preparo da formulação

As matérias-primas álcool cetoestearílico, óleo mineral, glicerina, álcool de lanolina e monoéster de C-8 Xilitol (fase A), foram adicionadas em um béquer e submetidas a aquecimento a aproximadamente 80-85ºC. Em outro béquer, a água deionizada e a glicerina (fase B) foram aquecidas à mesma temperatura. Em seguida, a fase B foi adicionada sobre a fase A, mantendo-se a temperatura e agitação por aproximadamente 10 minutos. Após este período, a loção hidratante foi resfriada sob agitação.

3.9 Avaliação microbiológica da loção hidratante

Para a avaliação microbiológica da loção hidratante determinou-se a contagem total de microrganismos aeróbios, transferindo-se assepticamente, exatamente 10,0 g da loção hidratante para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. Uma amostra da diluição 1:10 foi submetida à agitação durante 10 minutos. Após a homogeneização, foi pipetado 1,0 mL da amostra para placas de Petri, às quais adicionou-se meio ágar soja tripticaseína (TSA) para avaliação do

crescimento de bactérias e o meio ágar Sabouraud dextrose para avaliação do crescimento de fungos, através da técnica *pour plate*.

As placas para avaliação das bactérias totais foram incubadas a 32,5ºC ± 2,5ºC durante 48 horas e as placas para avaliação dos fungos foram incubadas a 22,5ºC ± 2,5ºC, durante o período de 5 dias. Após este período, foi realizada a contagem do número de microrganismos com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

3.10 Neutralização/Inativação do sistema conservante

A condição de inativação do sistema conservante tem como objetivo validar o método usado no teste de desafio do sistema conservante. A confiabilidade do método usado no teste de desafio do sistema conservante depende da sua capacidade em evitar a interferência do sistema conservante no crescimento dos microrganismos.

Como se trata de um sistema experimental, não havendo, portanto, um sistema de neutralização preconizado, o estudo foi feito verificando-se a inibição do crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. niger* e *C. albicans* em concentrações diferentes das formulações, obtidas a partir de diluições seriadas.

Foi adicionado 1,0 g da loção hidratante a um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), obtendo-se uma diluição 10^{-1}, a partir desta diluição, o procedimento foi repetido até a diluição 10^{-5}. A cada uma das diluições, foi adicionado 1,0 mL da suspensão de microrganismos

previamente padronizada em 10^3 UFC. Os tubos foram agitados mecanicamente e alíquotas de 1,0 mL foram semeadas, em triplicatas, nas placas de Petri contendo meios de cultura.

Para comprovação da eficiência da neutralização dos conservantes, foi realizado um controle positivo, onde 1,0 mL da suspensão de microrganismos foi adicionada em 9,0 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), seguindo o mesmo procedimento descrito acima.

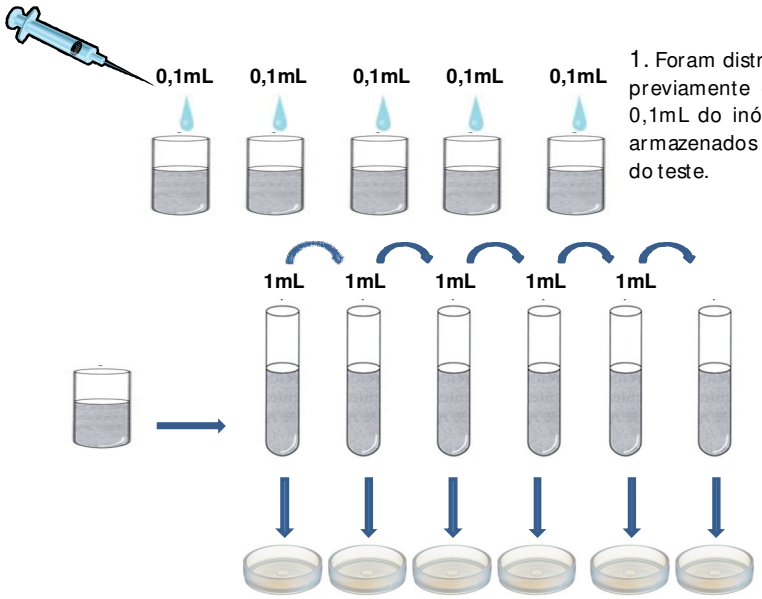
As placas para avaliação das bactérias foram incubadas a 32,5ºC ± 2,5ºC durante 48 horas e as placas para avaliação dos fungos foram incubadas a 22,5ºC ± 2,5ºC, durante o período de 5 dias. Após período de incubação, o número de unidades formadoras de colônias foi determinado.

A porcentagem adotada de recuperação do microrganismo inoculado é de 70%, para comprovação da inativação do sistema conservante e confiabilidade dos resultados, de acordo com a Farmacopéia Americana (97), valores abaixo de 70% não são considerados e indicam que os inativantes e/ou a concentração dos mesmos estão inadequados, devendo ser alterados.

3.11 Teste de desafio do sistema conservante (*Challenge Test*)

Foram distribuídos 20g da loção hidratante em 5 frascos previamente esterilizados, que foram contaminados com 0,1mL do inóculo de cada microrganismo, padronizado em 10^6 UFC/mL para bactérias e 10^5 UFC/mL para fungos. Os Frascos foram homogeneizados e armazenados em temperatura ambiente até a finalização do teste.

Foi retirada uma amostra de aproximadamente 1g de cada frasco contendo o produto inoculado imediatamente após a contaminação do produto (tempo zero). Esta amostra foi adicionada a um tubo de ensaio com 9mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) para obtenção de uma diluição 10^{-1}. Retirou-se 1mL desta diluição e adicionou-se a outro tubo de ensaio com 9mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), obtendo-se uma diluição $10^{-2.}$ O mesmo procedimento foi repetido até a diluição 10^{-5} para as amostras do produto inoculado com fungos e 10^{-6} para as amostras do produto inoculado com bactérias (figura 7).



1. Foram distribuídos 20g da loção hidratante em 5 frascos previamente esterilizados, que foram contaminados com 0,1mL do inóculo padronizado de cada microrganismo e armazenados em temperatura ambiente até a finalização do teste.

2. Foi retirada uma amostra de aproximadamente 1g de cada frasco contendo o produto inoculado imediatamente após a contaminação do produto (tempo zero) e realizada uma diluição seriada.

3. Finalizada a série de diluições, 1mL de cada diluição foi distribuído em placas de petri, às quais adicionou-se meio ágar soja tripticaseína (TSA) para avaliação do crescimento de bactérias e o meio ágar Sabouraund dextrose para avaliação do crescimento de fungos.

Figura 7. Esquema do teste de desafio do sistema conservante.

Finalizada a série de diluições, 1mL de cada diluição foi distribuído em placas de petri, às quais adicionou-se meio TSA) para avaliação do crescimento

de bactérias e o meio ágar Sabouraud dextrose para avaliação do crescimento de fungos, através da técnica *pour plate*.

As placas do produto contaminado por bactérias foram incubadas a 32,5ºC ± 2,5ºC durante 48 horas e as placas do produto contaminado por fungos foram incubadas a 22,5ºC ± 2,5ºC, durante o período de 5 dias. Este procedimento foi repetido em 24 e 48 horas após a contaminação inicial e em 7, 14, 21 e 28 dias, sendo que no 14º dia foi realizada a reinoculação do produto.

Como controle negativo do teste, foi preparado um tubo com diluente e meio de cultura. Para controle positivo do teste, foi preparado um tubo com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), inoculado com a suspensão de microrganismos. Adicionalmente, preparou-se uma loção sem conservantes como parâmetro do estudo.

3.12 Critérios de aceitação

De acordo com os critérios de aceitação adotados pelo CTFA (93), o conservante é considerado eficaz para formulações cosméticas, em geral, se:

Bactérias: redução de pelo menos 99,9% (03 ciclos logarítmicos) da contagem inicial no intervalo de tempo igual a 7 dias sem aumento da carga microbiana até a finalização do teste.

Fungos: redução de pelo menos 90% (01 ciclo logarítmico) da contagem inicial no intervalo de tempo igual a 7 dias sem aumento da carga microbiana até a finalização do teste.

3.13 Avaliação da estabilidade da loção hidratante

A loção hidratante conservada com o monoéster de C-8 Xilitol, após 24 horas de preparo (tempo zero – T0) foi avaliada quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor) e valores de pH. Os resultados obtidos em T0 foram considerados como referência para comparação com as demais avaliações durante o teste de estabilidade.

A loção hidratante, produzida em escala laboratorial foi acondicionada em frasco de vidro transparente, com capacidade nominal de 20 g e procedeu-se ao estudo de estabilidade normal da amostra, com a finalidade de se avaliar o seu comportamento nas seguintes condições: escuro/ temperatura ambiente (ETA), luz/ temperatura ambiente (LTA), estufa a 40ºC (E/40) e geladeira a 5ºC (G/5).

As propriedades consideradas mais relevantes para avaliação da estabilidade foram aparência, cor, odor e pH. Os parâmetros avaliados foram monitorados em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

A aparência e a cor da loção foram verificadas visualmente, o odor foi verificado por meio do método organoléptico e o pH foi determinado utilizando-se o pHmetro (Hanna Instruments 8417), após a diluição da amostra na proporção de 1:10 (p/v) em água destilada, previamente neutralizada (pH 7,0).

3.14 Avaliação estatística

Um método paramétrico de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para a realização da análise estatística seguido do teste Tukey de comparação múltipla.

Foram considerados estatisticamente significativos os resultados cujos valores de P foram menores que 0,05.

RESULTADOS

4.1 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima é definida como a menor concentração de uma formulação que inibe o crescimento microbiano visível *in vitro*. Os resultados para a determinação da concentração inibitória mínima do monoéster de C-8 Xilitol, no teste de diluições, conduziu aos valores demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima do monoéster de C-8 xilitol

Microrganismo	**Atividade entre (% p/p)**
Staphylococcus aureus (ATCC 6538)	1,0 - 1,25
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)	1,0 - 1,50
Escherichia coli (ATCC 25922)	1,0 - 1,25
Candida albicans (ATCC 10231)	1,0 - 1,25
Aspergillus Niger (ATCC 16404)	1,0 - 1,50

Os valores apresentados indicam a faixa da concentração do monoéster de C-8 Xilitol que inibiu totalmente o crescimento do microrganismo, no teste de diluições. Estes resultados mostram que os valores para a inibição do crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* são coincidentes e inferiores aos valores encontrados para *P. aeruginosa* e *A. niger*.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, a técnica de diluição em meio líquido, é mais freqüentemente utilizada quando comparada com o método de difusão em ágar. Esta técnica tem sido mais utilizada para determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos, antissépticos e conservantes (98). Para garantir a eficácia do método empregado, assim como dos meios de cultura

e das cepas de microrganismos utilizados, foi realizado o controle do ensaio coma a utilização dos fármacos Ciprofloxacino e Fluconazol nas mesmas condições do experimento, a fim de validar os resultados encontrados. Conforme tabela 5, os resultados obtidos para todos os microrganismos testados estão em conformidade com a indicação de uso dos antibióticos utilizados.

Tabela 5. Avaliação da sensibilidade antimicrobiana

Microrganismo	**Fármaco**	**Sensilibidade**
Staphylococcus aureus (ATCC 6538)	Ciprofloxacino	Sensível
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)	Ciprofloxacino	Sensível
Escherichia coli (ATCC 25922)	Ciprofloxacino	Sensível
Candida albicans (ATCC 10231)	Fluconazol	Sensível
Aspergillus Niger (ATCC 16404)	Fluconazol	Resistente

Assim, para o desenvolvimento e estudo da formulação selecionou-se a concentração de 1%, sendo essa a menor concentração testada com atividade antimicrobiana, de acordo com o estudo da concentração inibitória mínima.

4.2 Avaliação microbiológica da loção hidratante

Para assegurar a qualidade das preparações para uso tópico é necessário realizar ensaios de controle durante a fabricação e no produto acabado. Características organolépticas, determinação de pH e controle microbiológico, entre outros, fazem parte destes testes (99).

Os resultados obtidos por meio da avalição microbiológica da formulação com o monoéster de C-8 Xilitol na concentração estudada permitiram observar que a contagem do número total de bactérias e de fungos foi inferior a 10 UFC/g.

Esta etapa do estudo torna-se importante para as análises posteriores, envolvendo o teste de desafio do sistema conservante. Resultados positivos de contaminação nesta fase podem inviabilizar a execução das demais etapas.

4.3 Neutralização do sistema conservante

A contagem de microrganismos viáveis em produtos farmacêuticos e cosméticos necessita de completa neutralização da substância ou substâncias presentes que impedem ou prejudiquem o crescimento dos microrganismos (90). Os conservantes, na sua maioria, podem ser quimicamente neutralizados, no momento da análise, mediante adição ao diluente ou nos meios de cultura, dos neutralizantes, ou fisicamente, por meio de diluições sucessivas ou filtração em membrana filtrante (100).

A inativação do sistema conservante se faz importante, pois recupera microrganismos estressados durante o período da análise. Os resultados estão indicados na Tabela 6 frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. niger.*

Tabela 6. Recuperação microbiana após neutralização do sistema conservante

Microrganismo	Recuperação	Controle
Staphylococcus aureus (ATCC 6538)	>70%	>70%
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)	>70%	>70%
Escherichia coli (ATCC 25922)	>70%	>70%
Candida albicans (ATCC 10231)	>70%	>70%
Aspergillus Niger (ATCC 16404)	>70%	>70%

Controle de viabilidade celular: Solução fisiológica estéril (NaCl 0.9%) e microrganismo teste.
Recuperação: O valor indicado representa a média do ensaio realizado em 5 réplicas.

A inativação da atividade antimicrobiana dos Monoéster de C-8 Xilitol foi feita por meio de diluição, pois não são descritos métodos de inativação química para esta molécula na literatura.

Os resultados de recuperação dos microrganismos na condição de neutralização adotada no teste indicam que o controle apresentou a recuperação sempre maior que 70% para todos os microrganismos (tabela 6), comprovando a viabilidade dos microrganismos durante o teste e garantindo que as recuperações menores que 70% eram devidas à condição não adequada para o crescimento dos microrganismos. Ressalta-se que no procedimento da Farmacopéia Americana (97) não é descrita a utilização de um controle, no entanto, para assegurar a validação realizou-se também esse ensaio.

Utilizando a técnica de diluição, foi possível realizar a recuperação dos microrganismos, confirmando a inativação do sistema conservante e garantindo assim confiabilidade nos resultados. Portanto, para o teste de eficácia de conservantes, procedeu-se à diluição das formulações em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e contagem de microrganismos sobreviventes nos períodos estabelecidos.

4.4 Teste de desafio do sistema conservante

Baseando-se nos resultados do teste da concentração inibitória mínima, a loção hidratante utilizada no teste de desafio foi conservada com a concentração de 1% do monoéster de C-8 Xilitol. Foi verificado um rápido declínio na contagem de UFC/g logo nos primeiros tempos avaliados após a contaminação do produto,

para todas as bactérias testadas (tabelas 7, 9 e 11).

Tabela 7. Número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol

Tempo avaliado	**T_0**	**T_{24}**	**T_{48}**	**T_7**	**T_{14}**	**T_{21}**	**T_{28}**
Resultado (UFC/g)	$1,5 \times 10^2$	<10	<10	<10	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$1,9 \times 10^7$	$1,2x\ 10^8$	$3,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
LSC (UFC/g)	$2,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$	$8,3 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24}, T_{48} e T_{72}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.
LSC: Loção hidratante sem conservantes.

Tabela 8. Número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol

Tempo avaliado	**T_0**	**T_{24}**	**T_{48}**	**T_7**	**T_{14}**	**T_{21}**	**T_{28}**
Resultado (UFC/g)	$5,5x10^6$	<10	<10	<10	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$7,3x10^6$	$4,1x10^6$	$4,4x10^5$	$1,2x10^5$	$2,6x10^5$	$1,4x10^5$	$1,6x10^5$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24}, T_{48} e T_{72}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.

A redução do número de microrganismos apresentada nas tabelas (1234) é considerada extremamente significante (P<0,001), quando comparada ao controle positivo e à loção sem conservantes.

Após o sétimo dia de avaliação, o conservante mostrou-se eficaz contra as bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) e Gram positiva (*S. aureus*) testadas, atendendo à especificação de redução de 99,9% do número de células viáveis, estabelecida em compêndios oficiais.

Os resultados obtidos confirmam a ação bactericida do monoéster de C-8 Xilitol, visto que durante o período avaliado, não houve crescimento bacteriano, mesmo após a reinoculação do produto no 14º dia.

Tabela 9. Número de UFC/g de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$5,6 \times 0^6$	$6,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	<10
LSC (UFC/g)	$4,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$6,1 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24}, T_{48} e T_{72}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.
LSC: Loção hidratante sem conservantes.

Tabela 10. Número de UFC/g de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	$3,5x10^6$	$5,1x10^5$	40	<10	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$6,9x10^6$	$8,0x10^6$	$7,2x10^6$	$7,0x10^4$	$3,0x10^4$	$2,2x10^4$	$1,5x10^4$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24}, T_{48} e T_{72}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.

A análise microbiológica dos resultados para as bactérias testadas mostrou redução, em média, de 3 log de UFC/g, no tempo zero, o que é atribuído à presença do monoéster de C-8 Xilitol, porque a mesma não ocorreu na formulação controle.

Tabela 11. Número de UFC/g de *Escherichia coli* (ATCC 25922) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$1,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
LSC (UFC/g)	$4,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24}, T_{48} e T_{72}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.
LSC: Loção hidratante sem conservantes.

Tabela 12. Número de UFC/g de *Escherichia coli* (ATCC 25922) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	$5,0x10^6$	$8,2x10^5$	$5,4x10^2$	47	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$4,5x10^6$	$2,4x10^6$	$2,0x10^6$	$2,9x10^5$	$2,7x10^5$	$2,5x10^5$	$2,1x10^5$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24}, T_{48} e T_{72}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.

O monoéster de C-8 xilitol apresenta melhor eficácia na redução do crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* quando comparado ao Fenoxietanol ($P<0,05$). No teste de desafio do monoéster de C-8 xilitol, a redução de 99,9% no número de microrganismos viáveis para estes microrganismos é observada no tempo zero de avaliação.

As condições de temperatura, pH e aeração em que os testes foram conduzidos, além da grande atividade de água no produto, contribuem para o crescimento microbiano, entretanto, a redução bacteriana é verificada, sendo de fato, atribuída à ação do monoéster de C-8 Xilitol.

O Teste de Eficácia Conservante foi realizado também em formulação controle, sem presença de monoéster de C-8 Xilitol, uma vez que outros componentes, poderiam prejudicar a sobrevivência dos microrganismos, levando a erros na interpretação dos resultados, atribuindo-os equivocadamente à substância em estudo.

Os controles positivos do teste, mantidos nas mesmas condições do produto testado, exceto quanto à disponibilidade de nutrientes, não tiveram redução microbiana significante ao longo do período avaliado (P>0,05), o que comprova que a redução bacteriana observada não estaria sendo promovida por qualquer condição adversa e sim, pelo conservante testado.

Os resultados apresentados para os fungos nas tabelas 13 e 15 indicam que o monoéster de C-8 Xilitol, na concentração utilizada, não apresentou uma ação conservante eficaz frente ao *A. niger*. Observa-se uma significante redução do número de UFC/g para *este* microrganismo, nas primeiras avaliações, porém, ocorre um aumento no número de células viáveis em 21 dias, estando em desacordo com os critérios de aceitação do *The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association* (93).

Ainda não há estudos sobre a eficácia antimicrobiana do monoéster de C-8 xilitol. Sabe-se, porém, que há uma grande preocupação quanto ao uso de conservantes que têm ação sobre organismos eucariotos, como os fungos, pois a probabilidade destes conservantes desencadearem efeitos tóxicos em humanos é extremamente maior que aqueles que têm ação sobre células procariotas (101).

Tabela 13. Número de UFC/g de *Candida albicans* (ATCC 10231) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	$8,0 \times 10^3$	<10	<10	<10	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
LSC (UFC/g)	$7,5 \times 10^4$	$5,6 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24} e T_{48} : Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.
LSC: Loção hidratante sem conservantes.

Tabela 14. Número de UFC/g de *Candida albicans* (ATCC 10231) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	$7,5x10^5$	$4,5x10^5$	$3,8x10^5$	$4,0x10^5$	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$6,7x10^5$	$4,7x10^5$	$3,0x10^5$	$3,1x10^5$	$1,9 x10^5$	$9,4x10^4$	$5,0x10^4$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24} e T_{48}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.

Quando comparado ao Fenoxietanol, o monoéster de C-8 xilitol demonstra maior eficácia frente à *C. albicans,* pois este conservante não apresenta bom desempenho em relação aos fungos.

Conforme observado na tabela 15, os resultados obtidos na avaliação do monoéster de C-8 xilitol frente ao *A. niger* não são estatisticamente signicativos (P>0,05) quando comparados aos resultados obtidos no controle positivo do teste. Como já era esperado, o mesmo ocorre na avaliação do Fenoxietanol (tabela 16).

Tabela 15. Número de UFC/g de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 xilitol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	$2,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$	$9,2 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$4,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$5,8 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
LSC (UFC/g)	$3,0 \times 10^4$	$5,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$9,6 \times 10^8$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24} e T_{48}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.
LSC: Loção hidratante sem conservantes.

Tabela 16. Número de UFC/g de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) em loção hidratante com 1% de Fenoxietanol

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	$7,5x10^5$	$5,6x10^5$	$1,8x10^5$	$1,5x10^5$	$6,2x10^4$	$6,0x10^4$	$2,0x10^4$
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$3,9x10^5$	$3,0x10^5$	$3,1x10^5$	$1,9x10^5$	$1,0x10^5$	$1,1x10^5$	$1,0x10^5$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24} e T_{48}: Contagem realizada em 24 e 48 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.

Considerando que a redução da carga microbiana para o *A. niger* não atendeu os critérios de aceitação do CTFA, uma outra loção foi preparada utilizando-se a concentração de 1 % do monoéster de C-8 Xilitol e ajustando-se o seu pH de 5,5 para 7,0. Os resultados podem ser observados na tabela 17.

Normalmente, a única maneira de controlar o crescimento microbiano é utilizando biocidas e conservantes. Entretanto, parametros físico-químicos podem interferir no crescimento dos microrganismos. De acordo com Griffin (102), o valor de pH ideal para o desenvolvimento dos fungos varia entre 4,0 e 6,0. Os valores apropriados à atividade das cepas de *Aspergillus* são aqueles próximos de 4,0 e

5,0 (103). Os resultados demonstrados na tabela 17 são estatisticamente significativos (P<0,05) e confirmam que o pH 7,0 fornece um ambiente desfavorável ao crescimento de *A. niger*, potencializando a atividade antimicrobiana do monoéster de C-8 Xilitol.

Tabela 17. Número de UFC/g de Aspergillus niger (ATCC 16404) em loção hidratante com 1% do monoéster de C-8 Xilitol (pH=7,0)

Tempo avaliado	T_0	T_{24}	T_{48}	T_7	T_{14}	T_{21}	T_{28}
Resultado (UFC/g)	$5,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	<10	<10	<10
C (-) (UFC/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C (+) (UFC/g)	$1,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$
LSC (UFC/g)	$4,2 \times 10^6$	$8,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$

T_0: Contagem realizada imediatamente após a inoculação.
T_{24} e T_{48}: Contagem realizada em 24, 48 e 72 horas.
T_7, T_{14}, T_{21} e T_{28}: Contagem realizada em 7, 14, 21 e 28 dias.
C (-): Controle negativo.
C (+): Controle positivo.
LSC: Loção hidratante sem conservantes.

Não existem estudos sobre a eficácia antimicrobiana de monoéster C-8 xilitol. No entanto, os resultados indicam que monoester de C-8 Xilitol pode ser indicado como conservante cosmético, uma vez que reduziu a carga de microrganismos viáveis na loção hidratante testada, garantindo a proteção contra a contaminação microbiana.

4.5 Avaliação da estabilidade da loção hidratante

O teste de estabilidade tem como finalidade avaliar o comportamento dos produtos que se alteram com o tempo, por influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como: a temperatura, a umidade e a luz. O estudo da estabilidade

de produtos cosméticos possibilita verificar o grau de estabilidade relativa do produto em diversas condições, desde produção até validade. Em todas as condições de estudo avaliadas, não foram observadas alterações significativas de pH durante o tempo de armazenamento. Todos os valores obtidos estão próximos do valor de pH verificado no tempo zero (T0). A figura 8 apresenta os valores de pH obtidos durante o estudo de estabilidade.

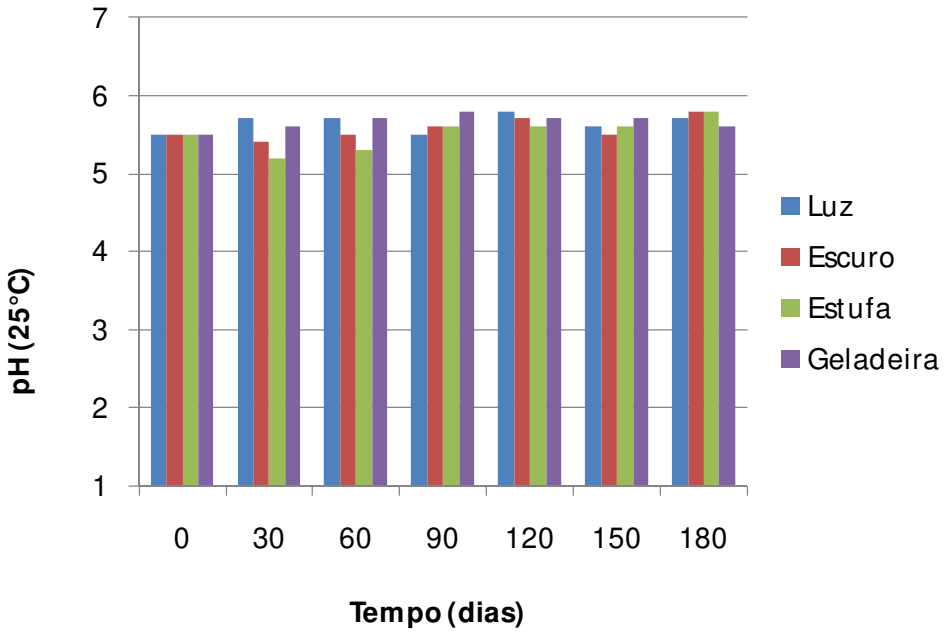


Figura 8. Avaliação de pH da loção hidratante testada durante o estudo de estabilidade.

Os resultados da avaliação dos parâmetros de aparência, cor e odor estão apresentados na tabela 18. A formulação avaliada apresentou coloração branca inicialmente, variando entre branco e levemente amarelada, durante o período de estudo. Esta observação de leve escurecimento da amostra está de acordo com estudos de estabilidade citados na literatura, onde o tempo de armazenamento propicia modificações nas características organolépticas das formulações (104).

A formulação não continha nenhuma essência/ fragrância, assim o odor da formulação, classificado inicialmente como característico, em função das matérias-primas utilizadas, permaneceu inalterado durante todo o período de avaliação.

Em relação à aparência, a formulação manteve sua característica de líquido levemente viscoso a viscoso durante o estudo, apresentando precipitado na condição de geladeira. Embora o precipitado seja uma característica indesejável em qualquer formulação, o mesmo se dissolvia facilmente apenas com homogeneização.

As variações no aspecto são aceitáveis nas condições de estufa e geladeira. A cor e o odor do produto devem se manter estáveis durante os primeiros 15 dias de avaliação, permitindo-se pequenas variações após este tempo.

A loção hidratante é constituída por duas fases distintas, uma de natureza aquosa e outra oleosa, estabilizada pela presença de um terceiro componente, o tensoativo emulsificante, álcool cetoestearílico. A grande vantagem deste tipo de preparação é a possibilidade de incorporar ativos hidrossolúveis e lipossolúveis sem perda de estabilidade e/ou modificação em suas características físicas finais (105).

As características organolépticas (aparência, cor e odor) da formulação, não foram alteradas com a incorporação do monoéster de C-8 Xilitol, o que já era esperado, pois a mesma não apresentava odor perceptível e, sua coloração branca, não provocaria alteração, a menos que alguma interação entre os componentes da formulação ocorresse.

Tabela 18. Estudo de Estabilidade da loção hidratante com 1% de Monoéster de C-8 Xilitol

	Parâmetro	LTA	ETA	E40	G5
TEMPO ZERO	Aparência	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso
	Cor	Branco	Branco	Branco	Branco
	Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
30 DIAS	Aparência	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Presença de precipitado
	Cor	Branco	Branco	Branco	Branco
	Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
60 DIAS	Aparência	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Presença de precipitado
	Cor	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado
	Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
90 DIAS	Aparência	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Presença de precipitado
	Cor	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado
	Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
120 DIAS	Aparência	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Presença de precipitado
	Cor	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado
	Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
150 DIAS	Aparência	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Presença de precipitado
	Cor	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado
	Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
180 DIAS	Aparência	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Líquido levemente viscoso a viscoso	Presença de precipitado
	Cor	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado	Branco a levemente amarelado
	Odor	Característico	Característico	Característico	Característico

LTA: Luz à temperatura ambiente
ETA: Escuro à Temperatura ambiente
E40: Estufa a 4ºC
G5: Geladeira a 5°C

Segundo Brannan (1997), a composição da formulação exerce grande influência na sua estabilidade microbiológica. Diferentes componentes podem potencializar ou diminuir a ação do conservante ou sistema conservante. Portanto, a formulação estudada foi preparada com componentes muito utilizados e sem adição de ativos cosméticos, pois a presença de outras substâncias poderia interagir com o monoéster de C-8 Xilitol. Esta possível interação entre o monoéster de C-8 Xilitol e substâncias rotineiramente utilizadas no preparo de formulações cosméticas, poderia dificultar a interpretação dos resultados, uma vez que ainda não foi referida na literatura.

DISCUSSÃO

No século passado, a descoberta de substâncias antimicrobianas revolucionou a saúde pública mundial, evitou mortes, diminuiu infecções e contaminações oriundas do meio ambiente, alimentos, medicamentos e cosméticos. A indústria cosmética, preocupada com a possibilidade de fornecer produtos contaminados ao consumidor, introduziu o uso de conservantes em produtos cosméticos (106).

Os índices de contaminações microbianas em produtos farmacêuticos e cosméticos caíram drasticamente; no entanto, os índices de sensibilizações e reações alérgicas provocadas pelos produtos cresceram, em virtude da incorporação de substância com finalidade de garantir a qualidade do produto e segurança do usuário, o conservante.

De acordo com Giovanni *et al*. (21), a indústria cosmética utiliza cerca de 13.000 ingredientes, que correspondem a mais de 30.000 diferentes denominações comerciais. Recentemente, outro importante aspecto tem sido considerado: o uso dos produtos cosméticos pode estar associado a reações adversas.

Entre as reações adversas a cosméticos, as de aplicação tópica estão relacionadas à irritabilidade, coceiras, dermatites, entre outras, enquanto a ação sistêmica pode desencadear dor de cabeça, náusea, tontura, dispnéia e vômitos. Darbre (107).

Em função das reações adversas, pesquisadores têm buscado descobrir outras substâncias com atividade antimicrobiana, sem causar sensibilizações

no usuário, sejam extraídas de ativos vegetais ou de outras fontes (108, 109).

Conservantes são os ingredientes usados para limitar o crescimento microbiano, exercendo efeitos adversos sobre vários processos biológicos e celulares. Embora estes efeitos sejam úteis para proteger um produto da contaminação microbiana, é importante que os formuladores considerem a exposição dos consumidores a esses materiais, visando minimizar os riscos de toxicidade (27).

Os microbiologistas enfrentam novos desafios, tais como a necessidade de desenvolver formulações que sejam menos agressivas aos consumidores e ao mesmo tempo bem protegida contra a contaminação microbiana. As tendências atuais incluem a investigação sobre novas moléculas com força biocida e compatibilidade toxicológica (110).

Durante a fase inicial da pesquisa, visando definir substância dotada de atividade antimicrobiana, o monoéster de C-8 Xilitol foi escolhido para o desenvolvimento do trabalho, para verificar se sua atividade *in vitro* seria eficiente para utilizá-la como conservante em preparações cosméticas.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância em estudo necessária para inibir o crescimento do microrganismo em teste; esse valor é conhecido como concentração inibitória mínima (CIM). Atualmente existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana, os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (81).

Não existe um método padronizado para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de substâncias naturais ou semi-sintéticas. Como alguns fatores, como por exemplo, a técnica aplicada, os microrganismos testados e a cepa utilizada no teste, a origem da substância e a quantidade testada, a forma para expressar os resultados de testes antimicrobianos destas substâncias também não está padronizada.

Neste trabalho, empregou-se a técnica de diluição em meio líquido para determinação da concentração inibitória mínima, considerando a relação entre a proporção de maior ou menor crescimento microbiano, conduzindo à concentração requerida da substância em estudo para inibir o crescimento microbiano. A avaliação da concentração inibitória mínima do monoéster de C-8 Xilitol foi comparada frente a padrões biológicos de referência, Ciprofloxacino e Fluconazol. O emprego de meio líquido e o parâmetro de resposta apresentaram como vantagens a rapidez, facilidade operacional, medida objetiva, ausência de efeitos de difusão e exatidão (9).

As preparações com composição complexa como medicamentos e cosméticos constituem fonte rica em nutrientes para o crescimento de microrganismos. Grande parte dos ensaios para avaliação de qualidade é comum a todas as preparações, e dentre eles, merece destacar a importância do controle microbiológico. Foi realizada a contagem total do número de microrganismos viáveis (bactéria e fungos) para a formulação desenvolvida. Os resultados obtidos, inferiores a 10 UFC/g, indicam as boas práticas adotadas na manipulação e

procesamento das matérias-primas utilizadas na formulação. O controle microbiológico prévio é imprescindível para assegurar o consumo de produtos de alta qualidade, essencialmente livres de microrganismos que podem ser prejudiciais à saúde do consumidor, bem como garantir uma preparação adequada com a finalidade de se evitar perdas desnecessárias (4).

Para produtos cosméticos é permitido nível limite de microrganismos viáveis, mas restringe-se, porém, a ausência de microrganismos patogênicos específicos. Assim, a formulação deve ser criteriosamente estudada quanto à eficácia do sistema conservante do produto, que só pode ser garantida através do teste de eficácia ou desafio. Para garantir que o teste de desafio seja realizado de forma adequada, há a necessidade de validação do teste para cada produto. De acordo com a Farmacopéia Americana (97), o conceito de validação para os métodos microbiológicos é a recuperação dos microrganismos durante o teste, diferente dos métodos químicos e físico-químicos que consideram os parâmetros de especificidade/seletividade, intervalo de curva de calibração, linearidade, limite de quantificação e detecção, exatidão, precisão e robustez.

A validação tem como finalidade garantir a neutralização ou inativação da atividade antimicrobiana do conservante na contagem de microrganismos viáveis, utilizando a técnica por semeadura em profundidade ou "*Pour Plate*". O teste visa a seleção das condições de neutralização do conservante durante o período de incubação das placas contendo o produto, os microrganismos e os meios de cultura utilizados no teste de eficácia de conservantes.

A escolha da condição de neutralização ou sistema de recuperação dos microrganismos deve ser adequada, pois influencia a acuidade e sensibilidade dos

dados experimentais a serem obtidas pelo uso da técnica de semeadura da amostra diluída em meio sólido. Os compêndios oficiais apresentam recomendações, mas o método e a escolha da condição de neutralização do sistema conservante são de responsabilidade do laboratório produtor. Para cada fórmula há uma condição mais adequada, isto é, ação neutralizante rápida não comprometendo o crescimento dos microrganismos presentes na amostra.

A porcentagem adotada de recuperação do microrganismo inoculado é de 70%, para comprovação da inativação do sistema conservante e confiabilidade nos resultados, de acordo com a Farmacopéia Americana (97). Os valores abaixo de 70% não são considerados e indicam que os inativantes e/ou a concentração dos mesmos estão inadequados, devendo ser alterados.

O teste de eficácia do sistema conservnate foi realizado, concomitantemente com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) inoculada com a mesma carga microbiana das amostras teste.

A suspensão foi considerada controle e teve como intuito a verificação da viabilidade dos microrganismos desafiantes durante os 28 dias do teste. Nesta consideração, verificou-se que as bactérias *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* apresentaram-se viáveis durante todo o teste, assim como os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* que se também mantiveram adequados no decorrer do tempo de avaliação. Entretanto, houve decaimento do número de microrganismos sobreviventes no decorrer do teste.

Em se tratando de manter o microrganismo em solução fisiológica, esse comportamento pode ser considerado normal uma vez que o meio de cultivo é pobre em nutrientes, ocorrendo uma menor multiplicação celular.

Outro controle empregado no teste foi uma formulação livre de conservantes, inoculada com a mesma carga microbiana das amostras teste. Em relação a este controle, observou-se um aumento do número de microrganismos sobreviventes no decorrer do teste, pois, ao contrário da solução fisiológica, este meio de cultivo propiciava o crescimento microbiano. O aumento também pode ser explicado pela adaptação dos microrganismos ao meio.

No trabalho proposto, para o preparo da formulação foram empregadas matérias-primas que constituem rotina no desenvolvimento de preparações de uso tópico. Procurou-se evitar a inclusão de qualquer material que conhecidamente possuísse atividade antimicrobiana.

Buscou-se também, o preparo de uma formulação com elevada concentração de água, pois um fator essencial para o crescimento microbiano é a atividade de água, que representa a quantidade de água livre, disponível para ser utilizada pelos microrganismos. Muitas vezes a água presente pode estar indisponível, a exemplo da água de cristalização ou de hidratação. Materiais hidrofílicos, como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC ou hipromelose) podem incorporar água, tornando-a indisponível aos microrganismos (9, 90).

Produtos com baixo teor de água, assim como óleos, ceras e parafinas apresentam baixo risco de contaminação microbiana. Da mesma forma, álcoois, ésteres e ácidos graxos são matérias-primas pouco prováveis de apresentarem contaminação, mesmo porque algumas apresentam atividade antimicrobiana (90).

Todas as bactérias testadas apresentaram uma rápida redução no número de organismos sobreviventes, inclusive a *P. aeruginosa*, um patógeno oportunista

que vive ubiqüiamente, sendo considerado um grande problema da indústria farmacêutica e cosmética por se tratar de um microrganismo de veiculação hídrica com facilidade de adaptação a ambientes estressantes (111). Esta adaptação sugere que os mesmos têm estratégias moduladoras do metabolismo, permitindo sobrevivência em condições desfavoráveis (90).

O teste de desafio é um teste demorado e mais laborioso, mas avalia o comportamento do conservante em uma base cosmética, após uma contaminação proposital, conduzindo à precisão de resultados. De acordo com Corbert (112), umas das razões para a sua longa duração seria a demonstração do ressurgimento de alguns microrganismos com esta característica. Em seus estudos, 2% das fórmulas avaliadas pelo teste de desafio exibiram o fenômeno descrito, sendo que destas, mais da metade eram bactérias Gram negativas. O aparente ressurgimento dos microrganismos pode ser justificado pela não sensibilidade dos métodos de contagem empregados.

Houlsby (113) observou que o ressurgimento dos microrganismos ocorre em formulações cuja concentração do conservante está muito próxima da concentração inibitória mínima. Este autor relata ainda que os microrganismos sobreviventes podem proliferar utilizando nutrientes provenientes da lise das bactérias susceptíveis.

Vários trabalhos têm pesquisado novos conservantes e têm sido direcionados à obtenção de compostos de origem natural como a lactoferrina bovina, por exemplo, pesquisada por Stevanato (114). A pesquisa de novos conservantes não busca apenas a substituição dos conservantes já existentes por

produtos de origem natural, mas também a descoberta de novos compostos que sejam ativos contra microrganismos já resistentes aos conservantes utilizados no mercado (5).

Para garantir a estabilidade de uma loção ou sistema emulsificado, testes de estabilidade física, química e microbiológica são necessários. Submeter sistemas emulsificados às diferentes condições de temperatura são as condições rápidas mais freqüentemente utilizadas para avaliar o comportamento de produtos cosméticos (115).

O estudo de estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições que o produto pode estar sujeito, desde sua fabricação até o final de sua validade. Para disponibilizar esses produtos para o consumo, a avaliação da estabilidade é requisito fundamental à qualidade e segurança dos mesmos. O estudo de Estabilidade Normal por 90 dias fornece dados para prever a estabilidade do produto, estimar o prazo de validade e a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (116).

Durante a incorporação do monoéster de C-8 Xilitol à formulação, as características macroscópicas das formulações, como aparência, cor e odor, não foram alteradas. Após a incorporação, sem alteração das características macroscópicas, a avaliação preliminar da estabilidade foi realizada, confirmando o êxito da pesquisa; caso contrário, sua utilização como conservante, seria inviabilizada.

A ausência de alterações no aspecto macroscópico é um bom indicador da estabilidade, uma vez que problemas de aplicação, como alteração de cor, odor, e separação de fases são muito comuns.

Em continuidade aos estudos de estabilidade observou-se que pH, da formulação não apresentou diferenças significativas. A análise da estabilidade física, também é importante, pois, segundo Almeida e Bahia (117), a formulação deve apresentar comportamento reológico adequado a sua aplicação.

A formulação manteve-se estável ao longo do tempo estudado, sem qualquer oscilação significativa nos resultados, em todas as condições adotadas (temperatura ambiente, 40ºC e 5°C).

Em função da diversidade científica e dos resultados observados neste trabalho, em estudos posteriores seria importante, avaliar o sinergismo do monoéster de C-8 Xilitol com outras substâncias antimicrobianas, além da sua segurança.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nas condições em que os testes foram conduzidos, podemos concluir que o monoéster de C-8 Xilitol, apresenta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, atende aos requisitos de uma substância dotada de atividade conservante e mostra-se estável quando utilizado em loção hidratante, podendo ser considerado uma alternativa conservante para produtos cosméticos.

Concluímos ainda, com base nos resultados obtidos no presente trabalho, seguramente, mantêm-se os caminhos para novas investigações científicas com monoéster de C-8 Xilitol, especialmente aqueles visando a associações com outros conservantes, buscando sinergismo entre eles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blume SI, Castelli RM, Ribeiro GA. Qualidade Microbiológica de Cosméticos Comercializados em Lojas Populares da Cidade de Pelotas/S. Anais do XXVI Congresso de iniciação científica FAEM – Pelotas – 27 a 29 de novembro de 2002.

2. Anvisa – Resolução Nº 79, de 28 de agosto de 2000 [on line]. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br - Acesso em: 03 ago. 2009.

3. ABIHPEC - Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticas – Publicações. Disponível em: http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado.php Acesso em: 09 set. 2010.

4. Cordeiro CF. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos e cosméticos. Disponível em http://propesq.ufjf.br/seminario/CDSEMINARIO2003/ grad/ resumos/proj130.htm Acesso em: 01 jul. 2009.

5. Schueller R, Romanowski P. Iniciação à química cosmética – Volume 3. São Paulo: Tecnopress, 2002.

6. Croshaw B. Preservatives for cosmetics and toiletries, J. Soc. Cosmet. Chem., 1977; 28 (1) 3-16.

7. Reid FR, Wood TO. Pseudomonas corneal ulcer: the causative role of contaminated eye cosmetics. Arch Ophthalmol 1979; 97: 1640-1641.

8. Herrera AG. Microbiological analysis of cosmetics. Methods Mol. Biol. 2004; 268:293-5.

9. Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu, 2003.

10. Orth DS. Avaliação do risco microbiológico de matérias-primas. Cosmetics & Toiletries 2001; 13: 68-69.

11. Rodford R. Safety and evaluation of preservatives. Int J Cosm Sci 1997; 19: 281-290.

12. Morse LJ, Williams HL, Grenn Jr FP, Eldridge EE, Rotta JR. Septicemia due to *Klebsiella pneumoniae* originating from a hand-cream dispenser. New Engl J Med 1967; 277: 472-473.

13. Markowetz, A. New aspects in the preservation of cosmetics. Cosmetics 2002; 128: 20-24.

14. Fraga DFT. Preservação de cosméticos. Cosmetics & Toiletries 1999; 11 (2), p. 49-53.

15. Nicoletti MA, Orsine EMA, Bou Chacra NA. Sistemas conservantes em formulações cosméticas. Cosmetics & Toiletries 1997; 9(3): 28.

16. Rebello T. Boas Práticas – Por que preservar?. Cosmetics & Toiletries 1999 (a); 11(2): 26.

17. Penna C, Marino S, Vivot E *et al*. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. Journal of Ethnopharmacology 2001; 77: 37-40.

18. Ahearn DG, Wilson LA. Developments in industrial microbiology, v. 17, New York: Plenum Press, 1976; p. 23.

19. Council Directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (76/768/EEC).

20. Anvisa – Resolução Nº 481, de 23 de setembro de 1999 [on line]. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br - Acesso em: 03 ago. 2009.

21. Giovanni CD *et al*. Cosmetovigilance survey: are cosmetics considered safe by consumers? Pharmacological Research 2006; 53: 16-21.

22. Calixto JB. Bioterapia: a diversidade biológica na vida da indústria farmacêutica. Ciênc. Hoje 2000; 28 (167) 36-43.

23. Oliveira AM, Caliri CM, Regasini LO *et. al*. Evaluation of micronuclei frequency in *Tradescantia pallida* pollen mother cells treated with ethanolic extracts isolated from *Cryptocarya mandioccana*, *Cryptocarya moschata* and *Pterogyne nitens*. Rev. Bras. Toxicol., 2008, *in press*.

24. Hasan T, Rantanen T, Alanko K *et al*. Patch test reactions to cosmetic allergens in 1995-1997 and 2000-2002 in Finland – a multicentre study. Cont Derm 2005; 53: 40-45.

25. Steinberg D. Preservatives for cosmetics. 2ª ed. Allure Pub Corp. Carol Stream, IL, 2006.

26. Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. Dermatol Ther 2004; 17: 251-263.

27. Boyat A, Akyol A, Gurgey E. Contact sensitivity to preservatives in Turkey. Cont Dermat 2005; 52: 329-332.

28. Chapman JS, Diehl MA, Fearnside KB. Preservative tolerance and resistance. Int J Cosm Sci 1998; 20: 31-39.

29. Flyvholm MA. Preservatives in registered chemical products. Cont Derm 2005; 53: 27-32.

30. Goossens A, Claes L, Drieghe J *et al*. Antimicrobials: preservatives, antiseptics and disinfectants. Cont derm 1997; 39: 133-134.

31. Jong CT, Statham BN, Green CM *et al*. Contact sensitivity to preservatives in the UK, 2004-2005: results of multicentre study. Cont Derm 2007; 57: 165-168.

32. Lee E, An S, Choi D, *et al*. Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives. Cont Dermat 2007; 56: 131-136.

33. Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch PJ. Patch testing with preservatyives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicenter study. Brit J Dermatol 1998; 138: 467-476.

34. Wilkinson JD, Shaw S, Andersen KE *et al*. Monitoring levels of preservative sensitivity in Europe. Cont Derm 2002; 46: 207-210.

35. Taub SJ. Contaminated cosmetic as cause of eye infections. Eye ear nose throat mon. 1975; 54 (2): 81-82.

36. Brown LH, Ronald MD, Brancaccio RR. The cosmetic clinic: cosmetics and allergies. Skin Ageing 2002; 10: 29-20.

37. De Groot AC, Baar TJM, Terpstra H, Weyland JM. Contact allergy to moist toilet paper. Cont Dermat 1991; 24: 135-136.

38. Soni MG. et al. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. Food and Chemical Toxicology 2002; 40: 1335-1373.

39. Davis KA, Guenther L, Wexler DM. Paraben sensitivity. Can J Dermatol 1992; 4: 198-201.

40. Fisher AA. The paraben paradoxes. Cutis 1973; 12: 830-831.

41. Herbert C, Rietschel RL. Formaldehyde and formaldehyde releasers: how much avoidance of cross-reacting agents is required? Cont Dermat 2004; 50: 371-373.

42. Jordan WP, Sherman WT, King SE. Threshold responses in formaldehyde-sensitive subjects. J Am Acad Dermatol 1979; 1: 44-48.

43. Kantor GR, Taylor JS, Ratz JL, Evey PL. Acute allergic contact dermatitis from diazolidinyl urea (Germall II) in a hair gel. J Am Acad Dermatol 1985; 13: 116-119.

44. Storrs FJ, Bell DE. Allergic contact dermatitis to 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol in a hydrophilic ointment. J Am Acad Dermatol 1983; 8: 157-170.

45. Liebert MA. Final report on the safety assessment of DMDM hydantoin. J Am Coll Toxicol 1988a; 7: 245-277.

46. Basketter DA, Rodford R, Kimber I *et al*. Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides. Cont Dermat 1999; 40: 150-154.

47. Fewings J, Menné T. An update of the risk assessment for methylchloroisothiazolinone (MCI/MI) with focus on rinse-off products. Cont Dermat 1999; 41: 1-13.

48. Fitzgerald KA., Davis A, Russell AD. Mechanism of action of chlorhexidine diacetate and phenoxyethanol singly and in combination against gram-negative bacteria. Microbios 1992; 70: 215-230.

49. Lowe I, Southern J. The antimicrobial activity of phenoxyethanol in vaccines. Lett Appl Microbiol 1994; 18: 115-116.

50. Lovell CR, White IR, Boyle J. Contact dermatitis from phenoxyethanol in aqueous cream BP. Contact Dermatitis 1984 ;11: 187.

51. Anvisa – RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001 [on line]. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br - Acesso em: 03 ago. 2009.

52. O´Neil MJ, Smith A, Heckelman PE *et al*. The Merck Index, 13° ed. Merck & Co Inc, NJ. 2001; p. 1303.

53. Marks JG, DeLeo VA. Preservatives and vehicles. In: Contact and occupational dermatology. St. Louis, MO: Mosby, 1997: 133-160.

54. Zachariae C, Rastogi S, Devantier C, *et al*. Methyl dibromoglutaronitrile: clinical experience and exposure-based risk assessment. Contact Dermatitis 2003; 48: 150-154.

55. Badreshia S, Marks JG. Iodopropynyl butylcarbamate. Am J Cont Dermat 2002; 13: 77-79.

56. Pazzaglia M, Tosti A. Allergic contact dermatitis from 3-iodo-2-propynyl-butylcarbamate in a cosametic cream. Cont Derm 2001; 44: 276-278.

57. Carvalho Jr PM, Rodrigues RFO, Sawaya ACHF *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. J Ethnopharmacol 2004; 95: 297-301.

58. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 564-582.

59. Leite SP, Vieira JRC, Medeiros PL *et al*. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. eCAM DOI 10.1093/ecam/ne1010, 2006.

60. Maccioni AM, Anchisi C, Sanna A *et al*. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. Int J Cosm Sci 2002; 24: 53-59.

61. Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I *et al*. Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. J Appl Microbiol 2004; 97: 395-401.

62. Rosa MSS, Mendonça Filho RR, Rizzo HR, *et al*. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Cróton cajucara*. Antimicr Agent Chemother 2003; 47: 1895-190.

63. Aspres N, Freeman S. Predictive testing for irritancy and allergenicity of tea tree oil in normal human subjects. Exogenous Dermatol 2003; 2: 258-261.

64. Crawford GH, Katz KA, Ellis E *et al*. Use of aromatherapy products and increased risk of hand dermatitis in massage therapists. Arch Dermatol 2004; 140: 991-996.

65. Kabara JJ, Orth DS (eds). Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: principles and practice. Cosmetic Science and Technology Series, volume16. CRC Press, New York, 1997; p. 79-85.

66. Tsuchido T, Ahn YH, Takano M. Lysis of *Bacillus subtilis* cells by glycerol and sucrose esters of fatty acids. Appl Envir Microbiol 1987; 53: 505-508.

67. Lerk PC, Sucker H. The effect of sucrose laurate and propyl 4-hydroxy-benzoate combinations on microbial growth. I: Growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in trypticase soya broth (TSB) medium. Eur J Pharm Biopharm 1993; 39: 120-127.

68. Wang YM, Van-Eys J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. Ann Rev Nutr 1981; 1: 437-475.

69. Kontiokari T, Uhari M, Koskela M. Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 563-565.

70. Bar A. Xylitol. In: O'Brein Nabors, L, Gelardi RC. *Alternative Sweeteners*. 2. ed., New York: Marcel Dekkor Inc. 1991; 349-379.

71. Han SJ, Jeong SY, Nam YJ *et al*. Xylitol inhibits inflammatory cytokine expression induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis.* Clin Diag Lab Immunol 2005; 12: 1285-1291.

72. Kontiokari T, Uhari M, Koskela M. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1820-1823.

73. Trahan L, Bareil M, Gauthier L, *et al*. Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. Caries Res 1995; 19: 53-63.

74. Mussatto SI, Roberto IC. Xilitol: Edulcorante com Efeitos Benéficos para a Saúde Humana. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2002; 38: 401-413.

75. Ferreira AS. Barbosa NR, Silva, SS. In vivo xylitol primary dermal irritation and phototoxicity evaluation. Acta Farmaceutica Bonaerense 2009; 28: 192-195.

76. Tapiainen T, Kontiokari T, Sammalkivi L *et al*. Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 166-169.

77. Zarif L, Greiner J, Pace S, Riess JG. Synthesis of perfluoroalkylated xylitol ethers and esters: new surfactants for biomedical uses. J Med Chem 1990; 33: 1262-1269.

78. Lima EO, Guerra MFL, Silva MG. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). Rev. Bras. Farm 2000; 81 (3): 95 - 97.

79. Sanches ACC. Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos 2004. p. 61 – 63, 167 - 168. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2004.

80. Migliato KF. *Syzygium cumini* (L.) Skeels – jambolão: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. 2005, 179 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

81. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000. 750p.

82. Barry AL, Thornsberry C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. Manual of clinical microbiology. 5ª ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. Cap. 111, 1117p.

83. Collins CH. Antimicrobial susceptibility tests. In: Microbiological methods. 7.ed. Oxford: Butterworth-Hunemann, 1995, 178p.

84. Barbour EK, Al Sharif M, Sagherian VK *et al*. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol**.,** 2004; 93: 1-7.

85. Springfield EP, Amabeoku G, Weitz F *et al*. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. Phytomedicine 2003; 10: 434-439.

86. Sahm DF, Washington II JA. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL *et al*. Manual of clinical

microbiology. 5ª ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. Cap. 110, 1105p.

87. Karaman İ, Şahin F, Güllüce M *et al*. Antimicrobial activity of aquous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. Journal of Ethnopharmacology 2003; 85: 231-235.

88. Packer JF, Da Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev. Bras. Farmacogn. 2007; 17(1): 102-107.

89. Russel AD. Challenge testing: Principles and practice. I Int J Cosm Sci 2003; 25: 147-153.

90. Orth D. Handbook of cosmetic microbiology. New York, Marcel Dekker, 1993.

91. Orth DS, Steinberg DC. Fator segurança no teste de eficácia de preservante. Cosmetics & Toiletries 2003; 15 (3): 76-81.

92. Chacra N A *et al*. Avaliação de sistema preservante por regressão linear. Cosmetics *& Toiletries*, v. 11, n. 2, ed. port., p. 44-48, 1999.

93. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association – CTFA. Microbiology Guidelines – Determination of Preservative Adequacy in Cosmetics Formulation. Washington: D.C (2001).

94. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Reference method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, as the document is M7-A6., Wayne, PA. USA (2002).

95. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, as the document is M27-A2., Wayne, PA. USA (2002).

96. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, as the document is M38-A., Wayne, PA. USA (2002).

97. United States of Pharmacopeia. (USP 30 – NF 25). Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

98. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL *et al*. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev. bras. farmacogn. 2008; 18(2): 301-307.

99. Stulzer HK, Tagliari MP, Ferreira MP. Estabilidade de shampoos contendo extratos vegetais. Cosmetics & Toiletries 2005; 17: 77-79.

100. Brannan DK. (Ed). Cosmetic microbiology**:** a practical handbook. Washington: CRC Press, 1997. 323p.

101. Ravita TD, Tanner RS, Ahearn DG, *et al*. Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. J Ind Microbiol Biotechnol 2009: 36: 35-38.

102. Griffin DH. Fungal physiology. 2. ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

103. Malvessi E, Silveira MM. Influence of Medium Composition and pH on the Production of Polygalacturonases by *Aspergillus oryzae.* Brazilian Archives of Biology and Technology 2004; 47: 693-702.

104. Leonardi GR, Campos PMBG. Estabilidade de Formulações Cosméticas, International Journal of Pharmaceutical Compounding 2001; 3 (4): 154-156.

105. Siqueira VL. Estratégias de proteção microbiológica de cosméticos. Cosmetics &. Toiletries 2004; 16: 100-104.

106. Ashour MSE, Hefnai, H. Microbial contamination of cosmetics and personal

care items in Egypt. 1 . Toothpaste and mouthwash. Cosmetics & Toiletries 1987; 102: 61-68.

107. Darbre PD. Underarm cosmetics and breast cancer. J. Appl. Toxicol. 2003; 23: 89- 95.

108. Gerberick GF *et al*. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. Contact Dermatitis 2004; 50: 274-288.

109. Manou I *et al*. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in tropically applied formulations under a challenge test. Journal of Applied Microbiology 1998; 84: 368-376.

110. Leranoz POS. Current trends in cosmetic microbiology. International Microbiology 2005; 8, 77-79.

111. Oldak E, Trafny EA. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005, p. 3281-3288.

112. Corbertt RJ. Preservation of cosmetic and toiletries: a microbiology overview. Parfum. Kosmet. 1992; 73: 22 – 27.

113. Houlsby RD. An alternate approach for preservative testing of ophthalmic multiple-dose products. J. Parenter. Drug Assoc. 1980; 34: 272 -276.

114. Stevanato BM. Estudo da eficiência da lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas para produtos cosméticos e farmacêuticos. 2005, 139 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005.

115. Boock KP. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de

cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacau*). 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

116. Brasil, Leis, decretos. Resolução Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial República Federativa do Brasil**,** Brasília, DF, 2004.

117. Almeida IF, Bahia MF. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético - farmacêutica. Cosmetics & Toiletries 2003; 15: 96-100.