UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham. visando sua aplicação como conservante em preparações cosméticas.

Beatriz Resende Freitas

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof(a). Dra. Telma Mary Kaneko

Cód. USP
3202501
28/03/2008

São Paulo
2008

19133

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013528

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

Freitas, Beatriz Resende
F866av Avaliação da atividade atimicrobiana de extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham. visando sua aplicação como conservante em cosméticos / Beatriz Resende Freitas. -- São Paulo, 2008.
170p.

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

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Cosméticos : Tecnologia I. T. II. Kaneko, Telma Mary, orientador.

615.19015 CDD

Beatriz Resende Freitas

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham. visando sua aplicação como conservante em preparações cosméticas.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

_____
3°. examinador

_____
4°. examinador

São Paulo, Fevereiro de 2008.

É com uma imensa satisfação que encerro mais essa etapa da minha jornada. Muito difícil expressar tudo que este trabalho proporcionou e representou: oportunidades, descobertas, aprendizado, convívio com pessoas fantásticas, e de grande capacitação; amadurecimento profissional, relações humanas, administração de conflitos, superações, vivências... E o mais importante, a chance de me tornar quem eu sou hoje. É com muito apreço que levarei comigo tudo que aprendi e vivenciei durante esses quatro anos de trabalho.

E tudo isso, essa tese, dedico aos meus pais:
Jurandir Carvalho Freitas e Jacyra Resende Freitas,
Pessoas exemplares que sempre estiveram comigo, me apoiando, me incentivando e fornecendo todo suporte necessário. Cada um a sua maneira, mas sempre, em todos os aspectos, fizeram tudo, e da melhor forma possível para que eu chegasse até aqui.

A vocês, meus queridos pais, dedico e agradeço eternamente tudo que me proporcionaram, obrigada pela compreensão, preocupação, zelo, amor e por tudo que depositaram e acreditaram em mim.
Sinceramente, meu muito obrigada!

Estimada orientadora, Telma Mary Kaneko,
meus sinceros agradecimentos por me orientar, conduzir, ajudar, guiar e incentivar. Obrigada pelo exemplo de idoneidade, compromisso e ética profissional, obrigada ainda pela amizade, generosidade, ajuda e principalmente pelas broncas que certamente me esculpiram para que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Agradecimentos

Este trabalho conta com valiosa e imprescindível colaboração de estimados professores, possuidores de imenso conhecimento, qualificação e generosidade, estando sempre aptos a auxiliar e ensinar. Sem os quais a execução do trabalho seria totalmente comprometida:

- Dra Mônica Beatriz Mattor – Centro de Tecnologia e Radiações – IPEN
- Dr. Paulo Roberto Moreno – Instituto de Química USP
- Dra. Maria Valéria Robles Velasco – Laboratório de cosmetologia – FCF/USP
- Dra. Cláudia Mauro – Faculdades Oswaldo Cruz
- Ms. Elda Marcondes – Faculdades Oswaldo Cruz
- Dra. Patrícia Santos Lopes – UNISA

Agradecimentos especiais para os colegas e amigos; Marcos Enoque Leite Lima, Elissa Arantes Ostrosky, Miriam Kaori Mizumoto, Daniele Yoshito, Tiago Luíz de Almeida e Juliano Morais, pelo companheirismo, auxílio, ajuda, socorro, amizade, conversas, risadas e conselhos.

Valioso auxilio da bióloga Silvana Cereijido Altran, dos técnicos José de Sousa Sobrinho e Claudineia Aparecida Sales de oliveira Pinto.

Agradeço a Leila Rangel C. Aranha, pela cuidadosa revisão das referências bibliográficas.

RESUMO

O potencial farmacológico de espécies do gênero *Lippia* no tratamento de infecções é conhecido popularmente, assim foi considerado o estudo da atividade da *Lippia salviaefolia* nativa do cerrado brasileiro. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de *Lippia salviaefolia* Cham. e sua citotoxicidade, visando aplicação como conservante natural em formulações cosméticas. O ensaio antimicrobiano foi realizado através do método de difusão em placa e determinação do CMI por de microdiluição em microplacas, utilizando os microrganismos: *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739, *C. albicans* ATCC 10231. Desenvolveu-se e avaliou-se a estabilidade acelerada de cremes, geis e xampus contendo o extrato de *Lippia salviaefolia.* As formulações de melhor desempenho quanto à estabilidade foram submetidas ao teste de eficácia de conservante. Avaliou-se segurança das formulações *in vitro*, em substituto cutâneo dermo-epidérmico por meio de estudos histológicos e o teste de citotoxicidade em cultura de queratinócitos humanos. No teste de atividade antimicrobiana verificou-se que a fração de acetato de etila e a fração de clorofórmio foram frações mais ativas com CMI de 0,2 % para bactérias e fungos. Os testes de eficácia de conservante das formulações contendo fr. ac. etila de *L. salviaefolia* apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias e *C. albicans* em creme, gel e xampu, para *A. niger* apresentaram atividade adequada somente em xampu. No teste de citoxicidade foi verificado segurança em concentrações a partir de 0,05 %. Sendo que na concentração de 0,2 %, correspondente ao CMI, se atinge a faixa de segurança apenas com meia hora de contato. Os resultados sugerem que a fração de acetato de etila da *Lippia salviaefolia* Cham. pode ser utilizada como conservante natural em produtos cosméticos.

ABSTRAT

The pharmacological potential of species of the *Lippia* in the treatment of infections has been known popularly, thus was considered the study of the activity of the native *salviaefolia Lippia* of the Brazilian Cerrado. The purpose of the work was to evaluate the antimicrobial activity of extracts of *Lippia salviaefolia* Cham. and its citotoxicy aiming the application as natural preservative in cosmetic formulations. The assay antimicrobial was carried through the method of diffusion in plate and determination of the MIC by microdilution, having used the microorganisms: *P.aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739, *C. albicans* ATCC 10231. It has developed and evaluated the stability of creams, gels and xampus with the extract of *Lippia salviaefolia* Cham. The formulations of the best stability performance have submitted to preservative efficacy test. The safe of the formulations has histological evaluated by *in vitro*. In the test of antimicrobial activity it has verified that the ethyl acetate and the chloroform fraction have been the most active and with CMI of 0.2 % for bacteria and fungus. The tests of effectiveness of preservatives have showed of the formulations contend the ethyl acetate fraction presented antimicrobial activity for bacteria and *C. albican* in cream, gel and shampoo. On the other hand, against *A.niger* it has been suitable activity in shampoo. In the citotoxity test, the 0,05 % ethyl acetate fraction has presented interval of security. And in the concentration of 0,2%, corresponding to CMI, safety's strip is just reached with half hour of contact. The results have suggested that the ethyl acetate extract of the *Lippia salviaefolia* Cham. should be used as natural preservative in cosmetic products.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Partes aéreas da *L. salviaefolia* ----------**4**

Fig. 2: Raízes e caule *L. salviaefolia*----------**4**

Fig. 3: Corte transversal (C.T.) do limbofolicular, passando pela nervura central da *L. salviaefolia.* Aum. de 100 x----------**74**

Fig. 4: Corte transversal do limbofolicular da *L. salviaefolia*. Detalhe: Tricomas glandulares sésseis e tricomas tectores. Aum. de 400 x----------**75**

Fig. 5: Corte paradérmico do limbofolicular da *L. salviaefolia*. Detalhe: estômatos com células-guarda reniformes. Aum. de 400 x----------**76**

Fig. 6: Corte paradérmico do limbofolicular da *L. salviaefolia*. Detalhe: estômatos com células-guarda reniformes. Aum. de 400 x----------**76**

Fig. 7: Corte transversal do pecíolo da *L. salviaefolia*. Visão geral. Aum. de 100 x----**77**

Fig. 8: Corte transversal do pecíolo da *L. salviaefolia*. Detalhe: Tricomonas glandulares sésseis, com óleo essencial. Aum. de 100 x----------**78**

Fig. 9: Corte transversal do caule da *L. salviaefolia*. Visão geral. Aum. de 100 x------**79**

Fig. 10: Corte transversal do caule da *L. salviaefolia*. Detalhe: Xilema secundário. Aum. de 400 x----------**79**

Fig. 11: Corte transversal da raiz da *L. salviaefolia* visão geral. Aum. de 100 x-------**80**

Fig. 12: Cromatografia em camada delgada das fr. ac. etila (1-5)----------**84**

Fig. 13: Espectros da fração 4 da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*. Análise por CG-EM--**85**

Fig. 14: Atividade antimicrobiana do extrato total de *L. salviaefolia* frente a *S.aureu*-**90**

Fig. 15: Atividade antimicrobiana da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* frente a *S.aureus*--**91**

Fig. 16: Atividade antimicrobiana da fração de clorofórmica de *L. salviaefolia* frente a *S.aureus*----------**91**

Fig. 17: Atividade antimicrobiana das frações (1-9) da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* na concentração de 1,0 mg/mL, frente a *S.aureus*----------**92**

Fig. 18: Atividade antimicrobiana da fração 3, proveniente da fr. ac. etila frente a *S.aureus*----------**93**

Fig. 19: Atividade antimicrobiana da fração 4 proveniente da fr. ac. etila frente a *S.aureus*----------**93**

Fig. 20: Atividade antimicrobiana do extrato total de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*--**94**

Fig. 21: Atividade antimicrobiana da fr ac etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*------**94**

Fig. 22: Atividade antimicrobiana da fração clorofórmica do extrato de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*----------**95**

Fig. 23: Atividade antimicrobiana da fração 3 proveniente da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*----------**95**

Fig. 24: Atividade antimicrobiana da fração 4 proveniente da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*----------**96**

Fig. 25: Atividade antimicrobiana da Naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *S. aureus*----------**97**

Fig. 26: Atividade antimicrobiana da Naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *E. coli*----------**97**

Fig. 27: Atividade antimicrobiana da Naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *C. albicans*----------**98**

Fig. 28: Atividade antimicrobiana da Naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *P. aeruginosa*----------**98**

Fig. 29: Teste de estabilidade física para emulsões – centrifugação----------**104**

Fig. 30: Teste de estabilidade física para emulsões – estresse térmico----------**105**

Fig. 31: Teste de estabilidade acelerada do creme A e creme B – Condição de geladeira----------**110**

Fig. 32: Teste de estabilidade acelerada do gel A e gel B – Condição de geladeira-**111**

Fig. 33: Teste de estabilidade acelerada do xampu A e xampu B – Condição de geladeira----------**112**

Fig. 34: Teste de estabilidade do creme A. e creme B – Condição de estufa-------**113**

Fig. 35: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B – Condição de estufa---**114**

Fig. 36: Teste de estabilidade acelerada do xampu A e xampu B – Condição de estufa----------**115**

Fig. 37: Teste de estabilidade do creme A e creme B – Condição de ciclos gela e degela----------**116**

Fig. 38: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B. – Condição de ciclos gela e degela ----------**117**

Fig. 39: Teste de estabilidade acelerada do xampu A. e xampu B – Condição de ciclos gela e degela----------**118**

Fig. 40: Teste de estabilidade acelerada do creme A. e creme B – Condição de freezer----------**119**

Fig. 41: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B – Condição de freezer---**120**

Fig. 42: Teste de estabilidade acelerada do xampu A e xampu B – Condição de freezer----------**121**

Fig. 43: Teste de estabilidade acelerada do creme A. e creme B – Condição de temperatura ambiente e luz solar indireta----------**122**

Fig. 44: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B – Condição de temperatura ambiente e luz solar indireta----------**123**

Fig. 45: Teste de estabilidade acelerada do xampu A. e xampu B – Condição de temperatura ambiente e luz solar indireta----------**124**

Fig. 46: Branco 24h – Controle do composto dérmico-epidérmico após 24 h no sistema de cultivo na interfase ar-líquido – microscopia óptica. (aum.: 1000x)-------**138**

Fig. 47: Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a base gel sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x) ----------**139**

Fig. 48: Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação gel incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)-**140**

Fig. 49: Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a base creme sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)----------**141**

Fig. 50: Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação creme incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)-**142**

Fig. 51: Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a base xampu sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)----------**143**

Fig. 52: Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação xampu incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)----------**144**

Fig. 53: Branco 48h – Controle do composto dérmico-epidérmico após 48 h no sistema de cultivo na interfase ar-líquido – microscopia óptica. (aum.: 1000x)-------**145**

Fig. 54: Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a base gel sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)----------**146**

Fig. 55: Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a formulação gel incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)-**147**

Fig. 56: Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a base creme sem a adição de *L salviaefolia* – microscopia óptica. (aum: 1000x)----------**148**

Fig. 57: Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a formulação creme incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)-**149**

Fig. 58: Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a base xampu sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)---------**150**

Fig. 59: Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a formulação xampu incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)-**151**

Fig. 60: Aspecto do crescimento da cultura de queratinócitos em relação ao número de células----------**153**

Fig. 61: Viabilidade celular através do estudo de citoxicidade em cultura de queratinócitos humanos da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*, em diferentes concentrações (0,0125 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, e 0,2 %) e diferentes tempos de contato (0,5 h, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h e 48 h)----------**157**

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Classificação de conservantes naturais de acordo com tamanho do halo de inibição, avaliados pelo método de difusão em agar----------**9**

Tabela 2. Inóculo e condições de crescimento dos organismos em estudo----------**16**

Tabela 3: Características da coluna utilizada na separação preliminar dos componentes da fração de acetato de etila----------**41**

Tabela 4: Fase Móvel utilizada na coluna para a separação dos componentes da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* e frações obtidas----------**42**

Tabela 5: Rendimento dos extratos aquoso e hidroalcóolico de *L. salviaefolia*--------**82**

Tabela 6: Rendimento das frações obtidas a partir da partição do extrato hidroalcóolico de *L. salviaefolia*----------**82**

Tabela 7: Atividade antimicrobiana, mensurada pelo diâmetro de inibição do crescimento, dos extratos de *L. salviaefolia* e frações pelo método de difusão em agar----------**87**

Tabela 8: CMI da naringenina, do extrato total e frações da *L. salviaefolia* pelo método de microdiluição, frente a bactérias e fungos----------**99**

Tabela 9: Avaliação física e físico-química das amostras do creme A e do creme B, no estudo de estabilidade acelerada----------**106**

Tabela 10: Avaliação física e físico-química das amostras do gel A e do gel B, no estudo de estabilidade acelerada----------**107**

Tabela 11: Avaliação física e físico-química das amostras do gel A e do gel B, no estudo de estabilidade acelerada----------**108**

Tabela 12: Análise inicial das pré-formulações cosméticas (creme A, creme B, gel A, gel B, xampu A, xampu B) realizada 24 horas após os preparo----------**109**

Tabela 13. Recuperação dos microrganismos avaliados nas condições de neutralização estudadas para inativação do sistema conservante e microrganismos----------**131**

Tabela 14. Carga de sobreviventes de *Escherichia coli* ATCC 10536 (UFC/g ou mL) no teste de eficácia de conservantes----------**132**

Tabela 15. Carga de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027(UFC/g ou mL) no teste de eficácia de conservantes----------**133**

Tabela 16. Carga de sobreviventes de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538(UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes----------**133**

Tabela 17. Carga de sobreviventes de *Burkholderia cepacia* ATCC (UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes----------**134**

Tabela 18. Carga de sobreviventes de *Candida albicans* ATCC 10231(UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes----------**134**

Tabela 19. Carga de sobreviventes de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes----------**135**

Quadro 1: Avaliação da segurança das formulações cosméticas em substituto cutâneo dermo-epidérmico com 24 horas de contato----------**66**

Quadro 2: Avaliação da segurança das formulações cosméticas em substituto cutâneo dermo-epidérmico com 48 horas de contato----------**67**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

CMI = concentração mínima inibitória UFC = unidade formadora de colônia

CG-EM = Cromatografia Gasosa acoplado com Espectrofotômetro de Massa

CCD = cromatografia em camada delgada

PBS = Phosphate Buffered Saline – Solução Salina Fosfato Tamponada

S. aureus = *Sthaphylococcus aureus* ATCC 6538

E. coli = *Echerichia coli* ATCC 10536

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

C. albicans = *Candida albican* ATCC 10231

B. cepacea = *Burkholderia cepacia* ATCC 17759

CA = Creme A CB = Creme B

GA = Gel A GB = Gel B

XA = Xampu A XB = Xampu B

L. salviaefolia = *Lippia salviaefolia* Cham. Ac. Etila = Acetato de etila

Fr. ac. etila = Fração de acetato de etila do extrato hidroalcóolico de *L. salviaefolia*.

Fig. = Figura Aum. = aumento

FE = fase estacionária v/v = volume por volume

p/v = peso por volume p/p = pesos por peso

FDA = Food and Drug Administration

CTFA = The Cosmetic, Toiletry and Fragance Association

NCCLS = Nacional Committe for Clinical Laboratory Standards

DMSO = dimetil sulfóxido KGM = keratynocyte growth médium

EFC = eficiência de formação de colônia EGF = fator de crescimento epidermal

SDB = caldo sabourand dextrose SDA = ágar sabouraud dextrose

TSA = Trypic Soy Agar TSB = Trypic Soy Broth

D/E = diluente Dey Engley LDH = liberação de desidrogenase láctica

DMEM = Dulbelcco's modified Eagle's Médium

MTT = teste de bromato de difenil tetrazólico

PFA = paraformaldeído

IAL = Instituto Adolfo Lutz

SUMÁRIO

1. – INTRODUÇÃO----------**1**

2. – OBJETIVO----------**3**

3. – REVISÃO DA LITERATURA----------**4**

3.1. *Lippia salviaefolia* Cham.----------**4**

3.2. Novos agentes antimicrobianos de origem vegetal----------**5**

3.3. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais----------**6**

3.3.1. Método de difusão----------**8**

3.3.2. Método de diluição em caldo----------**14**

3.3.3. Fatores que interem nos métodos----------**17**

3.4. Estabilidade de produtos cosméticos----------**22**

3.5.Teste de eficácia do conservante natural----------**26**

3.6. Avaliação da citoxicidade em estudos histológicos – microscopia óptica, em substituto cutâneo dermo-epidérmico----------**32**

3.7. Avaliação da segurança e citotoxicidade em cultura celular de queratinócitos humanos----------**33**

4. MATERIAL E METODOS----------**38**

4.1. Procedência e Taxonomia do material----------**38**

4.2 Descrição Anatômica de *L. salviaefolia*----------**38**

4.3. Obtenção dos extratos aquoso e hidroalcóolico----------39

4.3.1. Padronização da preparação----------39

4.3.2. Partição do extrato hidroalcóolico----------40

4.3.3. Separação da fração obtida em acetato de etila: extração em fase sólida----------40

4.3.3.1. Coluna Cromatográfica----------41

4.3.3.2. Cromatografia em Camada Delgada----------42

4.3.3.3. Análise Estrutural----------43

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana estudo prévio----------43

4.4.1. Preparação das amostras----------43

4.4.2. Microrganismos----------44

4.4.3. Método de difusão em agar----------44

4.5. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos diferentes extratos----------45

4.5.1. Determinação da CMI da Naringenina----------46

4.6. Desenvolvimento e seleção de pré-formulações cosméticas----------47

4.6.1. Estudo de estabilidade acelerada das pré-formulações cosméticas---54

4.7. Teste de eficácia do conservante natural *L. salviaefolia*----------58

4.7.1 Microrganismos----------58

4.7.2 Preparação e padronização das suspensões microbianas----------59

4.7.3 Meio de cultura e diluente----------60

4.7.4 Enumeração ou contagem de microrganismos----------60

4.7.5 Validação da metodologia / Escolha de condição de neutralização do sistema conservante----61

4.7.6 Teste de Eficácia de Conservantes das formulações----63

4.7.7 Critério de aceitação do teste de eficácia de conservante natural----64

4.8. Avaliação da segurança de formulações cosméticas com e sem incorporação de *L. salviaefolia* em estudos histológicos – microscopia óptica em substituto cutâneo dermo-epidérmico----65

4.8.1. Substituto cutâneo dermo-epidérmico----65

4.8.2. Estudo histológico – Microscopia óptica----68

4.9. Teste de citotoxidade da *L. salviaefolia* em cultura celular de queratinócitos humanos----68

4.9.1. Condição do teste de citotoxicidade----68

4.9.1.1. Obtenção de fibroblasto ----69

4.9.1.2. Obtenção de queratinócitos----69

4.9.2. Cultura celular----70

4.9.2.1. Cálculo da quantidade inicial de células----70

4.9.2.2. Avaliação da viabilidade celular----71

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO----74

5.1. Descrição Anatômica da L. salviaefolia----74

5.1.1. Limbo Folicular----74

5.1.2. Pecíolo----77

5.1.3. Caule----78

5.1.4. Raiz----80

5.2. Obtenção dos extratos aquoso, hidroalcoólico e frações da *L. salviaefolia*---**81**

5.2.1. Separação da fração obtida em acetato de etila: extração em fase sólida----------**83**

5.2.1.1. Coluna Cromatográfica----------**83**

5.2.1.2. Cromatografia em Camada Delgada----------**84**

5.2.1.3. Análise Estrutural----------**84**

5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana prévia----------**86**

5.3.1 Método de difusão em agar----------**86**

5.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos diferentes extratos----------**90**

5.5. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da naringenina------**95**

5.6. Estudo de estabilidade acelerada das pré-formulações cosméticas---------**105**

5.6.1. Testes preliminares de estabilidade física para emulsões----------**105**

5.6.2. Avaliação física e físico-química das formulações----------**106**

5.7. Teste de eficácia da *L. salviaefolia* como conservante natural----------**129**

5.8. Avaliação da segurança das formulações cosméticas com e sem a incorporação de *L. salviaefolia* em estudos histológicos – microscopia óptica, em substituto cutâneo dermo-epidérmico----------**138**

5.9. Teste de citotoxidade da *L. salviaefolia* em cultura celular de queratinócitos humanos----------**154**

6. CONCLUSÕES----------**160**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS----------**161**

ANEXOS OBRIGATÓRIOS----------**176**

1. INTRODUÇÃO

A comprovação da qualidade microbiana em produtos cosméticos visa evitar a transmissão de doenças quando estes são utilizados de forma correta, além de assegurar a estabilidade da preparação e, conseqüentemente, sua eficácia. Os cosméticos necessitam de conservantes capazes de reduzir a carga microbiana em níveis aceitáveis durante seu uso dentro do prazo de validade. Assim, se faz necessária a avaliação da eficácia dos conservantes em formulações cosméticas, determinando a segurança do uso do produto, visando testar a capacidade conservadora do cosmético durante sua fabricação e durante o seu prazo de validade, ao longo do seu uso pelo consumidor.

Bactérias e fungos são capazes de crescer nos produtos cosméticos quando existem nutrientes disponíveis e as condições do meio são satisfatórias. Para esta finalidade, os conservantes devem apresentar atividade antimicrobiana efetiva e ser seletivamente tóxicos e eficazes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bolores e leveduras. Entretanto, devido as características intrínsecas, a maioria dos conservantes de origem sintética pode apresentar reações tóxicas ao usuário, tais como irritação local, dermatite de contato, hipersensibilidade e outras.

Em geral, os conservantes de origem sintética, têm características lipofílicas, a utilização de extratos aquosos ou hidroalcóolicos poderá ser mais efetiva, uma vez que o crescimento dos microrganismos ocorre principalmente em meio aquoso.

A utilização de componentes ativos de origem natural na produção de cosméticos tem crescido muito nos últimos anos. A busca cada vez maior de cosméticos eficazes e seguros tem sido constante. Com esse enfoque, a substituição

de conservantes sintéticos pelos de origem natural vem de encontro a essa diretriz. A proposta deste projeto é a avaliação antimicrobiana do extrato de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham. visando sua utilização como conservante em preparações cosméticas.

Em estudos preliminares, foram avaliadas as atividades antimicrobianas do extrato hidroalcóolico de folhas e ramos de diversas plantas, coletadas aleatoriamente na região de Itirapina (cerrado do estado de São Paulo). Dentre as diversas plantas coletadas, a *L. salviaefollia* apresentou melhor atividade antimicrobiana frente bactérias Gram positivas, negativas e fungos. O trabalho foi realizado por um grupo de estudos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo sob a supervisão do professor Dr. Paulo Moreno. Apresentado sob a forma de Pôster, no XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina "Nuno Álvares Pereira" no Rio de Janeiro de 08 a 12 de Setembro de 2003.

Neste contexto esta pesquisa visou avaliar a ação antimicrobiana de extratos de folhas de *L. salviaefolia*, no intuito de encontrar conservantes naturais eficazes para utilização em cosméticos. Desta forma, procura-se diminuir os problemas gerados por conservantes sintéticos e valorizar o emprego de conservantes naturais, que podem ainda favorecer uma melhor ação antimicrobiana na fase aquosa das emulsões.

2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de *L. salviaefolia* e sua utilização como conservante natural eficaz e seguro em preparações cosméticas estáveis.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. *Lippia salviaefolia* Cham. (Verbenaceae)

Figura 1: Partes aéreas da *L. salviaefolia*

Figura 2: Raízes e caule da *L. salviaefolia*

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. Estas espécies estão distribuídas principalmente pelos países da América do Sul e América Central, e pelos territórios tropicais da África (TERBLANCE; KORNELIUS, 1996). A maioria das espécies do gênero *Lippia* é tradicionalmente utilizada no tratamento de afecções gastrintestinais e respiratórias. Algumas espécies demonstraram atividade antimalarial, anti-viral e citostática. (MORTON, 1981; GASQUET et al, 1993; ABAD et al, 1995). Em geral, o gênero apresenta um perfil consistente de composição química, atividades farmacológicas e uso tradicional. Duas das espécies mais importantes desse gênero são *L. multiflora* e *L. alba* (PASCUAL, et al 2001). Na literatura, existe ainda registro de outras espécies do gênero *Lippia* com atividade antimicrobiana como a *Lippia sidoides* (COSTA, S. M.O.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; ASSUNÇÃO, J.C.C.; BRAZ-FILHO, R.; 2002)

e a *Lippia adoensis* (TAGET, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K. GEBRE-MARIAM,T. 2005), dentre outras. Entretanto, não existe referências na literatura sobre atividade farmacológica, estudos de toxicidade ou uso tradicional da espécie *L. salviaefolia*.

A *L. salviaefolia* é uma planta originaria do cerrado brasileiro, pertence ao grande grupo das Dicotiledôneas, família das Verbenáceas. Como hábito vegetativo, é caracterizado como arbusto com folhas aromáticas, tubo da corola amarelado e flores brancas aromáticas.

3.2. Agentes antimicrobianos de origem vegetal

O desenvolvimento de medicamentos e deverivados de origem vegetal é de grande importância na cultura e tradição da história da humanidade. A maioria da população urbana pobre, assim como em pequenas comunidades rurais, confia e faz grande uso da medicina natural, utilizando plantas, assim como extratos naturais no tratamento de suas enfermidades. Esse fato se dá devido à cultura dessas populações e principalmente pela acessibilidade e disponibilidade desse tipo tratamento. Como conseqüência, existe uma crescente tendência mundial, em integrar a medicina tradicional ao cuidado médico primário (FENNEL, et al, 2004). Adicionalmente, pesquisas para desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos efetivos são necessárias devido ao desenvolvimento da resistência microbiana e a ocorrência de infecções oportunistas fatais associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al, 2001). Inúmeras pesquisas extensivas têm sido desenvolvidas no intuito de encontrar e classificar agentes antimicrobianos

de extratos de plantas e produtos naturais, sendo que um grande número de plantas representa fonte potencial nesta busca. (DE SMET, et al, 1997; COWAN, 1999; HERNANDEZ-PEREZ, et al, 1999; SOKMEN, et al, 1999; KELMANSON et al, 2000; SRINIVASAN et al, 2001, MARTINI, et al 2004; MITSCHER et al, 1987; CUTCHEON et al, 1997; MENG et al, 2000; RUBERTO et al, 2000; HO et al, 2001; BONJAR, 2004).

A variação observada freqüentemente, nos resultados quando são testados extratos de plantas para atividade antimicrobiana pode ser atribuída a inúmeros fatores. Estes incluem a técnica de ensaio, meio de cultura, cepa das bactérias ou fungos usados no teste, tempo, fonte da planta e se é usada fresca ou seca, e a quantidade testada do extrato dentre outros (FENNEL, et al, 2004). Porém, estes fatores não são empecilhos na busca da padronização e maiores pesquisas englobando a atividade antimicrobiana de extratos naturais.

3.3. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da CMI de plantas medicinais

O estudo da atividade antimicrobiana de substâncias usadas em produtos farmacêuticos e cosméticos é um tema que vem se desenvolvendo bastante, e somente nos últimos 60 anos tem sido tratado de maneira científica. Grande importância é dada ao assunto, devido à preocupação não somente com o aspecto

microbiológico, mas também com o potencial de irritação e toxicidade ao consumidor (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada por meio da determinação da menor quantidade da substância em estudo necessária para inibir o crescimento do microrganismo em teste; esse valor é conhecido como CMI (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Um aspecto bastante relevante na determinação da CMI de extratos vegetais é a preocupação, mencionada anteriormente, principalmente em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais e/ou combinações (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

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 (PENNA *et al.*, 2001). O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é que a utilização do estudo da CMI serve como primeiro "screening" na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes. O que é de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade, uma vez que tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas vencendo contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (MITSCHER *et al*, 1987; MENG *et al*, 2000; RUBERTO *et al*, 2000; HO *et al*, 2001).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem o da difusão em ágar, da macro e microdiluição (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; COLLINS, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Para determinar a CMI ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado abundantemente o método sensível de microdiluição (ELOFF, 1998).

As variações referentes à determinação da CMI de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores, como a técnica aplicada (método de difusão ou de diluição); os diferentes microrganismos e cepas utilizadas no teste (de acordo com o planejamento de cada pesquisador os microrganismos e cepas podem variar); a origem da planta; a época da coleta; a preparação dos extratos a partir de plantas frescas ou secas; método de extração e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (Fennell *et al.*, 2004).

3.3.1. Método de difusão

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 (BARRY; THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A aplicação deste método se limita a microrganismos de crescimento rápido, aeróbios ou aeróbios facultativos (BARRY; THORNSBERRY, 1991; THORNSBERRY, 1991). 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 (BARRY; THORNSBERRY, 1991). De acordo com a dimensão do halo, os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, moderadamente sensíveis, e resistentes (COLLINS, 1995) Observe a tabela 1.

Tabela 1. Classificação de conservantes naturais de acordo com tamanho do halo de inibição, avaliados pelo método de difusão em agar (COLLINS, 1995).

CLASSIFICAÇÃO	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO
Sensível	Maior ou até 3 mm menor, que o halo do controle positivo.
Moderadamente sensível	Maior que 2 mm, ou menor que o halo do controle positivo em mais de 3 mm
Resistentes	Igual ou menor que 2 mm.

No método existe a necessidade de controle positivo, empregando-se uma substância antimicrobiana padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2001; FERESIN *et al.*, 2001;

JETTY; IYENGAR, 2000; KARAMAN *et al.*, 2003; MEHOOD *et al.*, 1999; RAJANI *et al.*, 2002; SCAZZOCCHIO *et* al., 2001; SHRIMALI *et al.*, 2001).

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 ºC para bactérias, durante 24 a 48 horas, e para fungos, de 25 a 27 ºC por 48 a 72 horas (CARVALHO et al., 2002; CHANDRASEKARAM e VENKATESALU, 2004; KARAMAN *et al.*, 2003; MOODY; ADEBIYI; ADENIYI, 2004; RAJANI *et al.*, 2002; SPRINGFIEL *et al.*, 2003). Como variação do método, em 2002, RABANAL e colaboradores, incubaram as placas de Petri com meio de cultura adequado por 14h, à temperatura de 37 ºC para bactérias e por 28 h a 30 °C para fungos.

A técnica de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão utiliza um disco de difusão, cilindro de aço inoxidável ou vidro, e perfuração em ágar (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

- Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committe for Clinical Laboratory Standards) (BARRY; THORNSBERRY, 1991).

Rabanal et al (2002) e Karaman et al (2003) realizaram o teste de difusão em disco por meio da aplicação de 10 µL da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro, de 6mm de diâmetro, nas diferentes concentrações testadas variando de 31,25 a 500 µg/mL. Outros pesquisadores realizaram o teste de difusão aplicando 20 µL de extrato hidroalcoólico de *Psidium guajava* L., e extratos: metanólico e aquoso de *Syzygium jambolanum*, respectivamente, obtendo

concentrações de 500 a 1000 µg/mL (CARVALHO, et al. 2002; CHANDRASEKARAN E VENKATESALU, 2004). Shrimali et al. (2001) aplicaram 50 e 100 µL dos extratos alcoólicos de *Ailanthus excelsa* (Roxb) em papel de filtro de 10 mm de diâmetro para verificar sua atividade antibacteriana. Springfield et al. (2003) testaram diferentes extratos obtidos de 2 espécies de *Carpobrotus* aplicando 50 µL das soluções em discos de papel de filtro de 9 mm. Penna et al. (2001) verificaram a atividade antimicrobiana de 3 extratos de diferentes plantas da flora argentina pelo método de difusão em agar, utilizaram discos de papel de 5,5 mm impregnados com 0,25 mg do extrato seco dissolvido em 10 µL do solvente correspondente.

Em trabalho citado na literatura foram utilizadas a ampicilina (30µL) e a tetraciclina (30µL) como controle positivo, e etanol e água como controle negativo na avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais da Índia usadas no tratamento de doenças de pele (JEEVAN RAM, et al. 2004). Em outro estudo, como controle negativo utilizou-se disco impregnado com DMSO, e como controle positivo cloranfenicol (30 µg) para bactérias e anfotericina B (100 µg) para fungos (RABANAL, et al. 2002). Empregou-se também a ciprofloxacina (40 µL) como controle positivo para bactérias e Anfotericina B (25 µL) para fungos (SPRINGFIELD, et al. 2003).

Os discos são colocados sobre o ágar na placa de Petri, previamente inoculados com 100 µL de suspensão contendo 10^8 UFC (Unidade Formadora de Colônia)/mL de bactérias; 10^6 UFC/mL de leveduras e 10^4 esporos/mL de fungos (CHATTOPADHYAY *et* al., 2001; CHATTOPADHYAY *et* al., 2002; KARAMAN *et al.*, 2003). A disposição dos discos deve respeitar sua distância até a parede da placa superior a 15 mm, e de modo a não sobrepor as zonas de inibição (BARRY; THORNSBERRY, 1991). O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4 e a

profundidade recomendada é de aproximadamente 4 mm (BARRY; THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995).

- Cilindros de aço inoxidável

Esta técnica de aplicação envolve cilindros de aço inoxidável no meio de cultura solidificado inoculado e a adição da solução em estudo nos cilindros.

Na literatura temos como exemplo a aplicação de 200 µL dos extratos de plantas medicinais comumente utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. Como controle positivo para bactérias foi aplicado cloranfenicol (40 µg/mL, 200 µL), e para fungos, nistatina (30 mg/mL, 200 µL). Dois controles negativos, 200 µL de metanol e 200 µL de água destilada e esterelizada, foram utilizados. (COELHO DE SOUZA, et al., 2004).

Em outro trabalho empregaram o método de difusão em ágar, com cilindros. Utilizando uma suspensão de *S. aureus* (ATCC 6538) na concentração de 10^8 UFC/mL, desafiando 200 µL de extratos glicólicos de *Physalis angulata* L em diferentes concentrações. Foi utilizada uma curva padrão de ampicilina como controle positivo LOPES et al. (2006).

- Perfuração em ágar

Para técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas. Moody, Adebiyi e

Adeniyi preencheram os poços com 60 µL dos extratos de *Aloe Vera* e *Ageratum conyzoides* para verificar a atividade antimicrobiana de sopas medicinais utilizadas na Nigéria. Como controle positivo foram aplicados Estreptomicina (100, 25 e 6,25µg/mL) para bactérias e Tioconazol (100, 25 e 6,25µg/mL) para fungos. O controle negativo era constituído de metanol: água 50 % (v/v), que foi usado para dissolver os extratos secos para as diferentes concentrações testadas (MOODY, et al. 2004).

A atividade antifúngica de plantas medicinais da Índia foi determinada utilizando a técnica de perfuração em ágar, por Mehmood e colaboradores em 1999. O meio de cultura sólido foi inoculado com 10^4 UFC de *Candida albicans* e perfurado em poços de 8 mm de diâmetro, sendo estes preenchidos com 100 µL do extrato da planta, do solvente (controle negativo) ou do antibiótico Nistatina, 50 µg/mL (controle positivo).

Okeke e colaboradores (2001) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos obtidos da raíz de *Landolphia owerrience*. Os poços de 6 mm de diâmetro, feitos na placa já inoculada com 1 mL de 5 x 10^5 UFC, foram preenchidos com 100 µL dos extratos reconstituídos com DMSO 50% para as diferentes concentrações ensaiadas. A Gentamicina (8 e 16 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e uma solução de DMSO 50% como controle negativo.

Okoli e Iroegbu (2004) testaram os extratos de *Anthocleista djalonensis*, *Nauclea latifolia*, e *Uvária afzalii* para verificar sua atividade contra bactérias isoladas de casos de uretitis e/ou doença sexualmente transmitida. A técnica descrita por Okeke e colaboradores (2001) foi utilizada, porem alterando-se para Ciprofloxacina (8 µg/mL), o controle positivo.

Lima e colaboradores em 2006; verificaram a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre diferentes espécies de Candida, utilizando o método de difusão em meio sólido, aplicando a técnica de perfuração feita através de cânulas de vidros, obtendo poços de 6 mm de diâmetro. Utilizaram alíquotas de 50 µL da solução dos óleos essenciais nas concentrações desejadas, e um inoculo de 10^6 UFC/mL. O sistema foi incubado por 24-48 h a 35 °C. Foi considerado como CMI àquela concentração do óleo essencial capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento fúngico maior ou igual a 10 mm de diâmetro. Como controle negativo foi empregado tween 80, e cetoconazol (50 µg/mL) como controle positivo.

3.3.2. Método de diluição em caldo

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 (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; COLLINS, 1995).

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos (SAHM; WASHINGTON II, 1991; THORNSBERRY, 1991).

Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o antibiótico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM; WASHINGTON II, 1991).

- Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição.

- Macrodiluição

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado pequeno número de réplicas (SAHM; WASHINGTON II, 1991; ZGODA; PORTER, 2001).

- Microdiluição

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (COLLINS, 1995).

Em 2001, Zgoda e Porter utilizaram extratos orgânicos das plantas *Lemna minor* e *Ilex comuta* para desenvolver uma técnica de microdiluição para a pesquisa de novos compostos com atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. Para cada microplaca foi usado um controle negativo (água, meio de cultura e 2,5% DMSO), controle de crescimento (água, meio de cultura, 2,5% DMSO e inóculo), controle positivo (água, meio de cultura, inóculo, 2,5% DMSO e antibiótico). A inoculação sugerida foi a utilização de 95 µL de água estéril, 5 µL de extrato dissolvido em DMSO, 80 µL do meio apropriado e 20 µL de inóculo. Em teste prévio observou-se

que concentrações maiores que 2,5% DMSO nos poços inibia o crescimento de *Cr. albidus*, e, por essa razão, esta concentração foi utilizada para todos os microrganismos.

Tabela 2. Inóculo e condições de crescimento dos organismos em estudo. (ZGODA; PORTER, 2001)

Organismo	Inóculo (UFC/mL)	Tempo de crescimento da cultura (h)	Temperatura de incubação (°C)	Período de incubação (h)
Ca. albicans	4×10^2	18	35	48
Cr. albidus	$2,6 \times 10^4$	24	24	48
M. smegmatis	$2,5 \times 10^4$	48	35	72
P. aeruginosa	$1,3 \times 10^7$	18	35	18
MSRA	$8,6 \times 10^6$	18	35	24
S. aureus	$7,2 \times 10^6$	18	35	18

As leituras foram feitas a 750 nm num espectrofotômetro, leitor de microplacas, após a agitação dos poços para ressuspender as células aderidas no fundo com uma pipeta multicanal (ZGODA; PORTER, 2001).

Karaman e colaboradores (2003) utilizaram a técnica para verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *J. oxycedrus* dissolvido em DMSO 1,0%, concentração de solvente que não inibe o crescimento dos microrganismos. A técnica descrita por ZOGDA e PORTER (2001) foi adaptada, dispensando-se 95 µL de caldo nutriente e 5µL de inóculo em cada poço. No primeiro foi então adicionado 100µL de extrato de *J. oxycedrus* preparado inicialmente na concentração de 500 µg/mL. Fez-se então uma diluição seriada nos 6 poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de

maior concentração, resultando na diluição de até 7,8 µg/mL. No último poço não se adicionou o inóculo e o extrato, a fim de se ter um controle negativo. O crescimento microbiano foi determinado por leitura no espectrofotômetro a 600 nm.

Khan e Katiyar em 2000 testaram a atividade antifúngica do extrato de alho (*Allium sativum*) em microplacas, utilizando 270 µL de meio SDB em cada poço. 30µL do extrato foram adicionados nos primeiros poços e a partir deles foram feitas as diluições seriadas. Em seguida, foi colocado o inóculo de 10^4UFC em cada poço. Controles foram submetidos às mesmas condições laboratoriais. A leitura foi feita após 48-72h em leitor de ELISA, a 492 nm.

Eloff em 1998 utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferiam na análise. Todavia concluiu que o método de microplacas é robusto, barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer uma pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente.

3.3.3. Fatores que interem nos métodos

Diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição, existe assim a necessidade do conhecimento das condições experimentais e

padronização rigorosa da execução do teste (COLLINS, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; THORNSBERRY, 1991).

❖ Os aspectos importantes a serem considerados são:

- Meio de cultura

Deve proporcionar um crescimento adequado dos organismos a serem desafiados e não deve conter substâncias antagônicas à atividade antimicrobiana em estudo (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Entre os meios de cultura utilizados para teste de susceptibilidade de bactérias, o Müller-Hinton é o mais citado em diversos trabalhos publicados (BARRY; THONRSBERRY, 1991; CARVALHO, *et al.*, 2002; CHANDRASEKARAM; VENKATESALU, 2004; CHATTOPADHYAY *et* al., 2001; CHATTOPADHYAY *et* al., 2002; CORTEZ *et al.*, 2002; ELOFF, 1998; FERESIN *et al.,* 2001; HAMILL *et* al., 2003; JETTY; IYENGAR, 2000; RABANAL *et al.*, 2002; SAHM; WASHINGTON II, 1991; SCAZZOCCHIO *et al.*, 2001), outros meios bastante utilizados são o de Caseína Soja (TSA e TSB) (BARRY; THONRSBERRY, 1991; RABANAL *et* al., 2002; SAHM; WASHINGTON II, 1991) e o meio líquido Luria-Bertani (ZGODA; PORTER, 2001) para bactérias. Em relação aos fungos são utilizados os meios Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; CHATTOPADHYAY *et* al., 2001; CHATTOPADHYAY *et* al., 2002; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004; IROBI; ADEDAYO, 1999; FERESIN *et al.,* 2001; HAMILL *et* al., 2003; JETTY; IYENGAR, 2000; KARAMAN *et al.*, 2003; KHAN; KATIYAR, 2000; MEHMOOD *et al.*, 1999; RABANAL *et al.*, 2002; RAJANI *et al.*, 2002), Agar Batata

dextrose (PDA) (KARAMAN *et al.*, 2003), Bacto Yeast Morphology Agar (RABANAL *et al.*, 2002) e caldo de levedura (ZGODA; PORTER, 2001).

No método de difusão, a concentração do ágar e a sua origem podem influenciar os resultados dos ensaios (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Segundo Barry e Thornsberry em 1991 e Collins em 1995, há substâncias no meio de cultura que influenciam a susceptibilidade do teste, a timidina antagoniza a atividade de sulfonamidas e trimetroprinas, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais agentes. Se o meio contiver altas concentrações de timidina, pode-se adicionar sangue de cavalo lisado ou timidina fosforilada para remove-la na forma livre. O cátion monovalente Na^+ aumenta a atividade de bacitracina, ácido fusídico e novobiocina contra *Staphylococcus spp*, e da penicilina contra *Proteus spp*. Cátions bivalentes tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} reduzem a atividade de aminoglicosídeos e polimixinas contra Pseudomonas spp., e da tetraciclina contra uma série de organismos.

- pH

O pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano e com a atividade e a estabilidade das substâncias testadas (PINTO; KANEKO; OHARA; 2003).

Segundo Collins em 1995, a atividade dos aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamídeos, e nitrofurantoína aumentam com a elevação do pH. A diminuição do pH potencializa a atividade de tetraciclina, do ácido fusídico e da novobiocina.

Barry e Thomsberry em 1991, 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.

Conforme estudos citados por Pinto, Kaneko e Ohara em 2003, 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.

Em trabalho publicado em 2002, Rabanal e colaboradores utilizaram pH 7 para avaliar a atividade antimicrobiana de espécies de *Hypericum* das Ilhas Canárias.

- Disponibilidade de oxigênio

Conforme o metabolismo do microrganismo desafiante, aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos, as condições de disponibilidade desse gás podem influenciar na sua multiplicação. Nos trabalhos desenvolvidos para a determinação da atividade da estreptomicina utilizando *Staphilococcus aureus*, por diluição em tubos, verificou-se que houve pouca influência da disponibilidade de oxigênio (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

- Inóculo

A suscetibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A padronização desse se faz, portanto, necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. No teste de

suscetibilidade de meticilina contra Staphylococcus, esse padrão deve ser de 10^6 UFC / inóculo. Para os testes de diluição em caldo, o padrão é de 10^5 UFC / inóculo no início do período de incubação (COLLINS, 1995; SAHM; WASHINGTON II, 1991).

Segundo recomendação de Barry e Thornsberry (1991), Collins (1995) e Sahm e Washington II (1991) a preparação do inóculo nos métodos de diluição e difusão deve ser feita a partir de 4 ou 5 colônias da cultura do microrganismo desafiado para evitar selecionar uma cepa variante atípica. Após o crescimento das colônias por 16h em caldo nutriente, os microrganismos devem ser diluídos em água destilada para a concentração de 10^7 UFC / mL. O padrão de leitura 0,5 na escala McFarland fornece densidade de aproximadamente 10^8 UFC / mL. Alternativamente, o inóculo pode ser ajustado fotometricamente ou por diluição padronizada do caldo nutriente, se a densidade de tais culturas for razoavelmente constante. As placas devem ser inoculadas em até 30 minutos após a padronização do inóculo, para que a densidade celular não esteja alterada.

Para o teste de microdiluição, Rabanal e colaboradores (2002) utilizaram inóculo de 5µL, equivalente a 10^5 células por µL em cada poço.

- Condições de Incubação

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. Condições alternativas só devem ser utilizadas se forem essenciais para o crescimento do microrganismo em teste (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; COLLINS, 1995; KARAMAN *et al*, 2003; SPRINGFIELD *et al*, 2003).

- Recursos utilizados para melhoria da leitura do diâmetro do halo no método de difusão.

A espessura e a uniformidade do ágar são essenciais para a boa resolução dos resultados. Como descrito na Farmacopéia Brasileira 4ª ed. (1988), deve-se controlar rigorosamente o volume de ágar transferido para a placa de Petri, e o meio de cultura deve ser distribuído de modo a evitar formação de estrias superficiais e bolhas. Quando ocorrem halos de pequenas dimensões, o recurso utilizado é a diminuição do volume do meio, o que leva a diminuição a espessura do meio na placa (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A pré-incubação é utilizada quando se visa diminuir a dimensão do halo e a pré-difusão para aumentar a zona de inibição (COLLINS, 1995).

3.4. Estabilidade de produtos cosméticos

A estabilidade pode ser definida como a capacidade de um produto contendo ou não substâncias ativas, de manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas, toxicológicas e bioativas, dentro dos limites especificados

previamente durante todo seu prazo de validade, pois esses produtos quando comercializados passam por um sistema de estocagem e distribuição e podem ficar sujeitos ao calor prolongado e a umidade (ANVISA, 2004).

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade. Essa estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto. Modificações dentro de limites determinados podem não configurar motivo para reprovar o produto.

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos contribui para:

- Orientar o desenvolvimento da formulação, selecionando matéria-prima e processo de fabricação, além do material de acondicionamento adequado;
- Fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações;
- Estimar o prazo de validade e fornecer informações para a sua confirmação;
- Auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos.

No caso de produtos cosméticos não existe uma recomendação oficial sobre as condições que devem ocorrer o estudo, e toda pesquisa conduzida neste campo baseia-se em referências da literatura de produtos cosméticos e medicamentos e pesquisas realizadas anteriormente nesta área (CADWALLADER, 1989; DONALD, CADWALLADER, 1989; RIBEIRO, KHURY, GOTTARDI, 1996).

Os testes de estabilidade em produtos cosméticos são dos mais importantes para garantir a qualidade, fornecendo informações confiáveis que auxiliem na

determinação do prazo de validade do produto desenvolvido. Necessários, também, para orientar no desenvolvimento de formulas, selecionar matérias-primas e material de acondicionamento (WITTERN, et al., 1985).

Se ocorrer algum tipo de alteração na aparência do produto cosmético em determinado intervalo de tempo, indica que após este tempo o produto não deve ser oferecido para os consumidores. Cada componente, ativo ou não, pode afetar a estabilidade de um produto. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade do produto (CADWALLADER, 1989; RIBEIRO, KHURY, GOTTARDI, 1996).

Conforme a origem, as alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por componentes externos; ou intrínsecas, quando determinadas por fatores inerentes à formulação. Os primeiros envolvidos: tempo, temperatura, luz, umidade, oxigênio, vibração, material de acondicionamento e microrganismos. Enquanto os fatores intrínsecos ou relacionados à própria natureza das formulações envolvem: Incompatibilidade física e incompatibilidade química (pH, reações de oxi-redução, reações de hidrólise, interação entre os componentes da formulação e/uo material de acondicionamento). Ao avaliar a estabilidade de produtos cosméticos deve-se considerar os seguintes aspectos:

- Físicos: devem ser conservadas as propriedades físicas originais como aspecto, cor, odor, uniformidade, dentre outras;

- Químicos: devem ser mantidos dentro dos limites especificados a integridade da estrutura química, o teor de ingredientes e outros parâmetros;

- Microbiológicos: devem ser conservadas as características microbiológicas, conforme os requisitos especificados. O cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e os sistemas conservantes utilizados na formulação pode garantir estas características.

O teste de estabilidade acelerada é realizado na fase de desenvolvimento de produto, auxiliando a escolha das matérias primas apropriadas para a formulação. É considerando como teste de curta duração e de orientação. O teste de estabilidade normal também é realizado na fase de desenvolvimento, mas aplicado após a definição da fórmula e material de acondicionamento, em geral tem duração de noventa dias e as condições são menos extremas do que aquelas aplicadas no teste de estabilidade acelerada: estipula prazo de validade preditivo. O estudo de longa duração é utilizado para avaliar o comportamento do produto, durante seu armazenamento, sendo complementar ao teste de estabilidade normal, tem duração média de seis meses e vai confirmar o prazo de validade inicialmente estipulado. (RIBEIRO, 2001).

Os ensaios mais comumente utilizados para avaliar a estabilidade de um produto são: características organolépticas (aspecto, cor, odor), valor de pH, teor de água, viscosidade e análise quantitativa dos componentes ativos da formulação. Em relação às condições de armazenamento das amostras, de acordo com a necessidade e tipos de produtos a serem analisados podem ser: temperatura ambiente; temperatura elevada (45 °C a 50 °C); baixa temperatura (2 a 8 °C – geladeira); exposição à radiação UV; temperaturas alternadas (estufa, freezer e gradiente de temperatura) (RIBEIRO, 2001; D'LEON, 2001; RIBEIRO, KHURY, GOTTARDI, 1996; WITTERN, et al., 1985).

3.5.Teste de eficácia do conservante natural

A qualidade microbiana de um produto cosmético e farmacêutico deve ser avaliada com o objetivo de garantir a eficácia e segurança em seu prazo de validade e condição de uso. A comprovação dos níveis de contaminação microbiana dos produtos não estéreis visa evitar a transmissão de doenças e assegurar a estabilidade do produto. A presença de microrganismos, acima dos limites aceitáveis, pode acarretar problemas clínicos aos usuários e também, dependendo do microrganismo presente, o efeito tóxico do produto contaminado põe em risco a vida do paciente (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003). O perigo relativo criado pela contaminação microbiológica desses produtos pode ser relatado pela severidade da infecção ou doença causada. Microrganismos como *Pseudomonas*, *Proteus, Staphylococcus, Serratia, Streptococcus, Penicilium, Aspergillius* e o gênero *Candida* são classificados como de riscos à saúde (BAIRD 2000).

Uma das principais fontes de contaminação microbiana das formulações cosméticas e farmacêuticas é a água (CROSHAW, 1977; DIEHL, 1990; MALCOLM, 1980). O gênero *Pseudomonas* é o mais citado na literatura (ORTH, 2001 TENENBAUM, 1967 e 1971; VAN ABBE et al., 1970), mas também forão encontrados *Xanthomonas, Flavobacterium, Achromobacter* e *Aerobacter*. Segundo alguns autores, (STANLEY & OLSON, 1967; TENENBAUM, 1977; VAN ABBE et al., 1970) a carga bacteriana atingiu a ordem de 10^6 UFC/mL. A regeneração inadequada das resinas utilizadas para obtenção de água desmineralizada pode contribuir para a contaminação microbiana (CARRERA, 1988; DONY, 1975). A água destilada, por sua

vez, pode conter microrganismos contaminantes quando o processo de destilação não for validado, contendo traços de matéria orgânica, de sais e de metais provenientes do sistema de destilação (CARRERA & PLANA 1988; SMART & SPOONER, 1972). A atividade de água é definida como a razão entre a pressão de vapor da solução e a pressão de vapor de água (CURRY, 1985). Segundo CURRY, a atividade mínima de água requerida para a maioria das bactérias é da ordem de 0,91 e, para bolores e leveduras entre 0,90 e 0,80. Parker concordou com esses valores em relação a bactérias, porém, quando se refere a fungos, cita a atividade de água inferior a 0,80 (PARKER, 1982).

Outras fontes importantes de contaminação microbiana são as matérias-primas de origem natural (MacCARTHY, 1980; O'NEILL e col., 1982). BONOMI e NEGRETTI investigaram a qualidade microbiana de várias dessas matérias-primas, principalmente de origem vegetal, usualmente empregada nas preparações farmacêutica (BONOMI & NEGRETTI, 1977). As matérias-primas de origem sintética ou semi-sintética apresentam, geralmente, baixa carga microbiana contaminante com exceção de algumas como poliglicóis ou polietilenoglicóis.

O produto com sua formulação e sua embalagem primária contribuem para o desenvolvimento microbiano, pois podem conter carboidratos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, glicosídeos, álcoois graxos, esteróides, peptídeos e vitaminas. Esses substratos podem servir de nutrientes para microrganismos contaminantes (MADDEN & JACKSON, 1981). O material de acondicionamento pode ser fonte de contaminação, quando não adequadamente limpos (SMART & SPOONER, 1972; VAN ABBÉ e col., 1970). E os componentes podem interagir com os conservantes utilizados na formulação, como os parabenos que podem ser

adsorvidos por recipientes plásticos resultando em diminuição de sua atividade conservante (BAHAL & ROMANSKY, 2001). Outro aspecto a ser considerado é o da contaminação do produto pelo próprio usuário (LEVY, 1987), sendo necessárias recomendações adequadas na sua utilização e o uso de conservantes na formulação.

BONOMI e NEGRETTI investigaram o conteúdo microbiano das matérias-primas empregadas nas preparações farmacêuticas. Segundo esses autores, os problemas criados pela contaminação microbiana podem ser minimizados pelo uso de matérias-primas que não apresentem histórico de carga microbiana ("bioburden") inaceitável, pela adoção das boas práticas de fabricação validadas para reduzir o risco de contaminação durante o processo, e pelo uso efetivo de sistemas conservantes em formulações (BONOMI & NEGRETTI, 1977).

Diante de todos os fatores que podem contribuir para a contaminação e visando a eficácia do produto e a segurança do consumidor, classicamente tem sido utilizada a adição de conservantes nas formulações. Estes, são substâncias adicionadas às formas farmacêuticas e cosméticas com o intuito de evitar a contaminação microbiana. Sua função é inibir o crescimento de microrganismos no produto, conservando-o livre de deteriorações causadas por bactérias, bolores e leveduras. Eles podem ter atividade bacteriostática e/ou fungistática, sendo utilizados principalmente nos produtos de múltiplas doses, que podem apresentar contaminação. Escolher um sistema conservante adequado para um produto cosmético requer consideração cuidadosa quanto ao tipo do produto, seu uso, características de formulação e provável desafio microbiano. A seleção definitiva do(s) agente(s) conservante(s) deve ser um compromisso entre eficácia antimicrobiana e compatibilidade com o produto (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003). A adição deste(s)

não exime o fabricante do cumprimento das Boas Praticas de Fabricação, que se adotadas, previnem o aumento da carga microbiana no produto.

Portanto, a efetividade do sistema conservante em preparações farmacêuticas ou cosméticas está relacionada resumidamente, com a composição da formulação, o tipo de material de acondicionamento, grau de pureza das matérias-primas, cumprir todas as boas práticas de fabricação, utilização correta pelo consumidor, forma de aplicação, e do próprio sistema conservante. Mesmo com todo rigor exigido de higiene durante a fabricação, controle de qualidade e uso de matérias-primas com conteúdo permissível de microrganismo, ainda existe a possibilidade de contaminação secundária. Entretanto, alguns componentes mesmo não sendo substâncias antimicrobianas típicas, podem ajudar contra a proliferação de microrganismos, aumentando a efetividade dos conservantes. Os requisitos gerais para o crescimento microbiano são: água, energia, fontes de nitrogênio, minerais e vitaminas em um ambiente com níveis adequados de oxigênio, pH e temperatura (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Os conservantes, mesmo os origem natural são substâncias intrinsecamente tóxica, portanto a concentração utilizada deve ser pequena. O sistema conservante utilizado em uma formulação pode exercer um efeito bacteriostático, ou seja, mantém o mesmo nível de microrganismos ou diminui, porém não destrói. Ou ainda um efeito biocida de destruição. A ação do sistema conservante normalmente se processa por meio da combinação com grupamentos químicos dos conservantes com as proteínas microbianas, ou através da ação competitiva com determinados processos enzimáticos.

Um sistema ideal de conservante deve ter as seguintes características:

- ✓ Amplo espectro de ação;
- ✓ Ser efetivo em extensa faixa de pH;
- ✓ Ser compatível com os demais componentes da fórmulação;
- ✓ Não afetar as características do produto como cor, odor , sabor e outro;
- ✓ Ser seguro, ou seja, atóxico, não irritante, nem sensibilizante. Ter adequado coeficiente de partição óleo em água, de modo a permitir concentração efetiva em ambas as fases,
- ✓ Inativar rapidamente os contaminantes prevenindo a adaptação microbiana;
- ✓ Fácil manipulação;
- ✓ Estar de acordo com a legislação vigente;
- ✓ Custo baixo
- ✓ Durante os testes de estabilidade a concentração do conservante deve se manter estável.

Diante dessas considerações, há a necessidade de avaliar a atividade conservante do extrato hidroalcóolico de folhas de *L. salviaefolia* através do teste de eficácia de conservantes, na formulação acondicionada, sendo então considerado como sistema conservante, uma vez que os componentes da fórmula e o material de acondicionamento podem interferir na sua atividade. A avaliação deve ser realizada por meio do Teste de Eficácia de Conservante ou Teste de Desafio Validado. O ensaio consiste na inoculação proposital do produto com microrganismos especificados pelas farmacopéias e pelo CTFA (*The Cosmetic, Toiletry, and*

Fragrance Association, 2001) e a constante monitoração constante da carga sobrevivente. Idealmente, este ensaio deve ser realizado durante o desenvolvimento da formulação, na etapa do lote piloto e industrial (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003).

Critério de aceitabilidade – CTFA (Cosmetic Toiletry and Fragance Association)

Produtos para área dos olhos e bebês

- Bactérias: redução de pelo menos 99,9% da contagem inicial no intervalo de tempo igual a 7 dias, com decaimento contínuo até a finalização do teste
- Fungos: redução de pelo menos 90% da contagem inicial no intervalo de tempo igual a 7 dias, com decaimento contínuo até a finalização do teste
- Bactérias esporuladas - ação bacteriostática durante todo o período de teste

Outros Produtos

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

3.6. Avaliação da citoxicidade em estudos histológicos – microscopia óptica, em substituto cutâneo dermo-epidérmico.

Visando valorizar o estudo *in vitro* por inúmeras razões, como econômicas, éticas, de padronização, segurança e inovação, neste trabalho foi utilizada derme humana alógena de-celularizada preservada em glicerol como suporte para a proliferação de queratinócitos humanos semeados em altas densidades. O composto dermo-epidérmico formado é constituido por derme recoberta por epitélio multi-estratificado com características morfológicas semelhantes à epiderme humana, com reorganização parcial da junção dermo-epidérmica, segundo observações feitas sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão (HERSON, M.R. 1999).

Herson, em 1999 concluiu que a derme humana acelular preservada em glicerol pode ser utilizada para o cultivo de queratinócitos diretamente em sua superfície, permitindo a construção *in vitro* de composto dermo-epidérmico com características morfológicas, resistência mecânica e antigenicidade semelhante ao sistema *in vivo*. Sugerindo seu possível uso clínico como substituto cutâneo permanente.

Equivalentes dermo-epidérmicos elaborados *in vitro* de várias maneiras, vêem sendo empregados em substituição às pesquisas *in vivo*, como por exemplo, para o estudo da fisiologia das células da pele em geral e sua interação (FRANSSON. HAMMAR, 1992), e de patologias cutâneas (MONTEIRO-RIVIÈRE et al., 1997); como modelos experimentais de rejeição a transplantes e seus mecanismos biológicos (RAMSAMOOJ et al., 1998) e para avaliação dos efeitos de fármacos e produtos

cosméticos sobre a pele substituindo estudos em animais (RÉGNIER et al., 1990), (RÉGNIER et al., 1992), (AUGUSTIN et al., 1997).

A epiderme humana é constituída pelos queratinócitos e melanócitos envolvidos na pigmentação, células de Langerhans, com função imunológica e células de Merkel, componentes do sistema nervoso.

Os queratinócitos constituem o epitélio multi-estratificado em constante processo de renovação, que forma a camada córnea, com função de barreira em relação ao meio externo. Os queratinócitos com potencial proliferativo estão na camada basal, promovendo a renovação fisiológica do epitélio, por meio da sua multiplicação em maior ou menor intensidade dependendo da predisposição genética e estímulos exógenos.

Os epitélios cultivados *in vitro* são formados por camadas de queratinócitos (oito a doze camadas), que apresentam sinais de diferenciação celular detectável por testes de imunofluorescência e através da microscopia eletrônica (STAIANO-COICO et al., 1986) (GREEN, et al., 1979).

3.7. Avaliação da segurança e citotoxicidade em cultura celular de queratinócitos humanos

Inúmeras novas substâncias são disponibilizadas no mercado atual na área farmacêutica e cosmética, assim como aditivos alimentares. Entretanto, antes de serem liberadas para uso devem ser avaliadas extensivamente, quanto a sua toxicidade. Estes testes geralmente utilizam um grande número de animais de

experimentação, o que vem sendo contestado tanto pelo público, quanto pelas sociedades protetoras de animais e mesmo pesquisadores. Na Europa, o uso de testes *in vivo* em animais foi banido para cosméticos (LOPES, 2003).

Tanto os fatores econômicos, como movimentos e pressões humanas para que, pelo menos uma parte dos testes fosse feita *in vitro*, contribuiu para a aceleração do desenvolvimento de tais metodologias. Essas utilizam linhagens especializadas de células e culturas organotípicas interativas, resultando em ensaios confiáveis e esclarecedores (FRESHNEY, 2000).

Os testes *in vitro* baseiam-se no uso de pele humana obtida geralmente de cirurgias plásticas, sendo bastante reprodutivos quando comparados aos testes *in vivo*. Uma desvantagem de se utilizar a cultura *in vitro*, é referente à obtenção deste tipo de material que nem sempre é fácil, adicionalmente ainda podem existir problemas com a variedade natural de cada pele.

Células de queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans, fibroblastos e sebócitos, podem ser isoladas da pele humana e utilizadas para testes de atividade biológica de várias formulações cosméticas e farmacêuticas, assim como substâncias puras. Cada linhagem celular é caracterizada tomando como base a em sua morfologia e função (MAJMUDAR & SMITH, 1998).

- Melanócitos: é a segunda maior população de células na epiderme. São grandes, dendritrícas e localizadas nas camadas basais da pele. Sua função é produzir melanina que protege as células vizinhas da radiação UV. Eles transportam a melanina aos queratinócitos através dos dendritos.

- Células de Langerhans: têm uma importante função no sistema imune da pele. A cultura primária destas células é menos estável que a de queratinócitos e melanócitos e, portanto, menos utilizada como modelo *in vitro*.

- Fibroblastos: células mais populosas na derme. São amplamente utilizadas na cultura celular devido a sua alta capacidade de multiplicação e vigor, quando comparada a outras linhagens celulares. São células maiores que os queratinócitos, de formato alongado, terminações pontiagudas. A função principal dos fibrosblastos é de sintetizar proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanas além das suas enzimas de degradação, como colagenase, elastase e outras metaloproteases de matriz (MAJMUDAR & SMITH, 1998).

Na cultura celular de queratinócitos, os fobroblastos têm como função promover uma camada de sustentação e interação celular, para o bom desenvolvimento dos queratinócitos (RHEINWALD & GREN, 1975a, 1975b, 1977).

- Queratinócitos: células epidérmicas de formato irregular. Sintetizam um grande número de fatores de crescimento, proteínas e enzimas (MAJMUDAR & SMITH, 1998).

Devido a facilidade de multiplicação celular *in vitro*, a cultura de queratinócitos possibilita a realização de um grande número de experimentos com o mesmo tipo de células, obtidas de um único doador (KRIWET & PARENTEAU, 1996).

Existe um protocolo de cultura de queratinócitos desenvolvido a partir de células isoladas introduzindo modificações importantes nos sistemas de culturas propostos. A cultura dos queratinócitos humanos é realizada sobre camadas de fibroblastos 3T3 murinos irradiados, que se comprovam como camada de sustentação ("feeder layer"), e a adição do Fator de Crescimento Epidérmico ('epidermal growth

factor" ou EGF) ao meio de cultura. A combinação dessas propostas permitiu estabelecer método onde queratinócitos isolados com potencial clonogênico multiplicassem podendo ser utilizados em culturas secundárias, terciárias, etc. (RHEINWALD & GREEN, 1975a, 1975b, 1977).

A toxicidade é um evento complexo *in vitro*, onde pode haver um dano celular direto; efeitos fisiológicos; efeitos inflamatórios, tanto no local de aplicação como em outros locais e outros efeitos sistêmicos e patológicos. Tais efeitos fisiológicos e sistêmicos são mais difíceis de serem monitorados *in vitro*, assim, a maioria dos testes, determina os efeitos a nível celular, ou seja, a citoxicidade (FRESHNEY, 2000).

Atualmente, os testes *in vitro* ainda não podem substituir integralmente os testes *in vivo*, eles são de extrema importância fornecendo informações úteis quanto aos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular.

Os testes de viabilidade celular são convenientes e geralmente rápidos e fáceis de realizar, eles mostram apenas as células mortas, ou seja, permeáveis, durantes a realização do teste. Enquanto os testes de sobrevivência esclarecem a capacidade de renovação celular (FRESHNEY, 2000).

O potencial irritante de xampus foi verificado utilizando cultura de queratinócitos humanos. Os testes de MTT (teste do bromato de difenil tetrazólio) e a liberação de desidrogenase láctica (LDH) foram empregados para a verificação da toxicidade celular, em que foram relatadas diferenças entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* decorrentes da reação do "patch test" sugerindo cautela ao interpretar os dados obtidos *in vitro* (EUN & JUNG, 1994).

Benassi, Bertazzoni e Seidenari em 1999 desenvolveram um estudo para comparar testes *in vitro* de culturas em monocamadas, com testes *in vivo* de "patch tests" em voluntários humanos. Todos os métodos utilizados (contagem de células, conversão do MTT, incorporação de timidina e incorporação de "Neutral Red") superestimaram a toxicidade de uma das substâncias testadas sugerindo que os dados devem ser interpretados cautelosamente.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Procedência e Taxonomia do material

A planta utilizada para a preparação do extrato foi identificada por meio de chaves específicas; a confirmação taxonômica foi realizada no Instituto de Botânica da Secretaria de Agricultura de São Paulo pela Dra. I. Cordeiro, com o depósito da exsicata voucher no Herbário daquele Instituto, sob número Silva 374. A espécie para os experimentos foi coletada sob a denominação Young 29, sendo procedente do cerrado de Itirapina no estado de São Paulo.

4.2 Descrição Anatômica da Lippia salviaefolia Cham.

Para a fixação, utilizou-se F.A.A. [formaldeído 37% (v/v): ácido acético glacial: etanol 70%(v/v); (2:1:1)], Armazenada em etanol 70%(v/v). Para a descrição histológica, foram feitos cortes a mão livre, utilizando lâmina de barbear. O material foi clarificado em solução de hipoclorito de sódio 70% (v/v) e submetido à coloração diferencial com azul de alcian 1% (p/v) e fucsina básica 1% (p/v). Cortes transversais e paradérmicos de limbo foliar e transversais de limbo, pecíolo e caule, foram montados em preparações semi-permanentes, em glicerina 50% (v/v), com gotas de formalina e analisados em microscópio óptico binocular Coleman.

4.3 Obtenção dos extratos aquoso e hidroalcóolico

4.3.1. Padronização da preparação

As folhas foram previamente dessecadas em estufa Fabre Ltda com temperatura controlada de 38 ºC e circulação de ar por quatro dias, sequencialmente divididas e pulverizadas em moinho Thomas de facas com malha de 1 mm de diâmetro (SIMÕES et al., 1999).

O processo de obtenção foi realizado por extração em Soxhlet para o extrato hidroalcólico; e decocção para o extrato aquoso. Todos os solventes utilizados tanto na extração quanto nos procedimentos cromatográficos eram de grau cromatográfico. As técnicas foram de acordo com as recomendações dos compêndios oficiais (Farm. Bras II), (EUROPEAN pharmacopoea, 1999), (PHARMACOPÉE francaise, 1965). Pesaram-se cerca de 50 g da planta pulverizada em balança eltrônica, sequencialmente foram extraídas com etanol PA, até a exaustão, por três dias, à temperatura aproximada de 70 ºC. O extrato seco foi concentrado em rota evaporador e posteriormente liofilizado. Com o resíduo da extração anterior foi feita uma extração por decocção, a partir de cerca de 30 g da planta. A padronização da obtenção dos extratos foi efetuada em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Moreno do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os extratos obtidos foram armazenados, devidamente acondicionados sob refrigeração.

A partir dos extratos etanólico e aquoso foram feitos testes iniciais de eficácia como conservantes naturais.

4.3.2. Partição do extrato hidroalcóolico

O extrato etanólico foi submetido à partição para verificação da fração com maior atividade antimicrobiana. Pesaram-se 10,45 g do extrato etanólico liofilizado que foi dissolvido em cerca de 100 mL de hexano, acondicionado em banho de ultra-som, por 2 minutos e filtrado em Funil de Büchner sob pressão reduzida. A técnica foi repetida três vezes, obtendo desta forma a fração hexânica. Em seqüência, o resíduo desta primeira extração, após filtração, foi tratado com clorofórmio empregando-se a mesma técnica descrita para a primeira fração. Após obtenção da fração clorofórmica, repetiu-se todo o procedimento utilizando como solvente o acetato de etila para obtenção da fração de acetato de etila. E por fim, o resíduo da fração de acetato de etila foi extraído com n-butanol empregando a mesma técnica, obtendo a fração butanólica. Para secagem dos extratos utilizou-se evaporador rotatório a vácuo. Desta forma, obtiveram-se quatro frações diferentes a partir do extrato etanólico de *L. salviaefolia*. Todas as frações foram concentradas em rota-evaporador e posteriormente liofilizadas.

4.3.3. Separação da fração obtida em acetato de etila: extração em fase sólida

Para o fracionamento da fração de acetato de etila obtida a partir do extrato total de *L. salviaefolia*, foram utilizados os seguintes métodos cromatográficos: Coluna

Cromatográfica e Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (MITAINE, 1998; VERPOORTE, 1986, MITAINE, 1996).

4.3.3.1. Coluna Cromatográfica

Foi realizada inicialmente uma separação prévia através de uma coluna cujas características estão descritas na tabela 3:

Tabela 3: Características da coluna utilizada na separação preliminar dos componentes da fração de acetato de etila.

Fase Estacionária (FE)	**Sílica PF**
Peso de FE (g)	50,0
Peso da amostra (g)	1,0
Diâmetro (cm)	3,5

Pesou-se 1,0 g da fração de acetato de etila, proveniente do extrato total das folhas de *Lippia saviaefolia*, sendo solubilizada em metanol e incorporada a uma pequena porção de sílica (aproximadamente 0,5 g), posteriormente depositada na parte superior da coluna para realizar separação. Como fase móvel, utilizou-se a mistura diclorometano: metanol em diferentes proporções conforme descrito na tabela 4. Todas as extrações foram realizadas em duplicata, cada fração obtida foi concentrada e liofilizada. Depois de liofilizada cada fração foi submetida a avaliação de sua atividade antimicrobiana para identificação da fração com melhor resultado.

Tabela 4: Fase móvel utilizada na coluna para a separação dos componentes da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* e frações obtidas.

Proporção (CH_2Cl_2 : MeOH)	Volume utilizado (mL)	Fração obtida
10:0	2x100	1 e 2
9:1	2x100	3 e 4
8:2	2x100	5 e 6
7:3	2x100	7
1:1	2x100	8
0:10	2x100	9

4.3.3.2. Cromatografia em Camada Delgada

As frações obtidas na separação preliminar descrita no item 4.3.2 foram novamente fracionadas através de cromatografia em camada delgada. Para tanto foram empregadas placas contendo uma camada de 1mm de sílica gel PF254 (MERCK).

Os sistemas eluentes utilizados eram compostos por diclorometano e metanol na proporção volumétrica de 9:1.

Antes de efetuar a corrida cromatográfica a cuba foi previamente saturada com o próprio sistema eluente.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

4.3.3.3. Análise Estrutural

Para a realização da análise estrutural utilizou-se o cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama. Os espectros de massas foram feitos no dispositivo acoplado a CG-EM computador Hewlett Packard 5989A. Os espectros obtidos foram comparados com bancos de espectros do próprio aparelho assim como com dados espectrais da literatura.

4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana estudo prévio

4.4.1. Preparação das amostras

No estudo da atividade antimicrobiana, os extratos hidroalcoólico e aquoso, assim como as diferentes frações do extrato etanólico, foram diluídas em dimetilsufoxido (DMSO): metanol (1:1). As concentrações correspondentes são expressas em termos de miligramas (mg) do extrato ou fração por mililitros (mL) do solvente.

4.4.2. Microrganismos

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada contra quarto tipos de microrganismos: bactéria Gram-positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); Gram-

negativos: *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); e fungo: *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.4.3. Método de difusão em ágar.

Os organismos testados foram inoculados em um "slant" de "Trypic Soy Agar" (TSA) para as bactérias, e "Sabouraud Dextrose Agar" (SDA) para o fungo. Depois de um período de incubação de 24 h a 32 °C para bactéria e 25 °C para o fungo, as culturas foram suspensas em solução salina estéril e ajustadas de modo a obter uma leitura turbidimétrica comparável com o padrão de McFarland nº 05. A partir dessas suspensões microbianas, 1,0 mL foi dissolvido em 4,0 mL de TSA para bactéria e SDA para o fungo, sequencialmente, estes 5 mL resultantes constituíam a segunda camada da placa de Petri, com uma primeira camada de 10 mL de agar sem microrganismo. De modo asséptico, próximo ao fogo, com ferramentas apropriadas foram feitos alguns poços com aproximadamente 6 mm de diâmetro, onde as frações e os extratos foram depositados para estudo de suas ações. Em cada placa de Petri foram feitos 5 poços: um utilizado como controle negativo, outro para controle positivo, e os três restantes para as amostras em triplicada.

Três concentrações foram preparadas para o extrato aquoso, e o extrato etanólico total: 20, 10 e 5 mg/mL. Enquanto duas concentrações foram preparadas para as frações do extrato etanólico. 40,0 µL de cada solução (extrato aquoso, extrato etanólico e frações) eram colocadas nos poços. Em cada placa de Petri existia um poço contendo uma solução de 40 µL DMSO: Metanol (50:50) v/v usado como

controle negativo, e como controle positivo um poço com 20 µL de uma solução padrão de (1mg/mL) de cloranfenicol, (potência: 100.000 UI/mL), para bactérias; nistatina, (potência: 100.000 UI/mL) para fungo; e amicacina, (potência: 916 µg/mg), para *Pseudomonas aeruginosa*. As placas eram incubadas por 24 h a 32 °C (bactérias) e por 48 h a 25 °C (fungo). Os diâmetros das zonas de inibição resultantes foram medidos por "Antibiotic Zone Reader – Fisher- Lilly" (mm). Cada experimento foi repetido ao memos três vezes. A zona de inibição mensurada corresponde à média dos diâmetros das zonas de inibição encontradas.

4.5. Determinação da CMI dos diferentes extratos.

Os microrganismos testados foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Aspergillus niger* ATCC16404.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos que apresentaram melhores resultados no teste por difusão em ágar, foi realizada através da CMI e visou a seleção dos extratos que foram incorporados nas formulações cosméticas. O ensaio utilizado foi pelo método de microdiluição em meio líquido com técnicas assépticas (ELOFF,1998). Para maior confiabilidade dos resultados, a determinação da CMI dos extratos selecionados foi avaliada, após incubação com temperatura controlada, por espectrofotometria em microplacas. Esse teste é uma adaptação do procedimento de diluição em meio líquidos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2001) que utiliza maior volume

(10 mL), com os volumes de inóculo, reduzindo amostra e meio de cultura para 230 µL, possibilitando maior número de réplicas. Em uma etapa inicial, foi padronizado e validado o método, o equipamento utilizado foi o leitor de microplacas LM-LGC fornecendo precisão de leitura espectrofotométrica.

Em cada poço foram colocados 200 µL descritos a seguir; C: controle negativo (meio); Cs: controle do solvente (meio, microrganismo e solvente); Cc: controle de crescimento (meio e microrganismo); C+: Controle positivo (meio, microrganismo e antimicrobiano de referência); Cext: controle do extrato (meio e extrato); e amostras estudas nas concentrações apropriadas. Para todas essas variáveis são utilizados no mínino quatro poços de cada microplaca.

4.5.1. Determinação da CMI da Naringenina

Através do estudo em Cromatografia Gasosa- Espectrofotômetro de Massa (CG-EM) foi constato que os três principais compostos majoritários cujo padrão de fragmentação, da fração 4 descrita anteriormente (tabela 4), fora compatível são 4',5-Dihidroxi-7-metoxi-flavonona, a naringenina, e o apiflorol. Devido a acessível disponibilidade no mercado atual da naringenina foram realizados testes para determinação da sua CMI frente aos microrganismos: *S. aureus* ATCC 6538, *E. Coli* ATCC 10536, *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *A. niger* ATCC 16404. Tais valores serviram de base para comparação com o extrato total e as frações ativas da *L. salviaefolia.*

4.6. Desenvolvimento e seleção de pré-formulações cosméticas

As bases cosméticas utilizadas envolveram: emulsão (creme), gel e xampu. Nesta etapa denominaram-se de *pré-formulações cosméticas* aquelas que foram desenvolvidas com finalidade de serem submetidas ao estudo de estabilidade acelerada (CHARLET, 1996, DRAELOS, 1999; PRISTA, BAHIA, VILLAR, 1992; PRUNIÉRAS, M., 1994)

Foram preparadas 6 formulações preliminares (2 emulsões, 2 géis e 2 xampus) selecionadas a partir do aspecto sensorial através de critério pessoal (espalhamento adequado na pele, toque sedoso e aspecto). Estas formulações foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade física (centrifugação e estresse térmico), e ao teste de estabilidade acelerada. Ao final destes testes foi eleita uma formulação de emulsão, uma de gel e uma de xampu, com as quais se prosseguiu o teste de eficácia de conservante. A composição de cada formulação preliminar está descrita abaixo:

Emulsões (cremes):

CREME A

Componente	**% p/p**
1) Cera auto-emulsionante não iônica	10,0
2) Óleo mineral	2,0
3) Acetato de cetila e álcool de lanolina acetilado	1,0
4) Silicone volátil	3,0
5) Sesquiestearato de metilglicose PEG-20	2,0
6) Propilenoglicol	5,0
7) Extrato da fr. ac. etila *L. salviaefolia*	0,2
8) Essência	q.s.
9) Água destilada q.s.p.	100,00

O procedimento para o preparo do Creme A envolveu o aquecimento das fases aquosa e oleosa separadamente, até a temperatura de 70-75 °C. Quando essas atingiram este valor, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, de forma lenta e constante e com auxílio da agitação mecânica (*Mixer* da Wallita). Após a obtenção da emulsão, homogeneizou-se até seu resfriamento a 40 °C e acrescentaram-se o ciclometicone, a essência e o extrato, previamente diluído em q.s. etanol P.A.. O valor de pH da formulação foi corrigido para 6,0 -6,5

CREME B

Componente	**% p/p**
1) Álcool cetoestearílico etoxilado	2,0
2) Monoestearato de glicerila	1,0
3) Acetato de cetila e álcool de lanolina acetilado	1,0
4) 2-octil-dodecanol	4,0
5) Silicone volátil	0,3
6) Sesquiestearato de metilglicose PEG-20	2,0
7) Glicerina	5,0
8) Hidroxietilcelulose 2% p/v	20,0
9) Extrato da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*	0,2
10) Essência	q.s.
11) Água destilada q.s.p.	100,0

Misturaram-se, com auxílio da espátula de plástico, o Hostacerin® SAF e q.s. de água destilada flexível. Adicionaram-se a essência e o extrato homogeneizando-se o sistema. O valor de pH da formulação foi corrigido para 6,0 -6,5.

GEL

GEL A

Componente	**% p/p**
1) Hidroxietilcelulose	2,0
2) Propilenoglicol	6,0
3) Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	2,0
4) Extrato da fr. ac etila de *L. salviaefolia*	0,2
5) Essência (Cosmetic 258)	q.s.
6) Água destilada q.s.p.	100,0

Hidratou-se a hidroxietilcelulose com q.s. de água destilada na temperatura de 50 ºC e agitou-se com espátula de plástico flexível até a formação do gel. Adicionaram-se o propilenoglicol, a essência (previamente dispersa no Procetyl® AWS) e o extrato, completando-se a massa do gel com q. s. p. de água destilada e homogeneizou-se da mesma maneira descrita. O valor de pH da formulação estava entre 6,0 e 6,5

GEL B

Componente	**% p/p**
1) Polímero carboxivinílico	0,8
2) Propilenoglicol	5,0
3) Hidróxido de sódio (solução 20%)	q.s. pH 6,0
4) Poliol de éster de ácido graxo	0,8
5) Extrato da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*	0,2
6) Essência (Cosmetic 35)	0,2
7) Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	2,0
8) Água destilada q.s.p.	100,0

O polímero carboxivinílico foi disperso em q.s. de água destilada e permaneceu em repouso por 3 h, a fim de completar a hidratação. Após esse período, foi adicionado o propilenoglicol homogeneizando-se com auxílio de espátula de plástico flexível. A essência e o Cetiol® HE foram previamente dispersos em Procetyl®AWS e adicionados à mistura, e posteriormente o extrato homogeneizando-se o sistema. A formulação foi pesada, completou-se a massa com água destilada e corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5, com auxílio do hidróxido de sódio e homogeneização manual descrita anteriormente.

Xampu A

Componente	**% p/p**
1) Lauril éter sulfato de sódio	20,0
2) Lauril sulfato de trietanolamina	5,0
3) Dietanolamida de ácidos graxos de coco	3,0
4) Essência	0,3
5) Corante	q.s.
6) Propilenoglicol	5,0
7) Ácido citríco (solução 10% p/v)	pH 6,0
8) Cloreto de sódio (solução 20% p/v)	acerto de viscosidade
9) Água destilada	58,0
10) Extrato da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*	0,02

Pesaram-se os componentes lauril éter sulfato de sódio, lauril sulfato de trietanolamina e dietanolamida de ácidos graxos e homogeneizou-se com auxílio de espátula de plástico flexível. Adicionaram-se 50 g de água destilada com agitação suave. Acrescentaram-se o corante, a essência e o extrato, completou-se a massa com água destilada e misturou-se suavemente. Corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5 com ácido cítrico, adicionou-se a solução de cloreto de sódio até obter o espessamento adequado (observada visualmente e característica de um xampu) e homogeneizou-se o sistema.

Xampu B

Componente	**% p/p**
1) Lauril sulfosuccinato dissódico e lauril sulfato de sódio	10,0
2) Lauril sulfato de sódio	5,0
3) Diestearatoglicol, tensoativo aniônico e anfótero	1,5
4) Cocoamido propil betaína	8,0
5) Fosfato 3-oleílico	0,5
6) Hidróxido de sódio	q.s. pH 6,0
7) Cloreto de sódio (solução 20% p/v)	acerto de viscosidade
8) Perfume	q.s.
9) Extrato da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*	0,02
10) Água desmineralizada q.s.p.	100,0

Pesaram-se o lauril sulfossuccinato dissódico, o lauril sulfato de sódio (Genapol®SSB), o lauril sulfato de sódio (Genapol®LSS), o distearato glicol (Genapol®EGL), a cocoamidopropil betaína (Dehyton® KB) e o fosfato 3- oleílico (Hostaphat®0-300) e homogenizou-se suavemente com auxílio de espátula de plástico flexível. Foram incorporados à formulação, q.s. de água destilada, a essência e o extrato, completou-se o volume com água destilada e misturou-se suavemente com a mesma agitação. Corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5 com hidróxido de sódio e adicionou-se a solução de cloreto de sódio, até alcançar espessamento adequado (observada visualmente e característica de um xampu) e homogeneizou-se o sistema.

4.6.1 Estudo de estabilidade acelerada das pré-formulações cosméticas

Todas as *pré-formulações cosméticas* foram submetidas a estudo de estabilidade acelerada (MORETTO, 1999) (ANVISA,2004).

Com o intuito de avaliar criteriosamente a atividade conservante dos extratos da *L. salviaefolia* nas pré-formulações cosméticas descritas acima, estas foram submetidas a condições drásticas "Stress test". Antes de iniciar o estudo de estabilidade o produto foi submetido ao teste de centrifugação e ao estresse térmico.

Testes preliminares de estabilidade física para as emulsões

Centrifugação

Dez gramas das formulação (creme A e creme B) foram submetidas a ciclos de rotação de 1000, 2500 e 3500 rpm em centrífuga, durante quinze minutos para cada velocidade.

Estresse térmico

As amostras (Creme A e B e Xampu A e B) foram colocadas em banho-maria termostatizado, entre 40 e 80 °C. Realizou-se a elevação da temperatura de 10 em 10 °C, mantendo por 30 minutos em cada valor. Foram avaliadas as amostras ao término do teste (80 °C), após as mesmas retornarem à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 ºC).

Teste de estabilidade acelerada

Após 24 horas de preparo, considerado como to (tempo inicial), as formulações escolhidas, creme A e B, gel A e B e xampu A e B, foram submetidas às seguintes condições e períodos de avaliação:

A) Armazenamento

a) Temperatura ambiente (luz solar indireta)

As formulações foram mantidas à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 ºC), durante 14 dias, sendo avaliadas no 3º, 7º e 14º dias.

O produto foi exposto à luz solar de forma indireta e não diretamente ao sol. Pois a luz solar direta pode alterar significativamente a cor e o odor do produto e levar à degradação de componentes da formulação.

b) Estufa a 45 ºC

As preparações foram submetidas à temperatura de 45,0 ± 2,0 ºC em estufa, durante 14 dias, sendo avaliadas no 1º, 3º, 7º e 14º dias.

c) Ciclos gela e degela

As formulações foram submetidas a ciclos de congelamento (-10,0 ± 2,0 ºC) por 24 horas em *freezer*, seguido de descongelamento e aquecimento em estufa (50,0 ± 2,0 ºC) por 24 horas, completando-se dessa forma um ciclo. As amostras foram submetidas a seis ciclos, sendo avaliadas no 3º (6º dia) e 6º ciclos (12º dia).

d) Freezer

As formulações foram mantidas à temperatura de -10,0 ± 2,0 °C em *freezer*, durante 14 dias e avaliadas no 7º e 14º dias.

e) Refrigerador (geladeira)

As formulações foram mantidas em refrigerador (6,0 ± 2,0 °C), durante 14 dias e avaliados no 3º, 7º e 14º dias.

B. Avaliação inicial

Após 24 horas do preparo (to), cada formulação foi avaliada quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e de viscosidade aparente. Os resultados obtidos em to foram considerados como referência para comparação com as demais leituras das amostras, em todas as condições, durante o Teste de Estabilidade Acelerada.

C. Variáveis analisadas

a) Características organolépticas: foram observados os aspectos da preparação, a separação de fases da emulsão, a presença de grumos e precipitados; o odor e a cor. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos com as amostras em To, considerada a amostra de referência.

b) pH (valor e variação): as amostras foram diluídas em água destilada, previamente neutralizada, possuindo valor de pH igual a 7,0, na proporção de 1:10 (p/v) e realizaram-se os ensaios das amostras obtidas nas diversas condições de

temperatura em peagâmetro, quando estas atingiram à temperatura ambiente de 22 °C e foram comparadas com aquela obtida em to

c) Viscosidade aparente: Para as amostras de Creme A e B; e Gel A e B a viscosidade foi avaliada somente de forma visual, constatando se houve separação de fases, quebra da emulsão, e consistência por análise sensorial. Já para as amostras de Xampu A e B foi feita à leitura da viscosidade em Viscosímetro Visco Star-R, à temperatura ambiente de 22 ºC, empregando-se como parâmetros de *spindle* e de velocidade de agitação (rpm) – Para o Xampu A houve quebra da formulação com a adição da *L. salviaefolia,* sendo que não foi possível aferir a viscosidade desde o to. Para o Xampu B – foi utilizado agulha TR 8; e 100 rpm. As leituras obtidas nos intervalos de tempo nas diversas condições de temperatura foram comparadas com aquela obtida em to.

d) Critérios de inclusão e exclusão

Foram adotados os seguintes critérios para aprovação ou rejeição das amostras avaliadas nos Testes de Estabilidade Preliminar e Acelerada, descritos a seguir (BABY, 2005; MAIA et al, 2000):

D1) Aspecto: integridade das amostras mantendo seu aspecto inicial nas condições de armazenamento, permitindo leves alterações nas temperaturas elevadas, *freezer* e ciclos.

D2) Cor e odor. foram aceitas leves alterações nas diversas condições de

armazenamento.

D3) Valor de pH: foi aceita como variação máxima o valor de ± 10%, em todas condições de armazenamento.

D4) Viscosidade aparente: foram admitidas variações, desde que não comprometessem a percepção visual das amostras.

4.7. Teste de eficácia do conservante natural L. salviaefolia

4.7.1. Microrganismos

Os microrganismos desafiantes utilizados na validação e no teste de eficácia de conservantes foram: *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6548), *Burkholderia cepacia* IAL 1834 ATCC (17759), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

Os microrganismos foram provenientes do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e identificados como: *Escherichia coli* IAL 2393 (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1874 (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* IAL 1875 (ATCC 6548), *Burkholderia cepacia* IAL 1834 ATCC (17759), *Candida albicans* IAL 1611 (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* IAL 2122 (ATCC 16404).

4.7.2. Preparação e padronização das suspensões microbianas

A princípio foi necessária a preparação da suspensão de cada microrganismo de acordo com as instruções apresentadas no rótulo dos frascos contendo os microrganismos liofilizados. A manutenção dos microrganismos foi por meio da realização de estrias sobre a superfície inclinada de meios de cultura de ágar caseína soja para as bactérias, e de ágar sabouraud-dextrose 4 % para os fungos, em tubos de ensaio de 18 mm x 200 mm. Os meios de cultura foram previamente preparados conforme orientação do fabricante (Difco), esterilizados, transferidos assepticamente para tubos de ensaios estéreis e resfriados de forma a obter a superfície inclinada. Após o repique, incubaram-se os tubos, para as bactérias a 30 – 35º C por 24 h, para levedura a 20 – 25 ºC por 48 h e para o bolor a 20 – 25 ºC por 5 dias.

A massa celular resultante desse crescimento, foi recolhida com 9 mL de solução salina a 0,9 % (p/v) estéril e considerou-se como suspensão microbiana padrão. A contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) da suspensão foi realizada pela técnica de semeadura em profundidade. Nesta técnica são transferidas para as placas de Petri estéreis, em triplicata, 1,0 mL das diluições de 10^{-4} à 10^{-7} da suspensão microbiana, obtidas por diluições decimais seriadas em tubos contendo 9 mL de solução salina estéril a 0,9 % (p/v). Adicionaram-se as alíquotas, 15 a 20 mL de meio de cultura resfriados em cerca de 45 - 50 °C de ágar caseína soja para as bactérias ou ágar sabouraud-dextrose 4% para fungos e a seguir fez-se a homogeneização em movimentos suaves em forma de oito. Após solidificação do meio de cultura, incubaram-se essas placas à 30 – 35 ºC, para as bactérias em estufa por 48 horas e os fungos, à 20 – 25 ºC, por 5 dias. O número de Unidades

Formadoras de Colônia (UFC) por mL foi determinado a partir das placas que obtiveram contagem entre 30 e 300 UFC para as bactérias e leveduras e entre 10 a 100 UFC para o bolor, utilizando-se um contador de colônias.

As suspensões obtidas, através da massa celular resultante do crescimento do repique, foram mantidas em refrigerador, por um período de no máximo dois dias.

4.7.3. Meio de cultura e diluente

Os meios de cultura foram preparados a partir da mistura complexa desidratada e esterilizados conforme as instruções do fabricante (Difco), assim como o diluente Dey Engley (D/E) contendo os inativantes: tioglicolato de sódio (0,1% p/v) ; tiossulfato de sódio (0,6% p/v); bissulfito de sódio (0,25% p/v), polissorbato 80 (0,5% p/v) e lecitina de soja (0,7% p/v). As soluções salinas a 0,9% (p/v) estéreis foram preparadas por dissolução de q.s. de NaCl em q.s. de água destilada, após preparo da solução esta foi esterilizada em calor úmido.

4.7.4. Enumeração ou contagem de microrganismos viáveis (USP XXIX, JP XIV)

Para a contagem de microrganismos em meio sólido, foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade, onde as alíquotas da amostra teste e da solução salina a 0,9% (p/v) foram transferidas para placas de Petri estéril, em réplicas de três e submetidas à leitura com auxílio de contador de colônias.

4.7.5. Validação da metodologia / Escolha de condição de neutralização do sistema conservante (USP XXIX)

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

Para a escolha de condição de neutralização ou inativação do sistema conservante, o estudo foi conduzido com as formulações de creme A, Gel B e Xampu B. Esses produtos foram preparados em condições assépticas e considerados como a amostra-teste. Como controle da viabilidade dos microrganismos utilizou-se solução salina 0,9% (p/v).

Os microrganismos utilizados para a escolha da condição de recuperação foram os descritos no item 4.7.1.

As condições de neutralização estudadas foram:

- Condição 1

Amostra-teste diluída na razão 1:10, com solução salina 0,9% (p/v) e ágar caseína soja ou ágar sabouraud-dextrose 4% com inativadores [0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja].

- Condição 2

Amostra-teste diluída na razão 1:10, com diluente Dey Engley (D/E) contendo os inativantes químicos em sua composição, descritos no item 4.7.3., e ágar caseína soja ou ágar sabouraud-dextrose 4%

Controle

Solução salina a 0,9% (p/v) estéril

Para 5 placas de Petri estéril foram transferidas alíquotas de 0,5 mL da suspensão padrão de microrganismo preparado de modo a obter 100 a 200 UFC. Adicionou-se 1 mL da amostra – teste e 15 a 20 mL de ágar caseína soja ou de ágar sabouraud-dextrose 4% resfriados até cerca de 45 a 50 °C. Homogeneizou-se a mistura e após solidificação completa do meio de cultura, as placas contendo ágar caseína soja foram incubadas a temperatura de 30 – 35°C, por cerca de 2 dias e as placas contendo ágar sabouraud-dextrose 4% à temperatura de 20 – 25°C, por cerca de 5 dias. O mesmo procedimento foi utilizado para a solução salina, considerada no experimento como controle.

O critério da escolha da condição de neutralização do sistema conservante, para cada microrganismo deve ser no mínimo de 70% de recuperação (USP XXIX). Foi calculada a média dos valores de Unidades Formadoras de Colônias obtidas da amostra teste e do controle. A porcentagem de recuperação de cada microrganismo foi relacionada entre o valor médio de UFC da amostra teste e o valor médio de UFC do controle. Assim, a média de recuperação total da condição de ensaio foi obtida pelas porcentagens de cada microrganismo. Por ser teste limite, os valores foram calculados e considerando como < 70% ou > 70%.

4.7.6. Teste de Eficácia de Conservantes das formulações

As amostras do Creme A, Gel B e Xampu B foram avaliadas quanto à eficácia do sistema conservante. O teste de desafio foi executado para cada um dos microorganismos a seguir mencionados:

Escherichia coli IAL 2393 (ATCC 10536)

Pseudomonas aeruginosa IAL 1874 (ATCC 9027)

Burkholderia cepacia IAL 1834 ATCC (17759)

Staphylococcus aureus IAL 1875 (ATCC 6548)

Candida albicans IAL 1611 (ATCC 10231)

Aspergillus niger IAL 2122 (ATCC 16404)

Aproximadamente 20g de cada amostra teste foi inoculada com um dos microrganismos desafiantes em cerca de 10^5 a 10^6 UFC/g, proveniente da suspensão previamente padronizada conforme descrito anteriormente e respeitando-se a relação entre o volume do inóculo e da suspensão, para ser menor ou igual a 1% (p/v) do volume da amostra. Imediatamente após a inoculação, foi homogeneizado por um minuto em agitador e submetido à diluição seriada e à contagem das colônias de microrganismos viáveis (UFC/g), pela técnica de semeadura em profundidade. Para o procedimento de diluições decimais empregou-se o diluente Dey Engley (D/E). Como meio de cultura foi utilizado ágar caseína soja e ágar sabouraud-dextrose 4%.

As amostras desafiadas e os controles foram mantidos em temperatura ambiente no decorrer do teste. A periodicidade de cada avaliação do sistema conservante das amostras foi de acordo com os critérios estabelecidos, que se encontram a seguir. Ressalta-se que, para todos os métodos utilizados na avaliação da eficácia de sistema conservante, foram realizados ensaios logo após a inoculação do microrganismo, considerado tempo zero (t_0).

Para a verificação da viabilidade dos microrganismos durante os testes, realizou-se o mesmo procedimento utilizado para amostra, embora empregando solução salina 0,9 % (p/v), considerado no ensaio como controle da viabilidade do microrganismo.

Os tempos para a avaliação, no presente trabalho, foram logo após a inoculação e após 2, 7, 14, 21 e 28 dias. Foram nomeados, respectivamente, de t_0, t_2, t_7; t_{14}; t_{21} e t_{28}.

4.7.7. *Critério de aceitação do teste de eficácia de conservante natural*

Os critérios de aceitação adotados foram os mesmos descritos no CTFA – The cosmectic, Toiletry and Fragance Association, 2001.

O ensaio é considerado eficaz para formulações cosméticas em geral se ocorrer:

Bactérias: redução de 3 ciclos logarítmicos em 7 dias, e nenhum aumento durante o período do ensaio.

Fungos (Bolores e Leveduras): redução de 1 ciclo logarítmico em 7 dias, e nenhum aumento durante o período do ensaio.

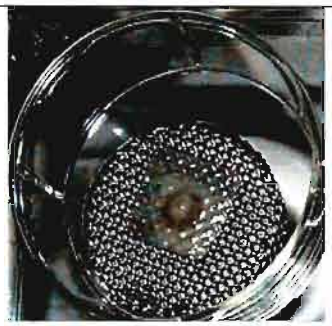
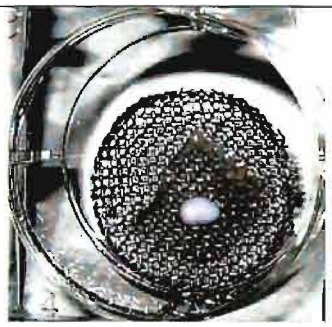
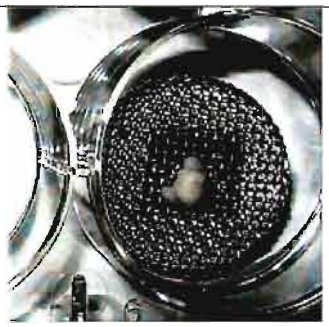
4.9. Avaliação da segurança das formulações cosméticas sem e com incorporação de L. salviaefolia em estudos histológicos – microscopia óptica em substituto cutâneo dermo-epidérmico

4.8.*1. Substituto cutâneo dermo-epidermico.*

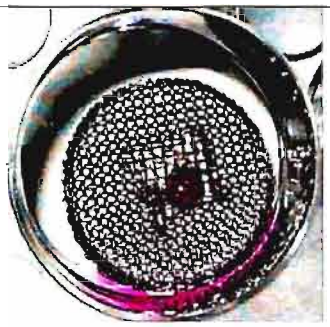
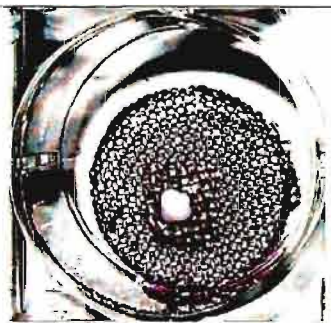
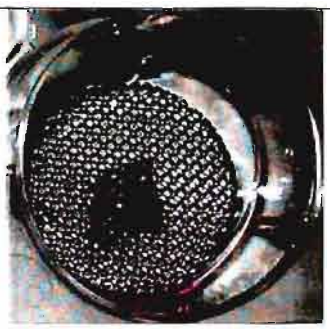
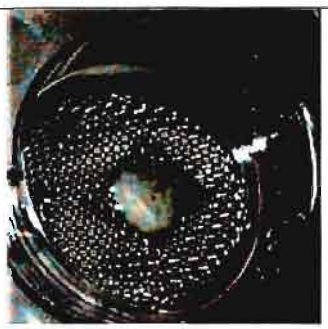
Os substitutos cutâneos dermo-epidérmico foram preparados no laboratório de cirurgia e microcirurgia, Lin 4, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Centro de Biologia Molecular no IPEN, de acordo com o procedimento descrito por HERSON em 1999. Inicialmente foram preparadas as bases dérmicas. Sequencialmente, foram preparadas culturas secundárias de queratinócitos sobre as bases dérmicas em cultivo na interface ar-líquido.

A derme foi preparada com 2 x 2 cm^2 e mantida em PBS (Phosphate Buffered Saline – Solução Salina Fosfato Tamponada), foi colocado um anel sobre a derme para semear os queratinócitos em alta densidade, deixando "overnight" para retirar o anel. No sétimo dia o conjunto foi passado para o sistema de rede em placas de seis poços. As culturas foram mantidas em estufa de cultivo com atmosfera de CO_2 a 5%, à temperatura constante de 37 ºC, sendo que em cada poço continham 3 mL de KGM (Keratinocyte Growth Medium), o meio de cultivo foi trocado a cada dois dias até o 14º dia e diariamente até o 21º dia. Para início do teste de avaliação de segurança todo meio foi aspirado e, com o auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL, colocou-se 1 gota (cerca de 20-30 µL) de cada amostra (gel, creme e xampu sem e com a incorporação de *L. salviaefolia*) sobre os compostos cultivados na interfase ar-líquido, em uniplicata, mantendo um poço como controle sem a adição de amostra.

Quadro 1: Avaliação da segurança das formulações cosméticas em substituto cutâneo dermo-epidérmico com 24 horas de contato.

Avaliação da segurança das formulações cosméticas – 24 h. de contato		
Controle	Gel	Gel com *L. salviafolia*
		
Controle	Creme	Creme com *L. salviaefolia*
		
Controle	Xampu	Xampu com *L. salviaefolia*

Quadro 2: Avaliação da segurança das formulações cosméticas em substituto cutâneo dermo-epidérmico com 48 horas de contato.

Avaliação da segurança das formulações cosméticas – 48 h. de contato		
Controle	Gel	Gel com *L. salviafolia*
Controle	Creme	Creme com *L. salviaefolia*
		
Controle	Xampu	Xampu com *L. salviaefolia*
		

4.8.2. Estudo histológico – Microscopia óptica

Depois de adicionado às amostras nos compostos cultivados na interfase ar-líquido, os sistemas foram mantidos por 24 horas ou 48 horas no meio de cultivo. O sistema dermo-epidérmico foi lavado 3 vezes com PBS e transferido, com o auxílio de uma pinça e agulha, para um papel de filtro. Sequencialmente o sistema foi tratado e fixado, para microscopia óptica, por 24-72 horas, em geladeira, com paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão cacodilato de sódio pH 7,2. Foi lavado novamente três vezes com PBS e deixado em álcool 70% na geladeira.

Os sistemas foram enviados para o departamento de cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para desidratação, inclusão em parafina, cortes e coloração por hematoxilina-eosina.

A análise da morfologia da pele humana, sistema dermo-epirdérmico, foi feita em microscópio óptico, com aumento de 1000 vezes (microscópio Labophot – Nikon).

4.9. Teste de citotoxidade da L. salviaefolia em cultura celular de queratinócitos humanos

4.9.1. Condições do teste de citoxicidade

Os ensaios foram realizados em condições assépticas, em ambiente controlado de fluxo laminar biológico, todos os materiais e regentes foram esterilizados, por filtração esterilizante, calor seco ou úmido, radiação esterilizante ou óxido de etileno,

de acordo com a natureza de cada um. Os experimentos foram realizados no Centro de Biologia Molecular no IPEN, e supervisão da Dra. Mônica B. Mathor do Centro de Tecnologia das Radiações da mesma instituição.

4.9.1.1. Obtenção de Fibroblastos

As células CCL-92 foram cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's Médium (DMEM), contendo piruvato (concentração final de 110mg/L); 10% de soro bovino, penicilina-estreptomicina (50 UI mL^{-1} - 50µL.mL^{-1}), fungison (5 UI mL^{-1} - 50 µL.mL^{-1}) e glutamina (4mM). Ambas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera de 97% de umidade relativa e 5% de CO_2, até atingirem a confluência, antes de serem irradiadas com 60 Gy com radiação gama para a utilização como camada de sustentação.

4.9.1.2 Obtenção de Queratinócitos

Os queratinócitos de epiderme humana foram cultivados a partir de biópsia de pele de aproximadamente 2 cm^2. As peles foram cortadas em pequenos pedaços tripsinizadas (tripsina 0,05%; EDTA 0,02% e glicose 0,01%) sob agitação branda a 37 °C por 3 horas, retirando as células tripsinizadas a cada meia hora. Estas células podem ser utilizadas para o teste logo após a tripisinização ou congeladas em criopreservante [DMSO 10% (v/v), soro fetal bovino 30% (v/V) e meio KGM sem EGF 60% (v/v)] acondicionadas em um recipiente contendo álcool isopropílico, para o decréscimo gradual da temperatura, sendo que após 4 horas ao atingir a temperatura

pode ir para o nitrogênio líquido. ou então, em freezer – 80 ºC, por 24 horas e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

As células descongeladas em suspensão foram semeadas (2 x 10^6 células/25 cm^2) em uma camada de sustentação ("feeder layer") de fibroblastos CCL-92, irradiados a 60 Gy (6000 rads) e cultivados em KGM (keratinocyte Growth Médium) a 37 ºC em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO_2. O KGM é constituído por Dulbecco's modified Eagle's Médium (DMEM) e Ham's F12 (na proporção de 2:1), contendo solução uso de fungison (5 $\mu g.mL^{-1}$), 10% de soro fetal bovino, glutamina (4 mM), penicilina-estroptomicina (50 UI mL^{-1} - 50$\mu L.mL^{-1}$), adenina (0,18 mM), solução estoque de triiodotironina (5 $\mu g.mL^{-1}$), insulina (5 $\mu g.mL^{-1}$), hidrocortizona (0,4 $\mu g.mL^{-1}$), toxina colérica (0,1 nM), triiodotironina (20 pM) e EGF (10 ng/mL, "epidermal growth factor"). Este é o meio de cultura rotineiramente utilizado na reconstituição *in vitro* de epiderme e mucosa. Esta passagem é chamada de P1.

Culturas primárias subconfluentes foram tripsinizadas e passadas em densidades variadas segundo as necessidades. Esta propagação pode ser efetuada por diversas vezes consecutivas, sendo denominadas de passagens ou repiques. Assim temos P2, P3, P4...

4.9.2. Cultura celular

4.9.2.1. Quantidade inicial de células

Foram semeados em triplicata, em poços de placas de 96 poços, queratinócitos em quantidades crescentes variando de 2.500 a 50.000 células, (sem a camada de

sustentação) e deixados incubando por um período de 72 horas a 37 °C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO_2. Este período corresponde ao tempo total de ensaio de viabilidade

Após o período de incubação, as células foram coradas com o corante não vital Rodamina B ($C_{28}H_{31}C_1N_2O_3$), que é incorporado tanto nas células vivas quanto nas mortas.

As placas foram coradas com aproximadamente 50 µL de uma solução de rodamina 2% (p/v) em formaldeído 4% (v/v) por 10 minutos, sendo posteriormente lavadas com água corrente até a eliminação total do excesso de corante. (MATHOR, 1994).

4.9.2.2. Avaliação da viabilidade celular

Preparou-se solução estoque na concentração de 2 mg/mL, solubilizando-se o extrato seco de acetato de etila de *L. salviaefolia* em polietilenoglicol 400 (PEG 400).

Os queratinócitos HK186 em baixa densidade (com camada de sustentação) formada por Fibroblastos CCl-92 previamente irradiados com 60 Gy, na passagem P0 foram amplificados para uma garrafa de 75 cm^2 em meio KGM. À partir de cultura primária, após atingir a quantidade de células necessárias, foram tripsinizados e semeados a 50.000 células/poço de HK186 em duas placas "multiwell" de 96 poços. Após 24 horas foram adicionados 100 µL das diluições seriadas necessárias da solução mãe de *L. salviaefolia* em PEG para atingir as concentrações de 2%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,125% (p/v) da fração de acetato de etila do extrato de *L. salviaefolia*

em meio KGM, recém preparado e previamente esterilizado por filtração, em triplicatas.

As amostras foram mantidas em contato com essa solução de *L. salviaefolia* por 2, 6, 24 e 48 horas. Foi feito também um controle sem tratamento, onde foi adicionado o meio de cultura KGM em 11 replicas e mantidas em incubação até o fim de teste (48 horas). E a avaliação da interferência do solvente: após o período de incubação o meio de cultura foi trocado por meio KGM, contendo quantidades crescentes do solvente 0, 5%, 1%, 2%, a serem testados e então a placa foi novamente incubada nos intervalos de tempo de 2, 6, 24 e 48 horas, para o intervalo de tempo 2 horas foram utilizadas apenas as concentrações de 2% e 1%, ou seja, reproduzindo as condições mais drásticas do teste de viabilidade celular para *L. salviaefolia*.

Após estes períodos pré-estabelecidos de contato, trocou-se o meio de cultura por KGM e as amostras foram mantidas até o final do teste, 2 dias, sendo então submetidas a coloração por rodamina (avaliação qualitativa) e MTS (avaliação quantitativa) para verificação da viabilidade celular.

Coloração com MTS/PMS: Após 48 horas, as soluções, contidas nos poços, foram aspiradas e adicionaram-se alíquotas de 120 μL da solução MTS/PMS em KGM em todos os poços da placa, que foi imediatamente acondicionada em estufa de atmosfera controlada a 37 °C, com 5 % de CO_2 e 95 % de umidade relativa, por 2 horas. Decorrido este período inicial, foi realizada a primeira medida de absorbância, a 490 nm, em espectrofotômetro de placa de ELISA acoplado a impressora. Incubou-se novamente a placa e tomaram-se mais três leituras, com intervalo de 1 hora.

Com o intuito de se quantificar a proliferação das células, aplicou-se o método colorimétrico intitulado Cell Titer 96® - Ensaio Aquoso não radioativo de proliferação celular (PROMEGA CORPORATION, 2001), que tem o seguinte princípio: o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) é biorreduzido pelas enzimas deseidrogenases, encontradas nas células ativas de fibroblastos (NIH 3T3), a um produto (formazana) que é solúvel no meio de cultura celular e que absorve fortemente a 490 nm. Desta forma, a absorbância da formazana pode ser medida diretamente nos poços da placa Multiwell 96, sem nenhum processo adicional. A quantidade de formazana medida pela absorbância da solução a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células vivas, em cultura (PROMEGA CORPORATION, 2001).

Para preparação das soluções de MTS/PMS em KGM: soluções de MTS e PMS foram descongeladas em banho termostatizado, a 37 °C, por 10 minutos. Na preparação foi utilizado transferiu-se 15,873 % de MTS, para um tubo de fundo cônico contendo 83,333 % de meio de cultura celular (KGM). Em seguida foi adicionado 0,794 % de PMS agitando a solução vigorosamente.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

5. RESULTADOS E COMENTÁRIOS

5.1 Descrição anatômica de Lippia salviaefolia Cham.

5.1.1. Limbo Foliar

O limbo foliar possui uma epiderme unisseriada, revestida por cutícula lisa e delgada. O mesofilo, com aspecto compacto, é dorsiventral ou heterogêneo assimétrico, com 1-2 camadas de parênquima paliçádico e 2-3 de lacunoso. Existe muitos tricomas tectores unicelulares e abundantes tricomas glandulares sésseis (Figs. 3 e 4). O feixe vascular da nervura central , em ferradura, é colateral (Figura 3).

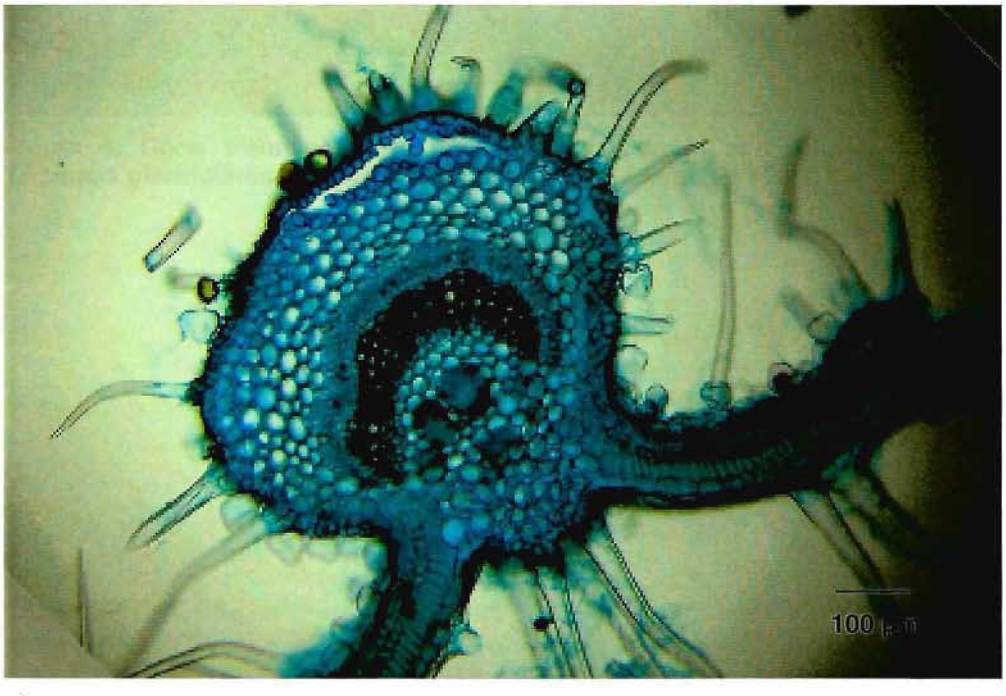


Figura 3: Corte transversal (C.T.) do limbo folicular, passando pela nervura central da *L. salviaefolia*. Aum. de 100 x.

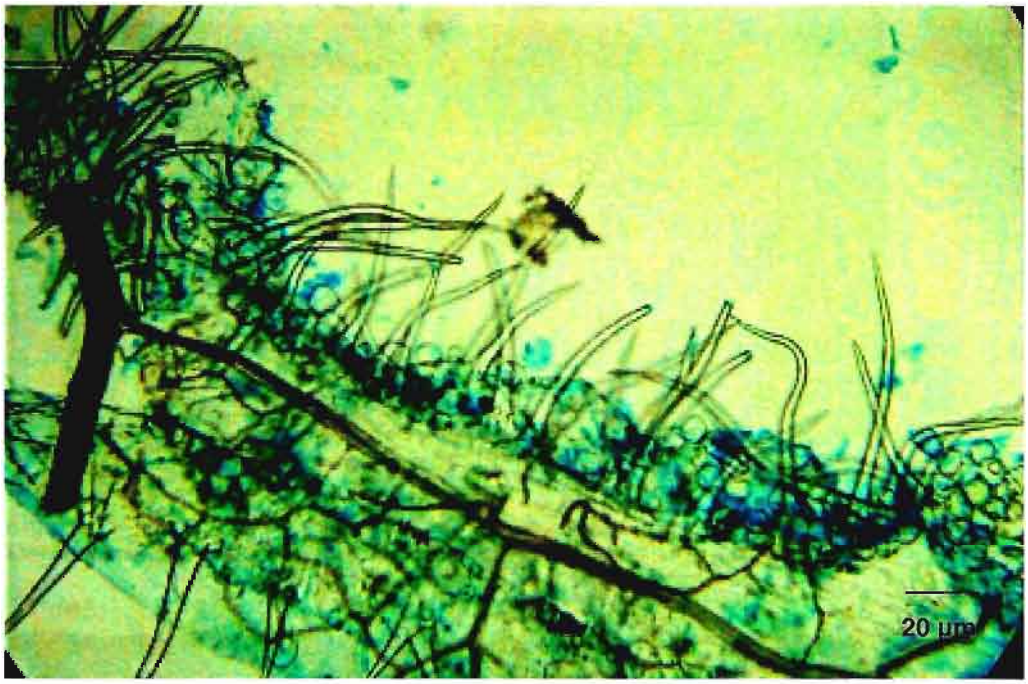


Figura 4: Corte transversal do limbo folicular da *L. salviaefolia*. Detalhe: Tricomas glandulares sésseis e tricomas tectores. Aum. de 400 x.

Os estômatos possuem células guarda com a morfologia característica da Classe Magnoliopsida (Figura 5 e 6).

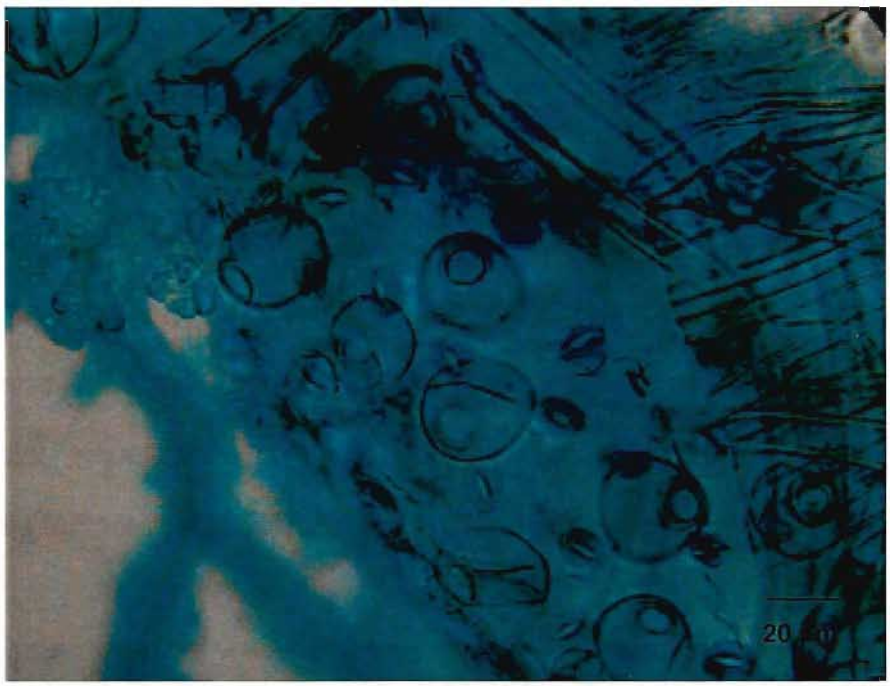


Figura 5: Corte paradérmico do limbofolicular da *L. salviaefolia*. Detalhe: estômatos com células-guarda reniformes. Aum. de 400 x.

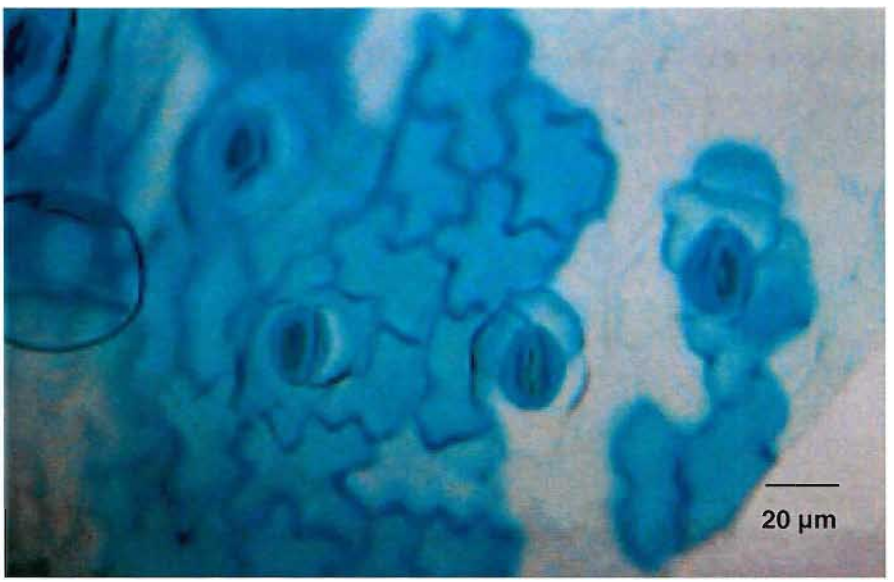


Figura 6: Corte paradérmico do limbofolicular da *L. salviaefolia*. Detalhe: estômatos com células-guarda reniformes. Aum. de 400 x.

5.1.2. Pecíolo

O pecíolo possui uma epiderme unisseriada, formada por células diminutas, com cutícula delgada. A região cortical é preenchida por parênquima homogêneo isodiamétrico, com meatos. Há colênquima angular (3-4 camadas), abaixo da epiderme. O feixe vascular exibe um início de desenvolvimento secundário, com esparsas fibras de esclerênquima do floema primário, acima do floema secundário. O xilema secundário apresenta–se rico em elementos de vaso, com poucas fibras esclerenquimáticas (Figura 7). Os mesmos tricomas glandulares com óleo essencial, visualizados no limbo, foram vistos no pecíolo (Figura 8). Há, ainda, tricomas tectores unicelulares (Fig. 7).

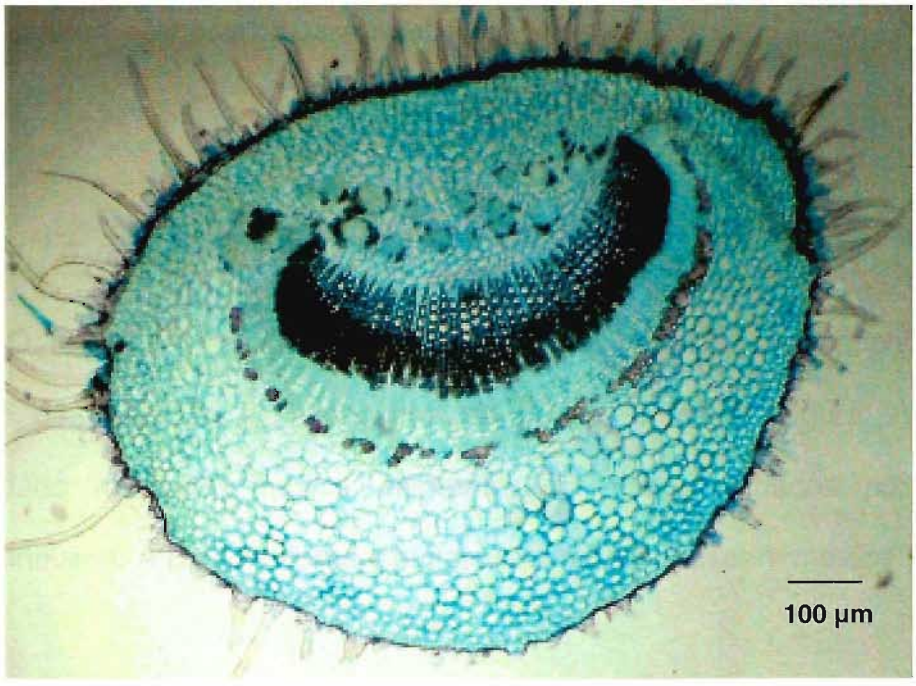


Figura 7: Corte transversal do pecíolo da *L. salviaefolia.* Visão geral. Aum. de 100 x.

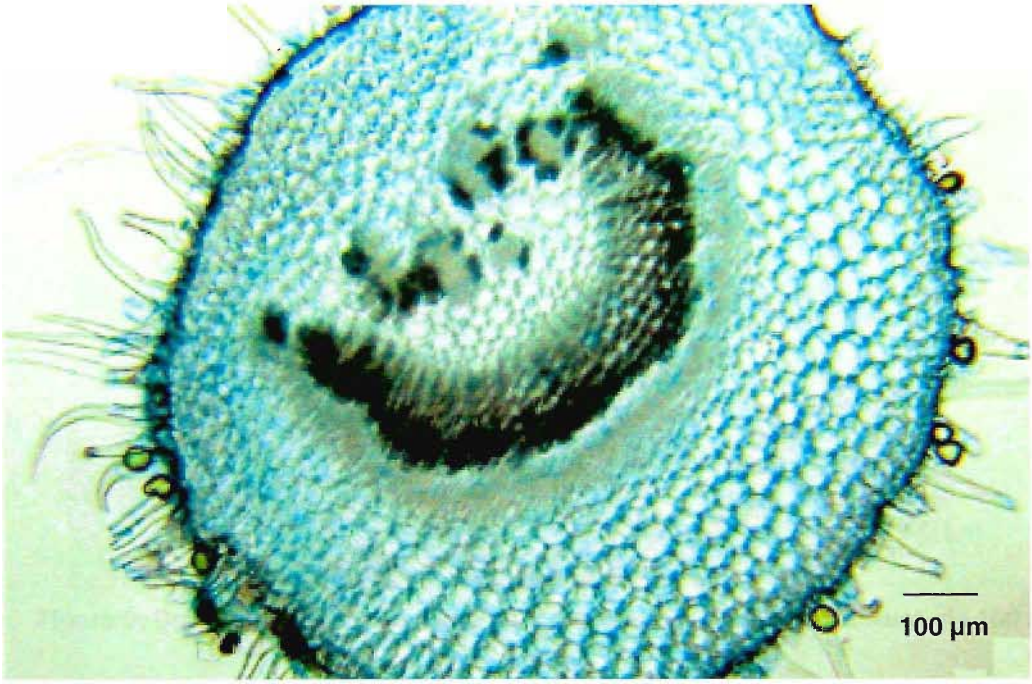


Figura 8: Corte transversal do pecíolo da *L. salviaefolia.* Detalhe: Tricomonas glandulares sésseis, com óleo essencial. Aum. de 100 x.

5.1.3. Caule

O caule, em início de desenvolvimento secundário, apresenta extensas calotas de fibras de esclerênquima do floema primário (Figura 9). O xilema secundário apresenta muitos elementos de vaso, cercados por fibras de esclerênquima. A medula apresenta parênquima comum, com meatos (Figuras 9 e 10).

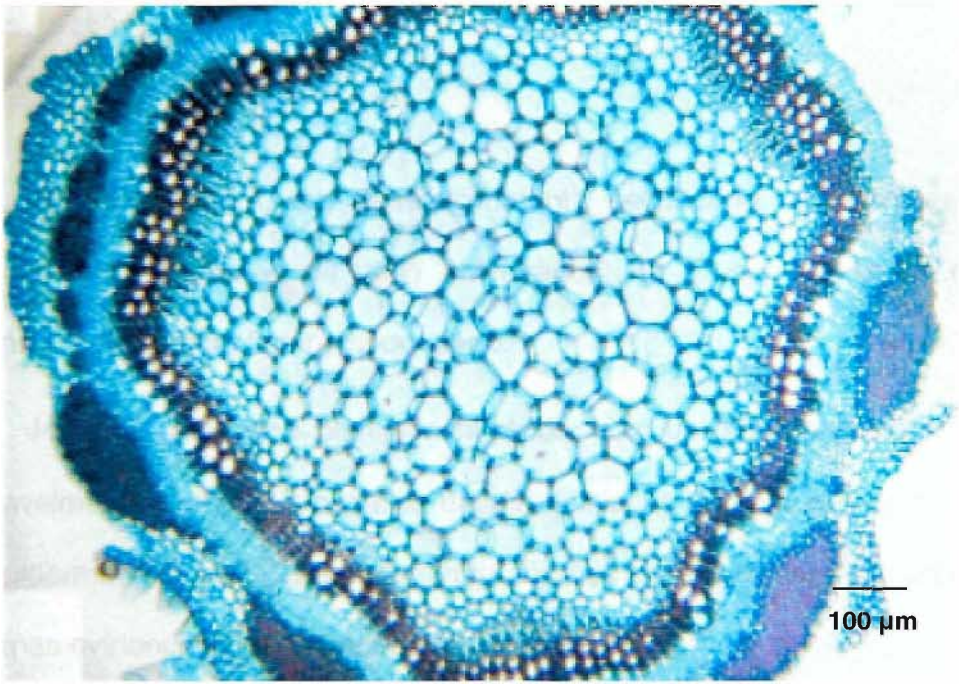


Figura 9: Corte transversal do caule da *L. salviaefolia.* Visão geral. Aum. de 100 x.

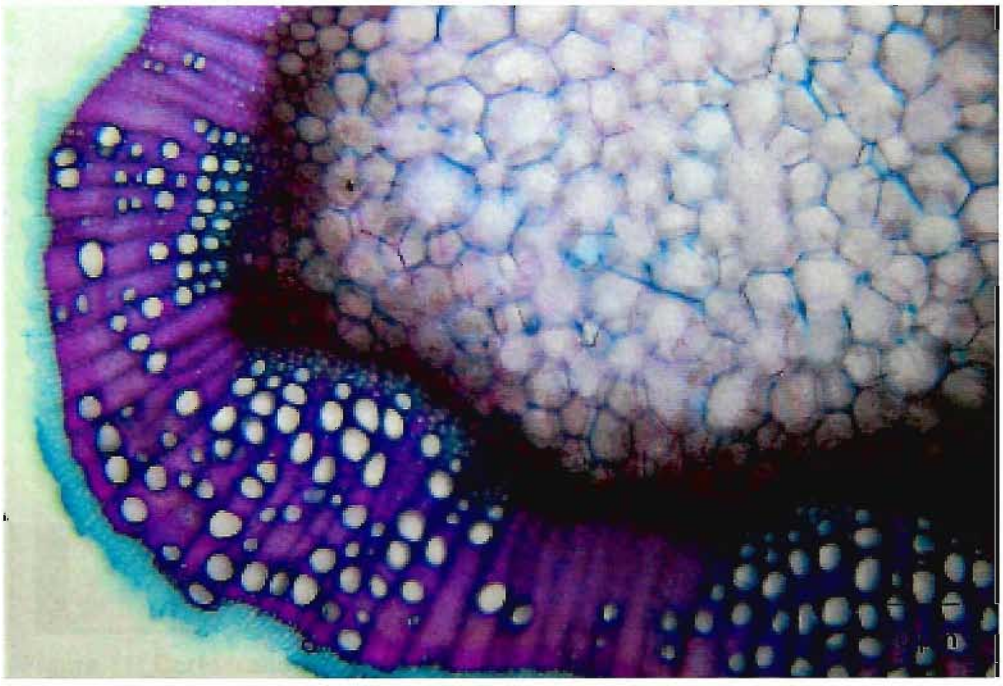


Figura 10: Corte transversal do caule da *L. salviaefolia.* Detalhe: Xilema secundário. Aum. de 400 x.

5.1.4. Raiz

A raiz pentarca, em desenvolvimento secundário, apresenta um xilema formado por elementos de vaso enfileirados; há grupos de fibras de floema primário, em torno do floema secundário.

Há uma periderme bem desenvolvida, com um súber repleto de suberina, provavelmente formado a partir da desdiferenciação de camadas corticais, abaixo da epiderme (Figura 11). Externamente ao súber, a epiderme e camadas corticais externas evidenciam uma descamação (Figura 11).

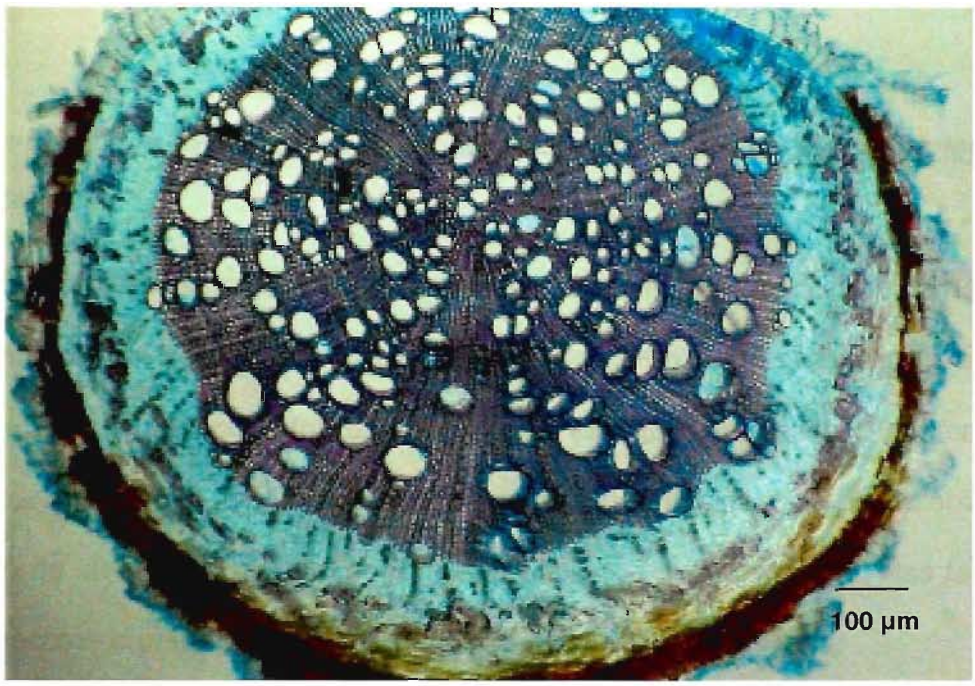


Figura 11: Corte transversal da raiz da *L. salviaefolia.* Visão geral. Aum. de 100 x

Por meio da descrição anatômica da *L. salviafolia* confirma-se que a mesma pertencente a família das Verbenáceas, do grande grupo das Dicotiledôneas, devido às características anatômicas freqüentes desta família. O gênero *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. Estas espécies estão distribuídas principalmente pelos países da América do Sul e América Central, e pelos territórios tropicais da África (TERBLANCE; KORNELIUS, 1996). No Brasil, ocorrem nas regiões de cerrado. Seu hábito vegetativo é caracterizado como arbusto com folhas aromáticas, tubo da corola amarelado e flores brancas aromáticas.

5.2. Obtenção dos extratos aquoso, hidroalcoólico e frações da L. salviaefolia

Os extratos hidroalcoólico e aquoso foram obtidos conforme descrito no item 4.3.1, após constatação da ineficiência do extrato aquoso como agente antimicrobiano, e ação do extrato hidroalcóolico foi feita a partição extrato hidroalcóolico conforme o item 4.3.2 para obtenção das frações e estudo de suas atividades antimicrobianas, com o intuito de identificar a fração com melhor atividade antimicrobiana. Nas tabelas 5 e 6 são descritos o peso seco e rendimento de cada extrato e frações.

Tabela 5: Rendimento dos extratos aquoso e hidroalcóolico obtidos da *L. salviaefolia*

Rendimento dos extratos aquoso e hidroalcóolico de *L. salviaefolia*		
Extrato	**Massa (g)**	**Rendimento % (p/p)**
Aquoso	2,10	7
Hidroalcóolico	15,40	30,8

Tabela 6: Rendimento das frações obtidas a partir da partição do extrato hidroalcóolico de *L. salviaefolia*

Rendimento das frações do extrato hidroalcóolico de *L. salviaefolia*		
Fração	**Massa (g)**	**Rendimento % (p/p)**
Hexânica	0,45	4,31
Clorofórmica	2,21	21,19
Acetato de Etila	4,32	41,34
Butanólica	0,24	2,30

Como pode ser observado, a fração que apresenta maior rendimento é a fração de acetato de etila, com um rendimento de 41,34% (tabela 6).

5.2.1.: Separação fração obtida em acetato de etila: extração em fase sólida

Após a partição e estudo da atividade antimicrobina por meio de difusão das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica. Constatou-se que frações ativas são: a fração de acetato de etila e a fração clorofórmica. Feita uma análise em CCD, verificou-se que as frações clorofórmica e de acetato de etila tem composição parecida. Devido ao fato de terem composição parecida e ao CMI das duas frações serem parecidos, a fração de acetato de etila, por ter maior massa – melhor rendimento e apresentar melhor facilidade de manuseio, devido a menor concentração de compostos graxos – foi escolhida para seguirmos com os experimentos para a extração em fase sólida, por coluna cromatográfica.

5.2.1.1. Coluna Cromatográfica

A partir da extração em coluna cromatográfica da fração de acetato de etila obtemos as frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, como descrito na tabela 4. Cada uma dessas frações foi submetida ao estudo de atividade antimicrobiana (Figura 17) à 1,0 mg/mL frente a *S.aureus*, microrganismo mais sensível aos testes de atividade antimicrobiana. Possibilitando a identificação das frações com atividade antimicrobiana considerável e conseqüente de maior interesse para o estudo em questão. Sendo as frações 3 e 4 que apresentaram melhor atividade antimicrobiana (Figura 17).

5.2.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise em CCD foi realizada como um "screening", possibilitando identificação das frações que apresentam os compostos majoritários. Verificou-se que os compostos majoritários estão nas frações 3 e 4 (Figura 12). Assim como as melhores atividades antimicrobianas (Figura 17). A análise constitucional foi realizada pelo CG-EM.

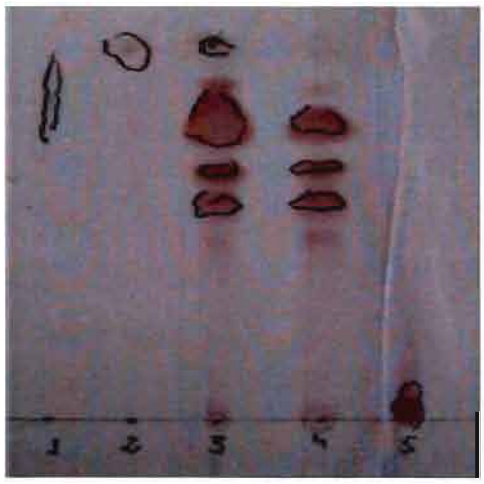


Figura 12: Cromatografia em camada delgada das fr. ec. etila de *L. salviaefolia* **(1-5)**

5.2.1.3. Análise estrutural do extrato de L. salviaefolia

A análise estrutural foi realizada apenas para as frações mais purificadas e com maior atividade antimicrobiana, pois nestas frações estão os componentes de interesse, com maior atividade antimicrobiana. Devido à semelhança de composição entre as frações 3 e 4, observada em CCD, somente a fração 4 foi submetida à

análise estrutural por CG-EM. A análise por CG-EM da fração 4 obtida com os procedimentos de separação revelou a presença de flavononas (Figura 13). Os três principais compostos majoritários cujo padrão de fragmentação é compatível são 4',5-Dihidroxi-7-metoxi-flavonona (tempo de retenção = 17,032), a naringenina (tempo de retenção= 17,537 min.), e o apiflorol (tempo de retenção = 17,988).

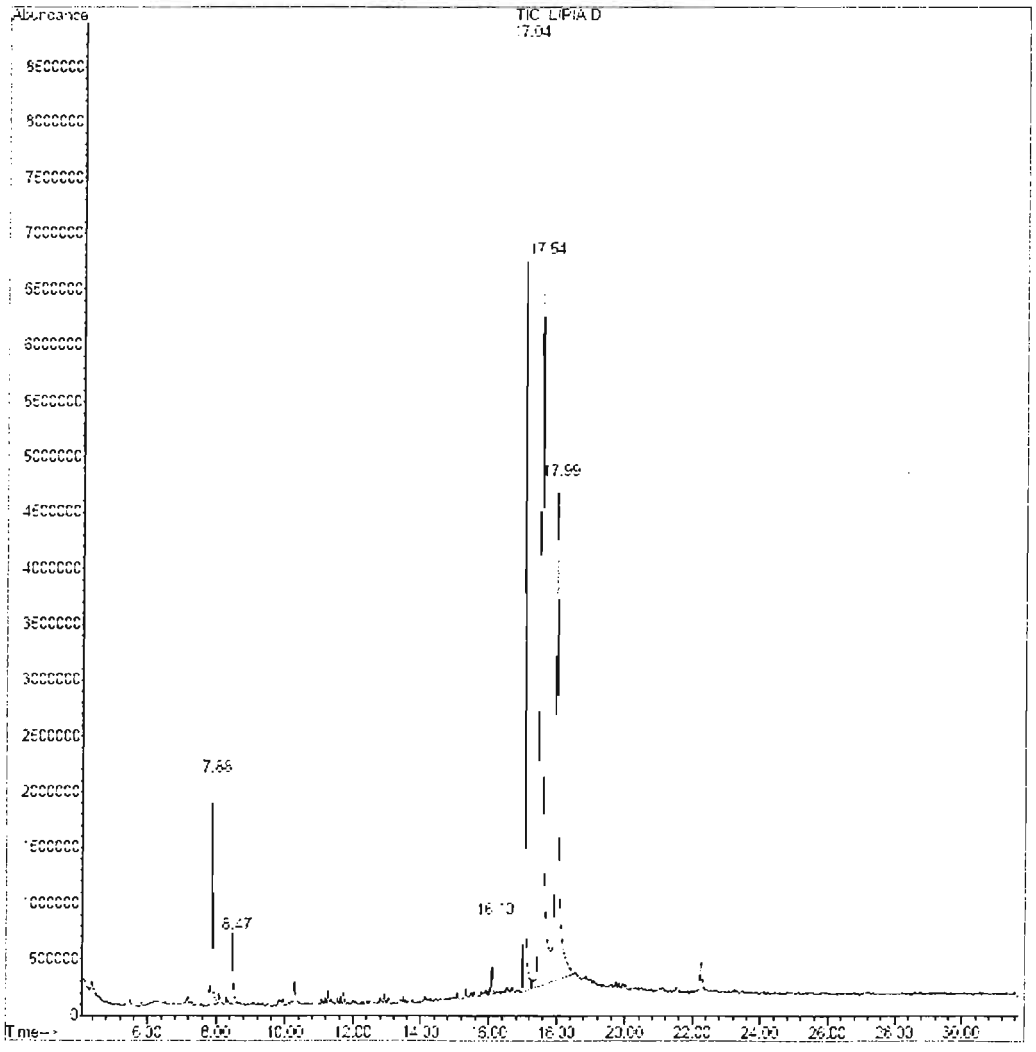


Figura 13: Espectros da fração 4 da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*. Análise por CG-EM.

5.3. *Avaliação da atividade antimicrobiana prévia*

5.3.1. Método de difusão em ágar

O teste de difusão é um teste semi-quantitativo, ou seja, não fornece uma correspondência entre dose resposta, devido as dificuldades de difusão das substâncias pelo ágar , como descrito na revisão de literatura (COLLINS, 1995). Por esse motivo foi utilizado como um "screening" inicial para verificação das frações e extratos com atividade antimicrobiana. Os resultados da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar dos extratos aquosos etanólicos e das frações do extrato etanólico estão presentes na tabela 7. Salientando que não foi observada nenhuma atividade do extrato aquoso, assim como para o extrato etanólico e suas frações frente a *P. aeruginosa*. Entretanto, pode-se observar que o extrato etanólico mostrou boa atividade antimicrobiana contra *S. aureus, E. coli, e C. albicans*. Os diâmetros das áreas de inibição mensurados, referentes aos extratos estudados ficaram entre 13,3 - 1,3 mm dependendo do microrganismo estudado.

Tabela 7: Atividade antimicrobiana, mensurada pelo diâmetro de inibição do crescimento, dos extratos de *L. salviaefolia* e frações pelo método de difusão em ágar.

Método e difusão em ágar, diâmetro do halo de inibição (mm) dos extratos e frações de *L. salviaefolia*

Amostras	*S. aureus*	*E. coli*	*C. albicans*	*P. aeruginosa*
EE (20 mg/mL)	10,9 ± 0,68	11,3 ± 0,77	5,5 ± 0,66	i
EE (10 mg/mL)	9,1 ± 0,34	8,4 ± 0,57	3,5 ± 1,05	i
EE (5 mg/mL)	7,3 ± 0,09	6,9 ± 0,08	1,3 ± 0,94	i
EAq (20 mg/mL)	i	i	i	i
Fr.H. (10 mg/mL)	i	i	i	i
Fr.$CHCl_3$. (10 mg/mL)	10,8 ± 0,33	13,3 ± 0,68	3,4 ± 0,43	i
Fr.$CHCl_3$. (5 mg/mL)	9,1 ±0,34	12,7 ±0,68	2,9 ± 0,09	i
Fr.Ac.Et. (10 mg/mL)	10,7 ± 0, 47	10,7 ± 0,52	2,4 ± 0,05	i
Fr.Ac.Et. (5 mg/mL)	8,3 ± 0,38	8,3 ± 0,38	1,7 ± 0,25	i
Fr.ButOH. (10 mg/mL)	i	i	i	i
Cloranfenicol	18,25 ± 1,55	15,87 ± 0,89	-	-
Nistatina	-	-	21,11 ± 1,71	-
Amicacina	-	-	-	17,72 ± 1,83

Legenda:
i: inativo; -: teste não realizado ; EE: extrato etanólico de *L. salviaefolia*, EAq: extrato aquoso de *L. salviaefolia*, Fr.H.: fração hexânica; Fr.$CHCl_3$: fração de clorofórmio; Fr.Ac.Et.: fração de acetato de etila; Fr.ButOH.: fração butanólica.

As frações hexânica e butanólica não apresentaram atividade frente a nenhum dos microrganismos testados. Entretanto, no estudo referente às frações clorofórmicas e de acetato de etila, estas foram efetivas mostrando uma boa atividade antimicrobiana frente *S. aureus, E. coli* e *C. albicans*, somente para a *P. aeruginosa* estas frações não foram ativas (tabela 7), assim como para estudo do extrato etanólico total.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7, pode-se notar que os valores referentes às zonas de inibição para a fração de acetato de etila estão bem próximos daqueles apresentados pela fração clorofórmica, sendo que os valores das zonas de inibição para fração de acetato de etila são levemente menores do que os valores correspondentes à fração clorofórmica.

Os resultados apresentados pelo método de difusão em ágar mostraram que as frações ativas não são as frações com polaridade extremas. Dentre as frações analisadas as frações com atividade relevante foram: a fração clorofórmica e a fração de acetato de etila.

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso, do extrato etanólico total e das frações de *L. salviaefolia* foi estudada pelo método de difusão em ágar contra quatro microrganismos: um Gram-positivo (*S. aureus*), dois Gram-negativos (*E.coli e P. aeruginosa*) e um fungo (*C. albicans*). Os resultados demonstraram considerável atividade antimicrobiana para o extrato etanólico total e para as frações clorofórmica e de acetato de etila. Dentre o extrato e as frações ativas nenhuma apresentou atividade contra *P. aeruginosa*. Este fato pode ser atribuído à maior dificuldade de penetração na parede celular de bactérias Gram-negativas em relação a Bactérias Gram-positivas (FENNEL, 2004). Porém, no extrato de *L. salviaefolia,* aprensentou

atividade a *E. coli* (bactéria Gram-negativa). Além do mais é importante ressaltar que estamos trabalhando com o extrato bruto e não com substâncias ativas isoladas. Contudo, se as substâncias ativas fossem isoladas, a potência do agente antimicrobiano, proveniente do extrato de *L. salviaefolia,* poderia aumentar consideravelmente.

Frente aos prévios resultados obtidos pode-se afirmar que a espécie *L. salviaefolia* é um agente natural com potente eficácia antimicrobiana. Em estudos realizados consta a observação que em "screening" de plantas medicinais empregadas com agentes antimicrobianos, estas frequentemente apresentou atividade somente contra cepas de bactérias Gram-positivas (poucas são ativas contra bactérias Gram-negativas) HERRERA, et al, 1996; KELMANSON, et al, 2000; ALI, et al, 2001.

Rabanal e colaboradores (2002) ao comparar o método de difusão em ágar com o método de diluição assim como microdiluição, verificaram que o método de difusão em ágar não reproduz o efeito dose-resposta, chegando à conclusão que este fato pode ser explicado pela difusão limitada dos extratos em meio sólido. Esta afirmação pode sugerir que o extrato de *L. salviaefolia* seria ativo em uma dosagem menor do que aquelas apresentadas no estudo referente ao método de difusão. Logo o método de difusão em ágar foi utilizado apenas como um "screening" para encontrarmos as frações ativas. O CMI do extrato total como das suas frações de *L. salviaefolia* foi determinado pelo método de microdiluição.

5.4. Determinação da CMI dos diferentes extratos.

Os resultados referentes à determinação da CMI confirmam os resultados apresentados pelo teste de difusão em ágar. As frações hexánica e butanólica são inativas. Porém como se pode observar na tabela 8, o extrato total, fração clorofórmica, fração de acetato de etila, e as frações 3 e 4 provenientes da fração de acetato de etila foram ativas frente *S.aureus, E. coli, C. albicans* e *A. niger*. Por outro lado, somente as frações clorofórmica e a de acetato de etila foram ativas frente a *P. aeruginosa*.. A naringenina também não se monstrou eficaz frente ao *A. niger* enquanto que as demais substâncias testadas o foram. (Fig.: 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,24,25,26, 27 e 28).

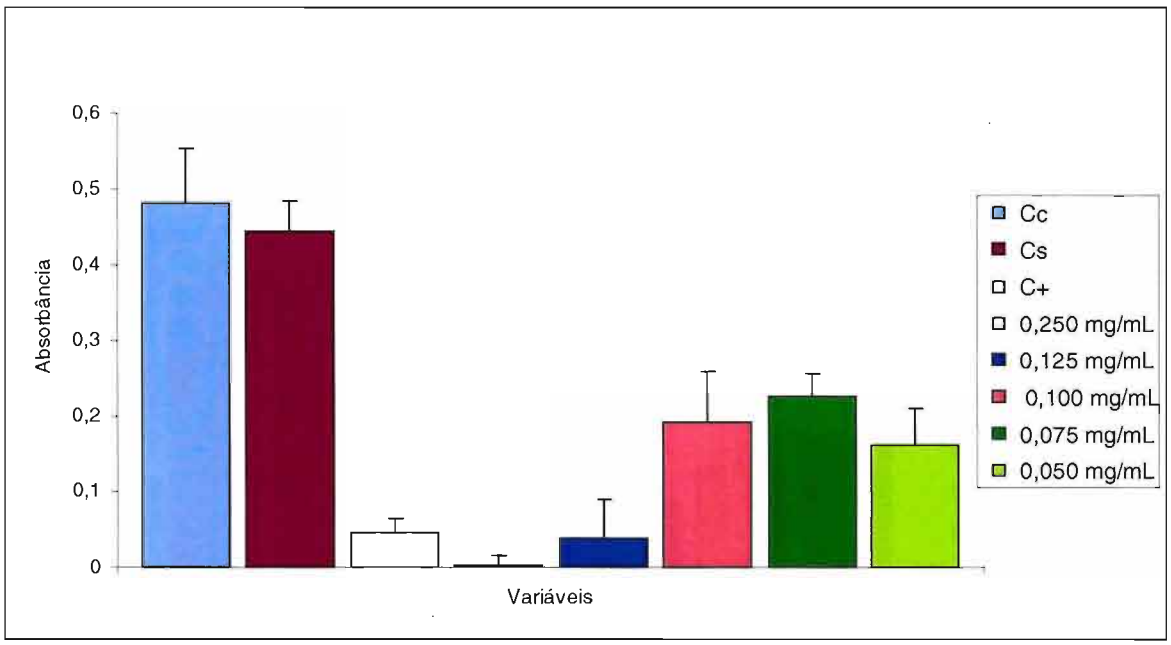


Figura 14: Atividade antimicrobiana do extrato total de *L. salviaefolia* frente a *S.aureus*
Experimento realizado em três replica com três repetições para cada concentração. Valores correspondem a média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.
Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções do extrato total em diferentes concentrações.

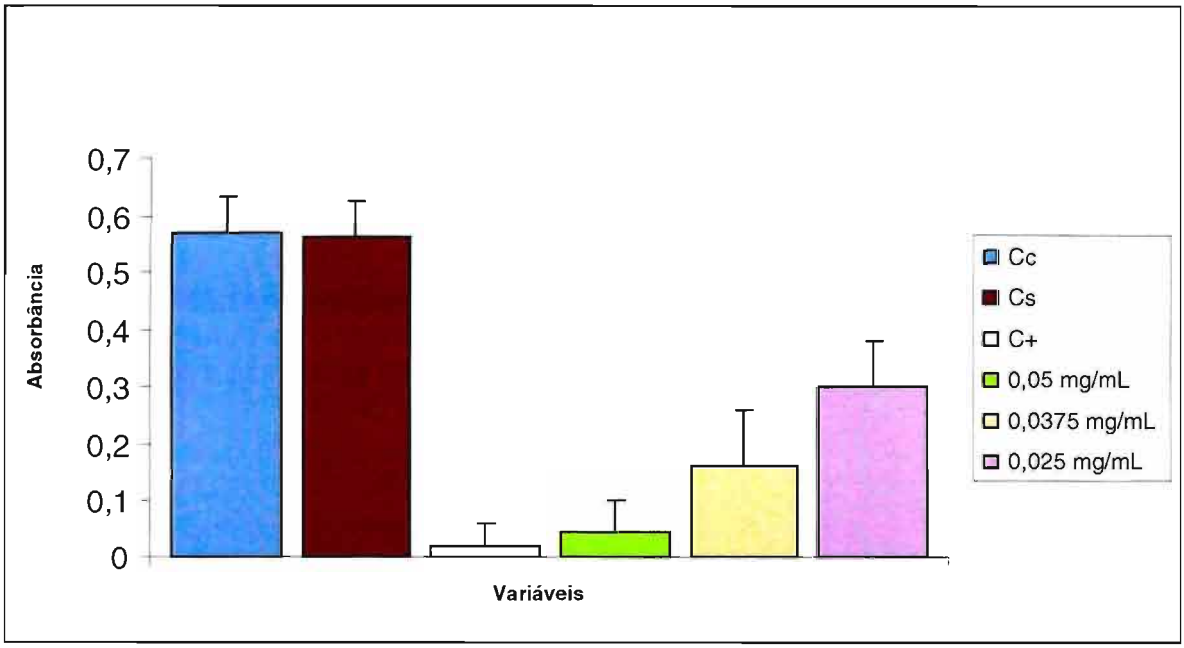


Figura 15: Atividade antimicrobiana da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* em frente a *S.aureus*
Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.
Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

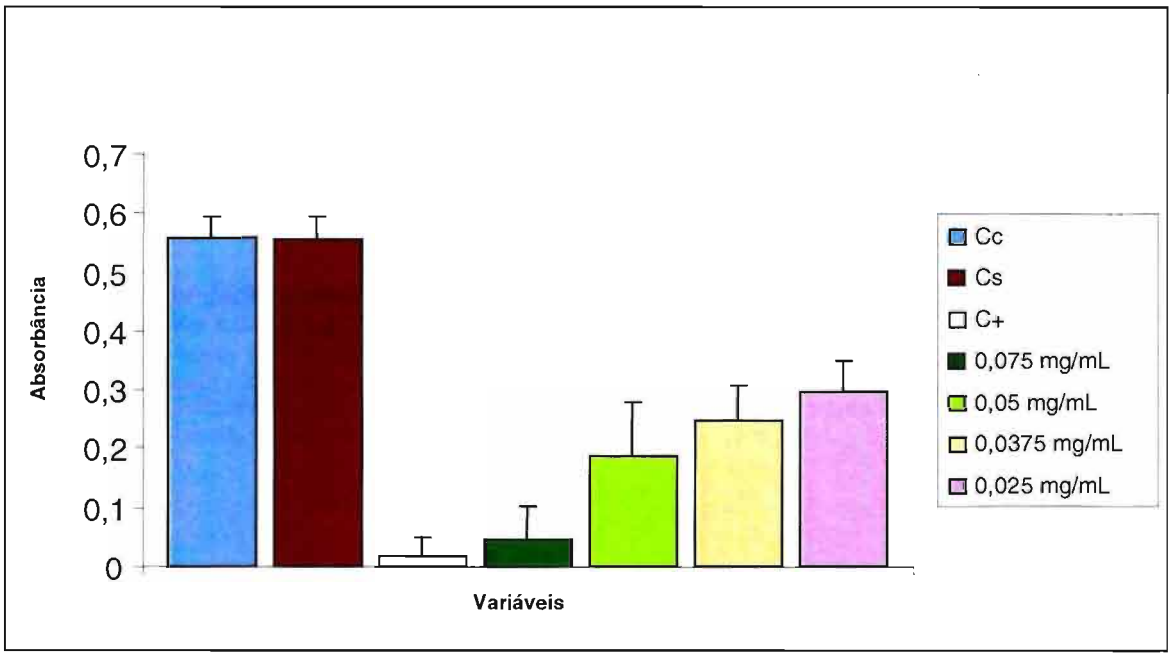


Figura 16: Atividade antimicrobiana da fração de clorofórmica de *L. salviaefolia* frente a *S.aureus*
Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.
Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração clorofórmica do extrato total em diferentes concentrações.

Na figura 17, foram testadas todas as frações (1-9) provenientes da fração de acetato de etila do extrato de *L. salviaefolia.* Deste modo, foi constatado que as frações 3 e 4 são as frações com maior atividade antimicrobiana e as frações de maior interesse dentre as demais frações provenientes da fração de acetato de etila.

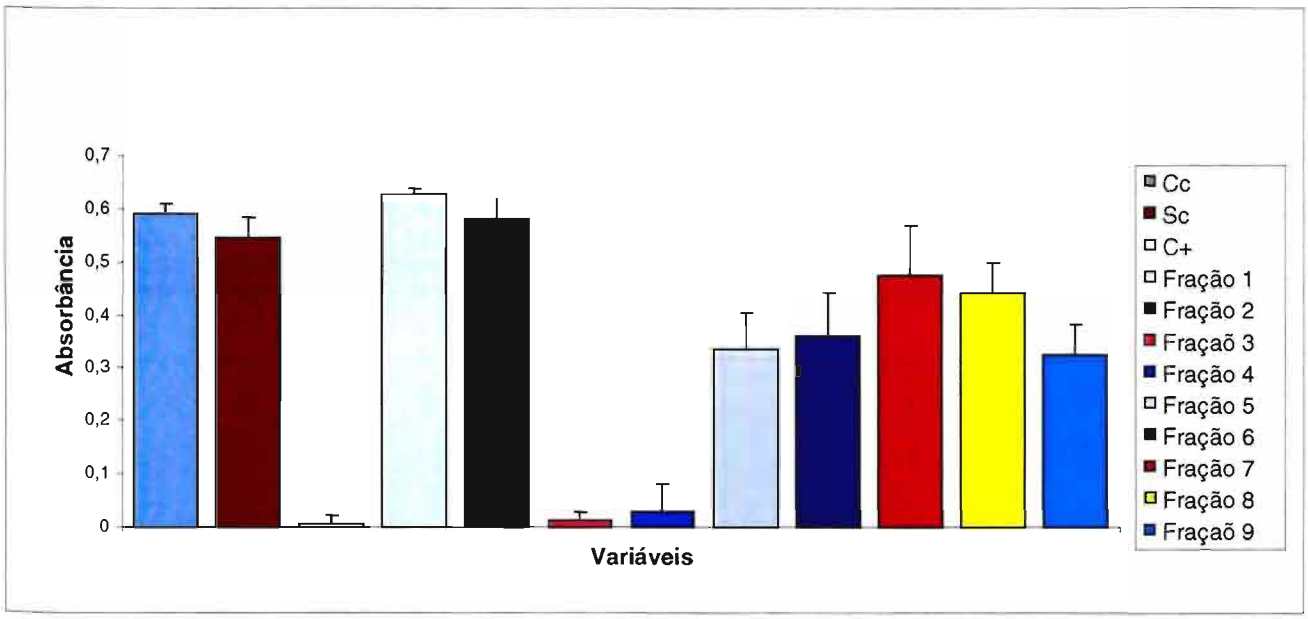


Figura 17: Atividade antimicrobiana das frações (1-9) da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* na concentração de 1,0 mg/mL, frente a *S.aureus*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.

Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções das frações (1-9) de acetato de etila do extrato total na concentração de 1,0 mg/mnL.

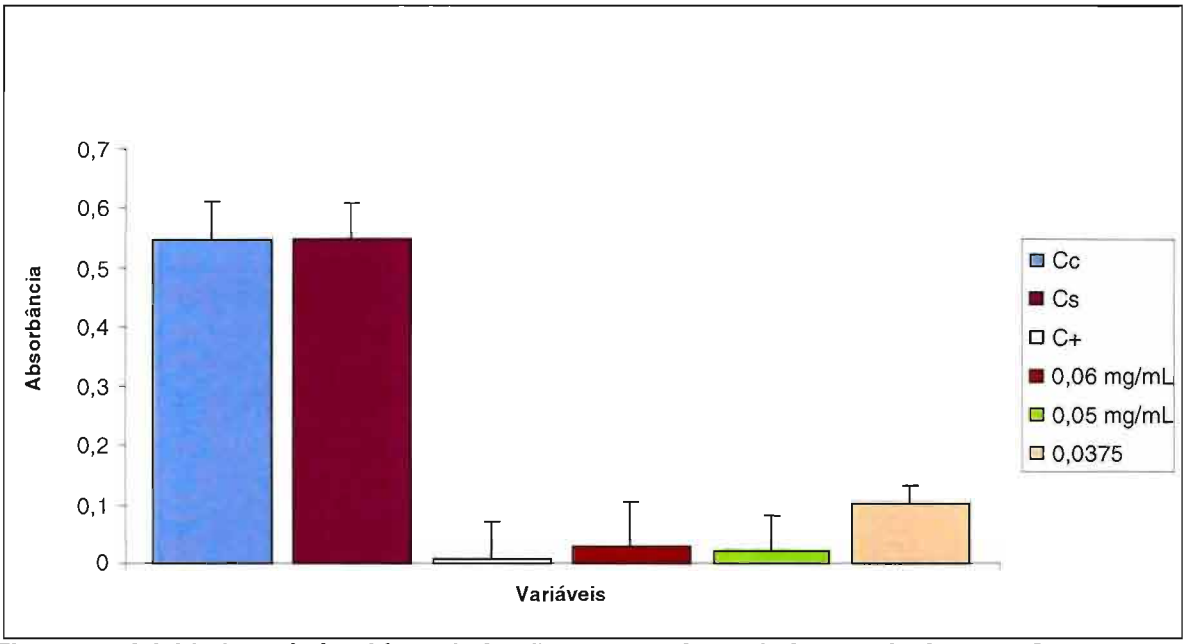


Figura 18: Atividade antimicrobiana da fração 3, proveniente da fr. ac. etila frente a *S.aureus*
Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.
Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração 3 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

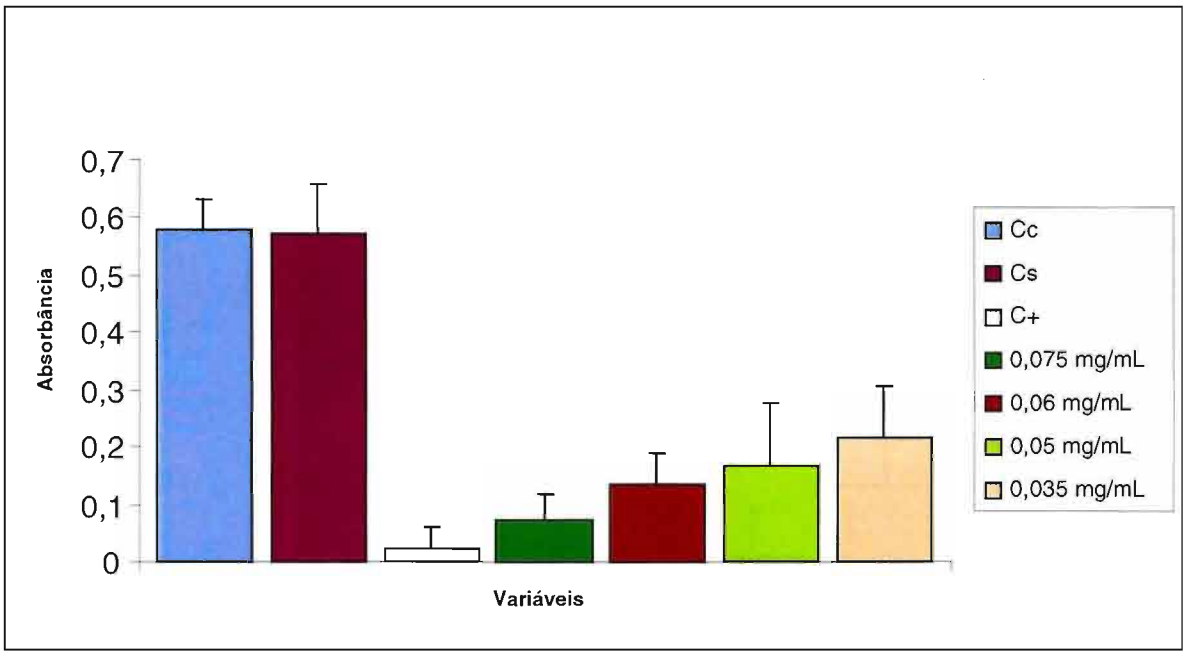


Figura 19: Atividade antimicrobiana da fração 4 proveniente da fr. ac. etila frente a *S.aureus*
Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.
Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração 4 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

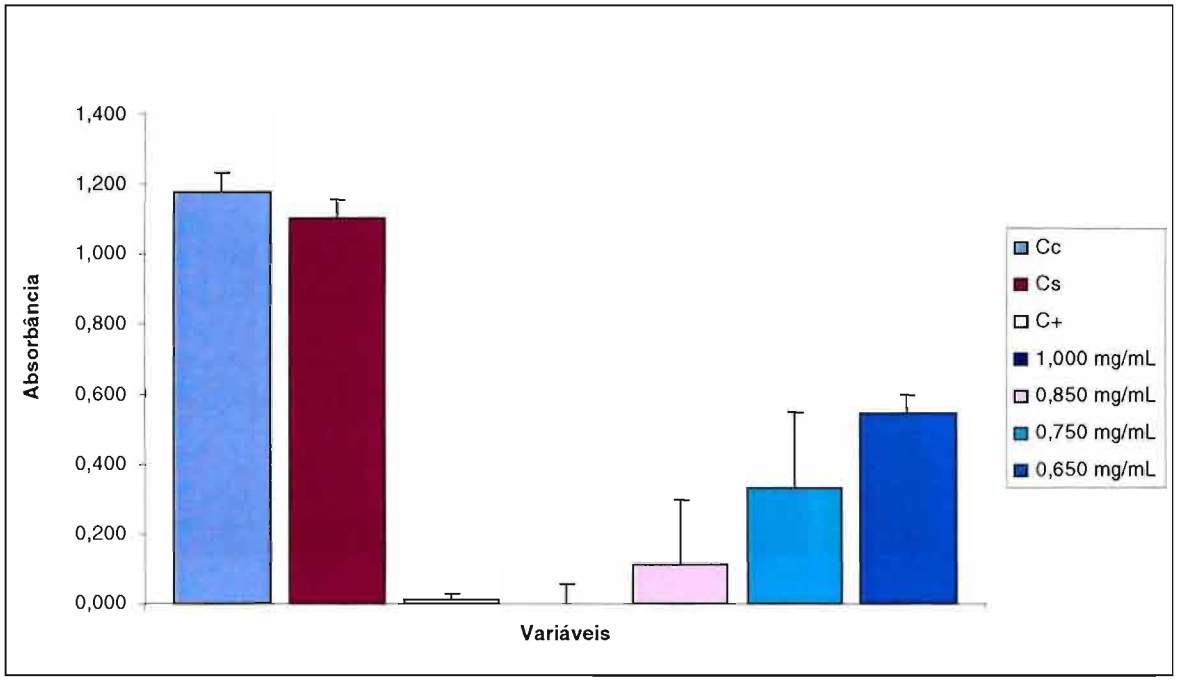


Figura 20: Atividade antimicrobiana do extrato total de *L.salviaefolia* frente a *E. coli*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.

Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções do extrato total em diferentes concentrações.

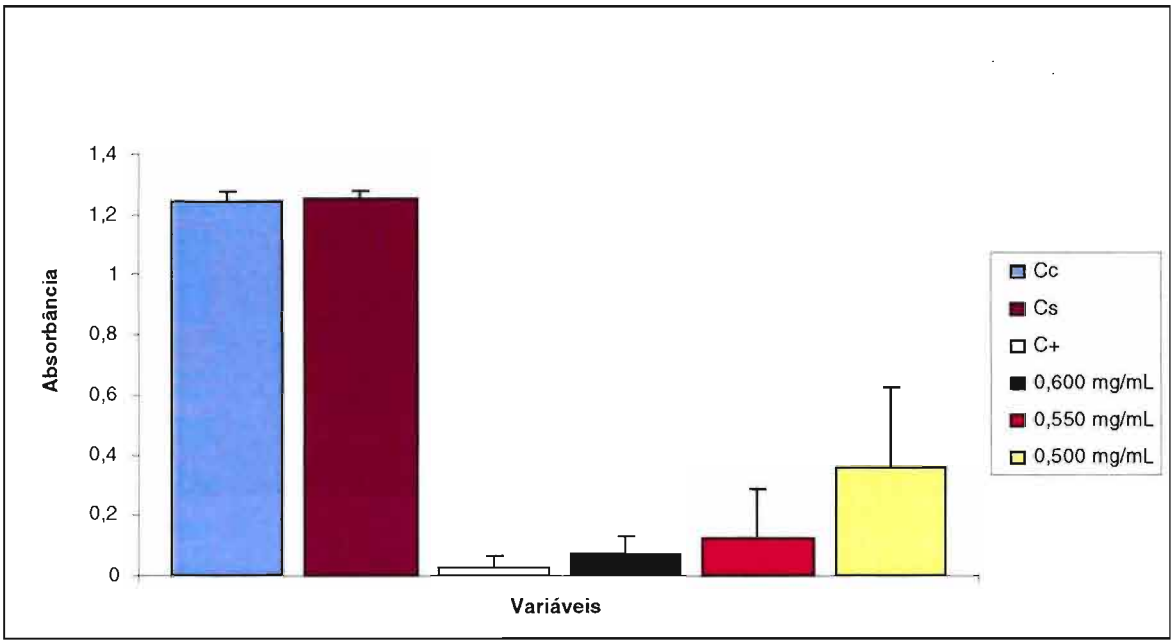


Figura 21: Atividade antimicrobiana da fr ac etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.

Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

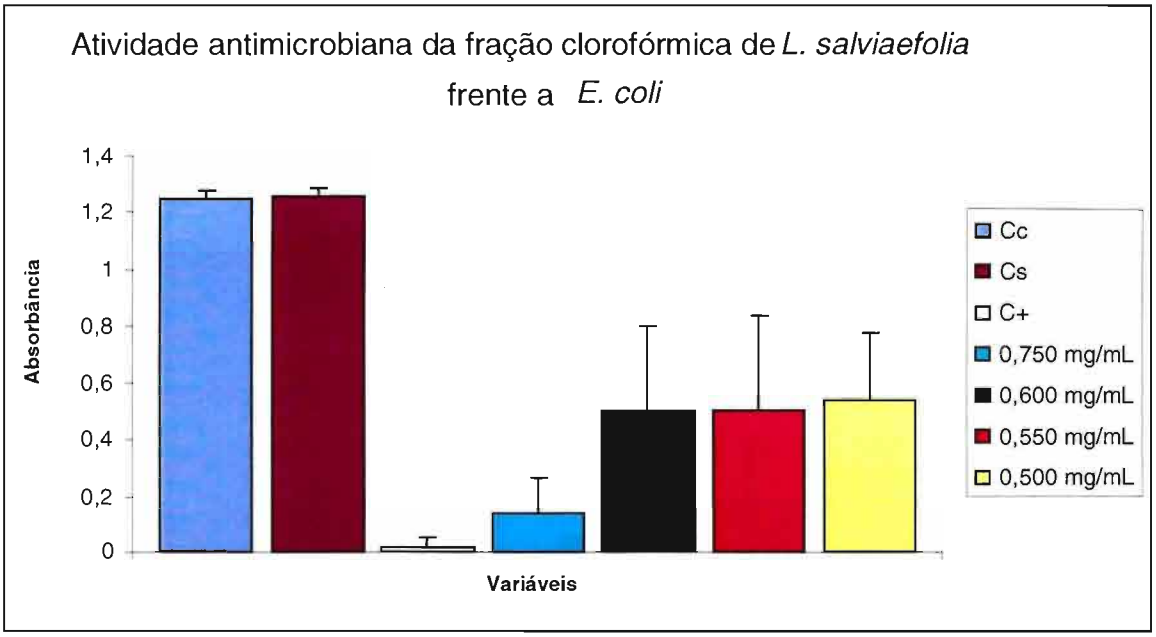


Figura 22: Atividade antimicrobiana da fração de clorofórmica do extrato de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.

Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração clorofórmica do extrato total em diferentes concentrações.

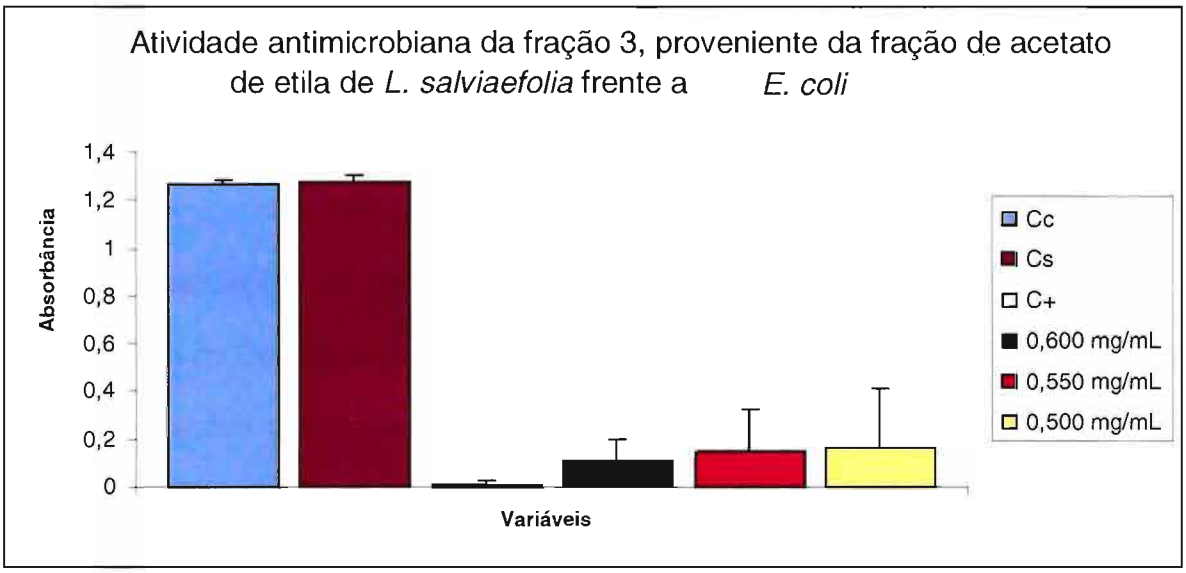


Figura 23: Atividade antimicrobiana da fração 3 proveniente da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração 3 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

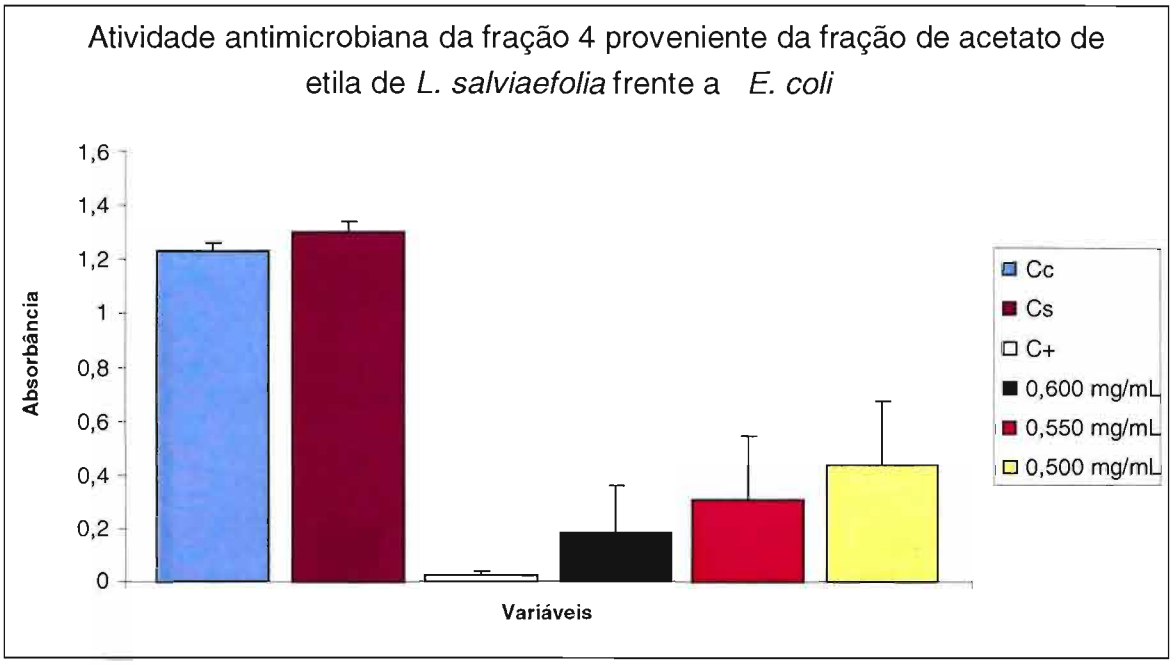


Figura 24: Atividade antimicrobiana da fração 4 proveniente da fr. ac. etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem a média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração 4 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

5.5. Determinação da CMI da naringenina.

Na realização do estudo da atividade antimicrobiana da naringenina e determinação do CMI da mesma, foram repetidas as determinações da CMI do extrato total e das frações clorofórmica e de acetato de etila, para uma maior segurança das análises. Entretanto a naringenina não foi ativa frente a *P. aeruginosa* assim como para *A. niger*. Todas as determinações do *A. niger* foram feitas visualmente devido a impossibilidade de leitura espectrofotométrica devido ao crescimento das hifas do fungo.

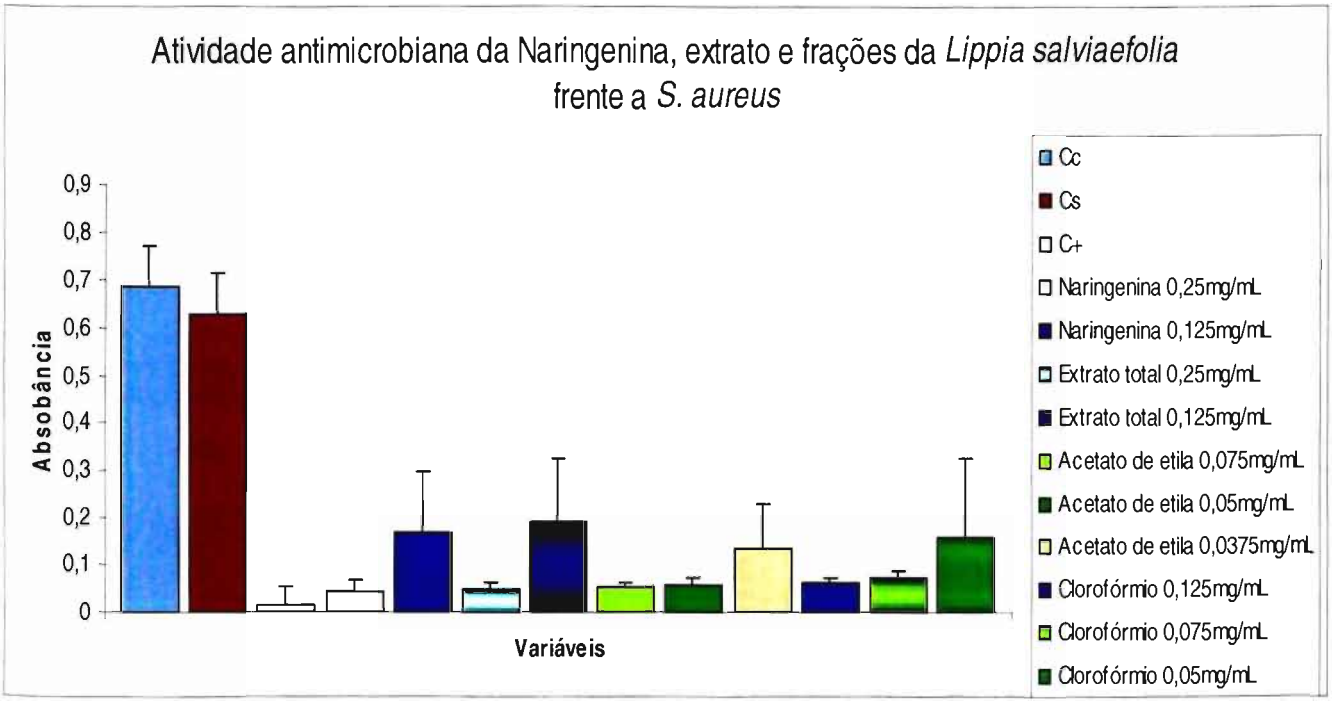


Figura 25: Atividade antimicrobiana da naringenina , extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *S. aureus*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.

Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

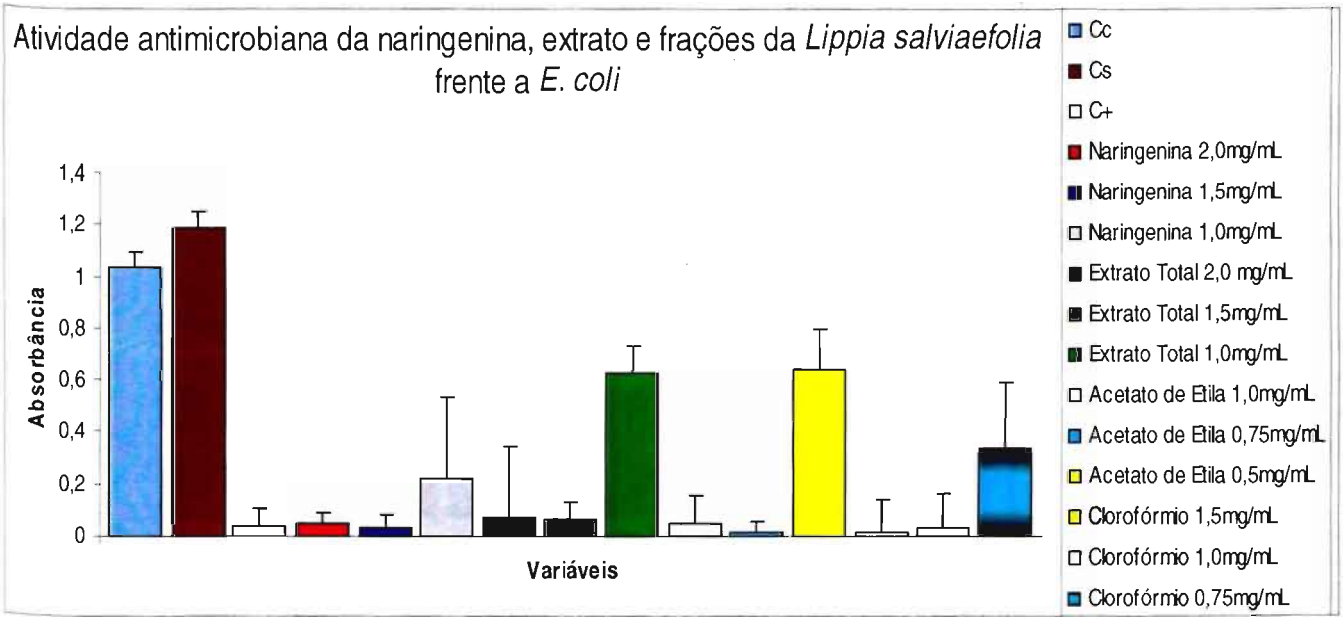


Figura 26: Atividade antimicrobiana da naringenina , extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *E. coli*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm.Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

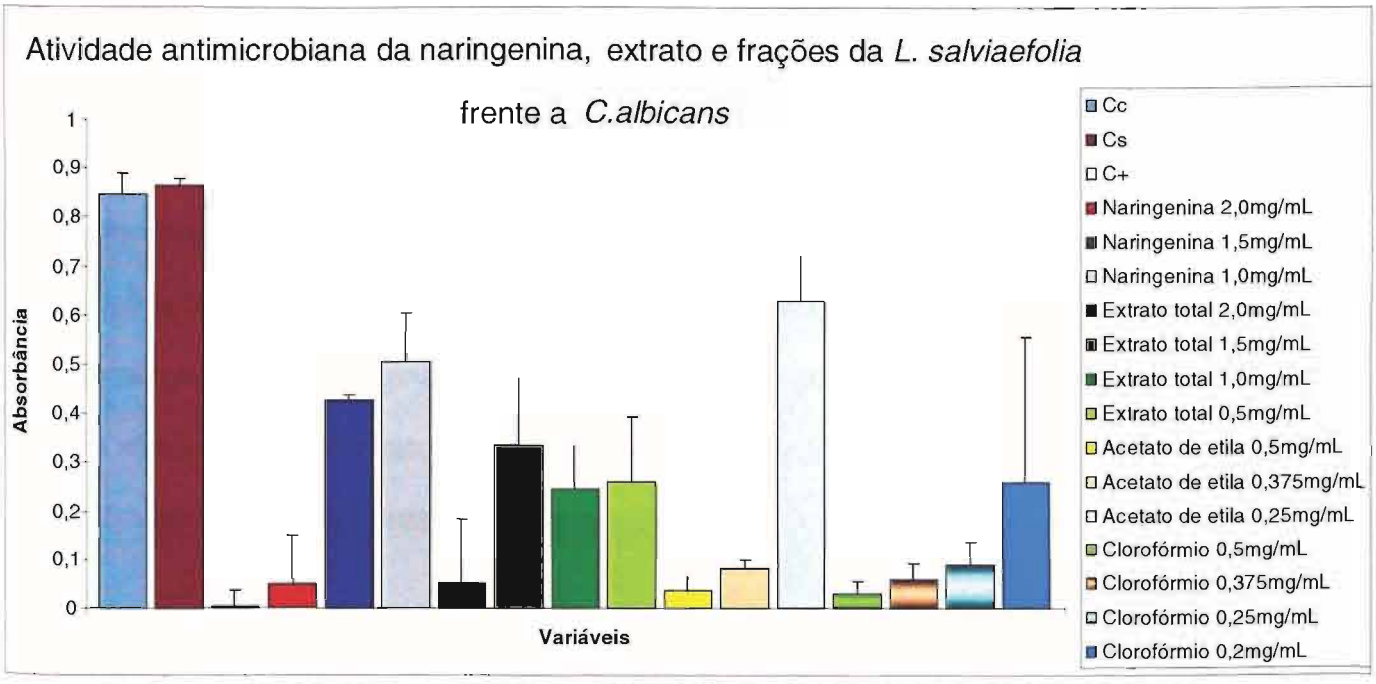


Figura 27: Atividade antimicrobiana da naringenina , extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *C. albicans*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Nistatina (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

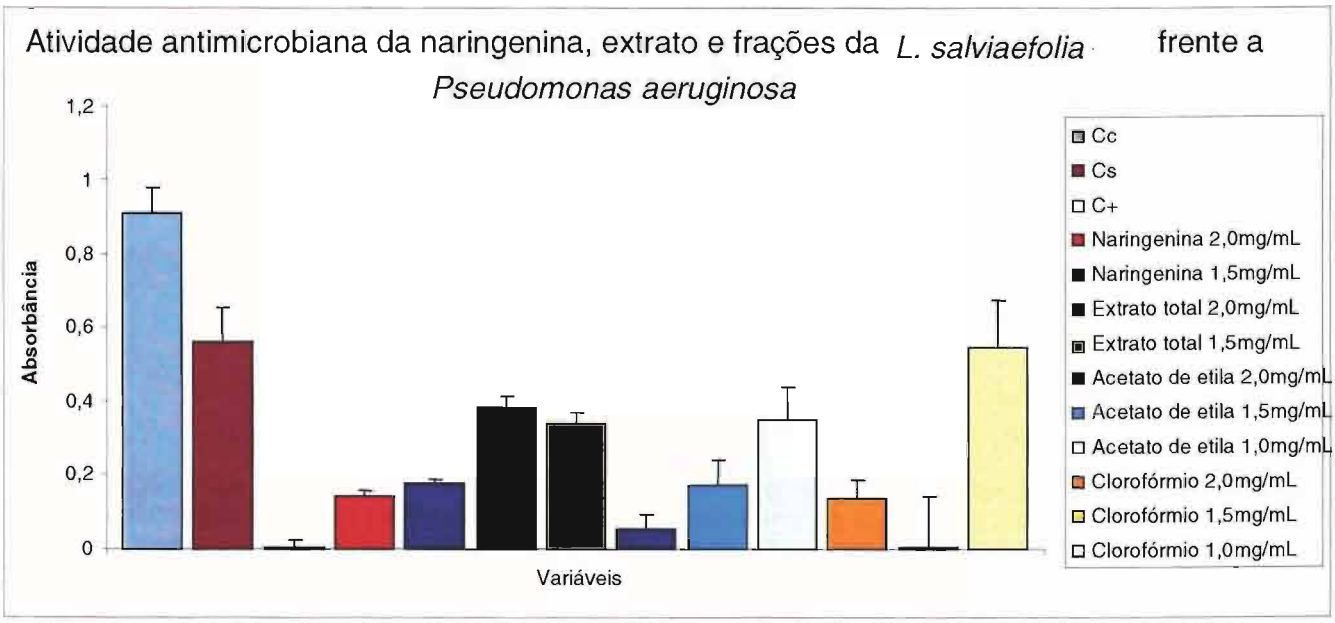


Figura 28: Atividade antimicrobiana da naringenina , extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *P. aeruginosa*

Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Amikacinal (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

Na tabela 8 é descrita a concentrações mínina inibitórias (CMI) para naringenina, para o extrato total de L. salviaefolia; para as frações ativas do extrato total: fração de acetato de etila e fração clorofórmica; e ainda para as frações 3 e 4 derivadas da fração de acetato de etila. Como pode ser observado, na tabela 8, as frações 3 e 4 derivadas da fração de acetato de etila, não apresentaram CMI superior aos da sua fração original, tornado injustificável a purificação das frações de acetato de etila e de Clorofórmio, esse fator pode ser explicado pelo efeito sinérgico favorável entre as substâncias presentes nos extratos.

Tabela 8: CMI da naringenina, do extrato total e frações da *L. salviaefolia* pelo método de microdiluição, frente a bactérias e fungos.

Concentração Mínima Inibitória de *L. salviaefolia* (CMI mg/mL) Método de microdiluição						
Cepas	**Naringenina**	**EE**	**$CHCl_3$.Fr**	**Ac.Et.Fr.**	**Fr. 3**	**Fr. 4**
S. aureus	0,125 - 0,25	0,125 - 0,25	0,05 - 0,075	0,035 - 0,05	0,05 - 0,125	0,75 - 0,125
E. coli	1,0 - 1,5	1,0 - 1,5	0,75 - 1,0	0,5 - 0,75	0,75 - 0,125	0,75 - 0,125
P. aeruginosa	> 2,0	> 2,0	1,5 - 2,0	1,5 - 2,0	> 2,0	> 2,0
C. albicans*	1,5 - 2,0	1,5 - 2,0	0,2 - 0,25	0,25 - 0,375	0,375 - 0,75	0,4 - 0,75
A .niger*	> 2,0	1,5 - 2,0	1,0 - 1,25	1,25 - 1,5	1,5 - 2,0	1,5 - 2,0

Determinação espectrofotométrica a 630 nm. * Determinação visual não foi submetida à leitura espectrofotométrica. Controle positivo: cloranfenicol, no teste referente a *S. auresus* e *E. coli*; nistatina no teste para *C.albicans* e *A. niger.;* amicacina, teste da *P.areuginosa*. Controle negativo: DMSO:metanol 50:50.
Legenda
EE: extrato etanólico; $CHCl_3$.Fr: Fração clorofórmica do extrato etanólico; Ac.Et.Fr.: Fração de acetato de etila do extrato etanólico; Fr. 3: Fração 3 da fração de acetato de etila; Fr. 4: Fração 4 da fração de acetato de etila.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

De acordo com a tabela 8, observa-se que, ao realizar o teste de atividade antimicrobiana da *L. salviaefolia,* a fração clorofórmica e a fração de acetato de etila são a com maior atividade antimicrobiana, em que apresentaram um CMI de 0,2% para as bactérias e fungos testados.

As frações 3 e 4 provenientes da fração de acetato de etila apresentaram CMI próximos, quando comparando uma com a outra (tabela 8). Esse fato pode ser explicado devido à semelhança constitucional entre as frações. Porém a CMI apresentada tanto pela fração 3 como pela fração 4, não foram mais eficazes que as frações de acetato de etila ou a fração de clorofórmio (tabela 8). Este fato pode ser explicado devido ao efeito sinérgico apresentado pelos constituintes de cada fração. Desta forma, para a *L. salviaefolia*, à medida que se purifica a fração diminui a atividade antimicrobiana.

Foram isolados três compostos majoritários em CG-EM (Figura 13). Os três principais compostos majoritários cujo padrão de fragmentação é compatível são 4',5-Dihidroxi-7-metoxi-flavonona, a naringenina, e o apiflorol. Dentre esses compostos a naringenina é encontrada para comercialização. Deste modo estudou-se a atividade antimicrobiana para naringenina. Verificou-se que a naringenina assim como o extrato etanólico total da *L. salviaefolia* (Tabela 8), tem os maiores valores de CMI encontrados no estudo da atividade antimicrobiana. Para o *S. aureus* o CMI da naringenina e do extrato total foram entre 0,125-0,25 mg/mL; para *E. coli*, CMI entre 1,0 – 1,5mg/mL; para *P. aeruginosa* > 2,0 mg/mL; para *C. albicans* entre 1,5 – 2,0 mg/mL; e para *A. niger* entre 1,5 – 2,0 mg/mL. Esse fato evidencia que para alcançar os melhores níveis da atividade antimicrobiana da *L. salviaefolia*, deve-se fazer o processo de extração inicial e a partição do extrato total até que se consiga obter a

fração clorofórmica e a fração de acetato de etila. A partir deste ponto se prosseguir a purificação e isolamento dos compostos a atividade antimicrobiana tente a diminuir. Este fato pode ser observado na tabela 8 e nas figuras 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28, em que a CMI das frações 3 e 4 da fração de acetato de etila, e da CMI da naringenina mostraram serem maiores ou em alguns casos igual aos apresentados pelas frações clorofórmica e de acetato de etila.

A alta eficiência da fração de acetato de etila e da fração clorofórmica pode ser explicada pelo efeito sinérgico entre todos os componentes destas frações de *L. salviaefolia*. De acordo com os resultados apresentados na tabela 8 pode-se notar que os valores de CMI entre as frações de acetato de etila e a fração clorofórmica são bem próximos um do outro, havendo uma diferença sutil ou até mesmo não considerável entre as duas frações. Este fato pode ser explicado devido à semelhança constitucional das duas frações observada no teste de CCD.

Os testes de atividade antimicrobiana da maioria das plantas estudadas para este fim indicam que o *S. aureus* é a bactéria com maior susceptibilidade entre todas as cepas testadas (Taged, et al., 2005). Similarmente este fato foi reproduzido nos testes realizados para a *L. salviaefolia* (Tabela 8). Por outro lado a cepa de *P. aeruginosa* tem mostrado ser a cepa mais resistente de todas as bactérias utilizadas neste teste, seguida pela *E. coli*. De fato, a atividade antimicrobiana de extratos naturais normalmente é mais eficaz frente a bactérias Gram-positivas (*S.aureus*) do que frente a bactérias Gram-negativas (*P.aeruginosa* e *E. coli*).

A razão para a diferença entre a sensibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas se faz devido a diferença na constituição das paredes celulares de cada uma. Bactérias Gram-negativas tem uma membrana fosfolipídica carreada de

componentes lipopolisacarídeos. Isto faz com que a parede celular seja impermeável a algumas substâncias químicas antimicrobianas. Por outro lado, bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis, uma vez que tem uma membrana celular constituída apenas por uma camada de peptidioglicano, não sendo uma barreira de permeabilidade efetiva (Taged, et al., 2005). Entretanto, em relação a estas diferenças de permeabilidade, a *L. salviaefolia* se mostrou eficaz tanto para Gram-positivas como para Gram-negativas, especialmente as frações: acetato de etila e clorofórmica (Tabela 8).

O *A. niger* normalmente é insensível à maioria dos extratos de plantas testados em relação à atividade antimicrobiana, e a *C. albicans* mostrou-se um fungo de difícil inibição. Entretanto como pode ser observado na tabela 8, tanto a fração clorofórmica como a fração de acetato de etila da *L. salviaefolia* foi ativa com valores de CMI considerável.

De acordo com a tabela 8 todos os extratos testados de *L. salviaefolia* possuíram atividade contra bactérias e fungos, especialmente a fração clorofórmica e a fração de acetato de etila. Indicando boa atividade antimicrobiana.

Salientando que, de acordo com os resultados obtidos, a espécie de *L. salviaefolia* é um potente agente natural antimicrobiano. Observações anteriores de screenings em plantas medicinais em relação à atividade antimicrobiana relatam que poucos agentes de origem natural são efetivos contra bactérias Gram-negativas

(HERRERA, et al, 1996; KELMANSON, et al, 2000; ALI, et al, 2001). Pode-se constatar que a *L. salviaefolia* é um agente antimicrobiano promissor.

Apesar da fração de acetato de etila e a fração clorofórmica apresentarem valores semelhantes de CMI, a avaliação da eficácia de conservantes natural foi prosseguida apenas com a fração de acetato de etila. O objetivo desta seleção é o direcionamento da pesquisa. Uma vez que com valores tão próximos tem se maior interesse em trabalhar com a fração com maior nível de purificação. Desta forma reduzimos os interferentes presentes no conservante natural. Outro fator a ser considerado é a coloração da fração de acetato de etila, que é menos intensa que a coloração da fração clorofórmica. Logo ao prosseguir os estudos apenas com a fração de acetato de etila, existirá maior facilidade de manipulação de cosméticos e contribuindo para um melhor aspecto das formulações cosméticas.

A fração clorofórmica ainda tem em sua composição muitos compostos graxos, além de grande quantidade de clorofila. Esses compostos graxos dificultam o manuseio como pesagem, transferência de frascos e dissolução para da fração clorofórmica para incorporação nas fórmulas cosméticas, resultados em perdas e outros problemas. A grande quantidade de clorofila, que ainda permanece na fração clorofórmica pode influenciar na coloração final das formulações cosméticas e gerar problemas de aceitabilidade ao consumidor e estética do produto final. É importante ressaltar também que quando comparamos a fração de acetato de etila com a fração clorofórmica em termos de rendimento, a fração de acetato de etila tem um rendimento muito superior que a fração clorofórmica, cerca de 20% a mais (Item 5.2 –

tabela 6). Por essas razões, dentre a fração de acetato de etila e a fração clorofórmica optou-se por trabalhar apenas com a fração de acetato de etila nos testes seqüenciais de eficácia do conservante natural e teste de citoxicidade.

5.6. Estudo de estabilidade acelerada das pré-formulações cosméticas.

5.6.1. Testes preliminares de estabilidade física para emulsões

Centrifugação

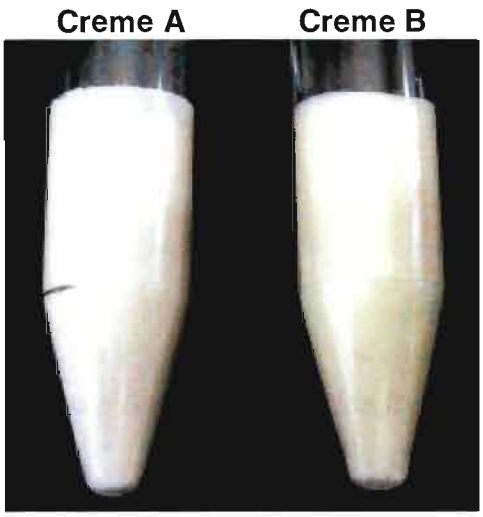


Fig. 29: Teste de estabilidade física para emulsões - centrifugação.

Após centrifugação das emulsões: creme A (CA) e creme B (CB), (Fig. 29) não foi observada coalescência ou separação de fases, demonstrando estabilidade física adequada.

Estresse térmico

Fig. 30: Teste de estabilidade física para emulsões - estresse térmico.

As formulações dos cremes A e B (Fig. 30) mantiveram-se estáveis, suportando as alterações de temperatura a que foram submetidas no teste de estresse térmico, não apresentando separação de fases.

5.6.2.. Avaliação física e físico-química das formulações

Os resultados quanto às características organolépticas, valores de pH e viscosidade aparente das formulações avaliadas inicialmente e após exposição às condições do teste (geladeira de 4-8 °C, estufa a 45 °C; ciclos gela e degela; freezer a -10 °C; temperatura ambiente a 22 °C e luz solar) estão apresentados na tabela 9 para os cremes A e B, na tabela 10 para os géis A e B e na tabela 11 para os xampus A e B.

Tabela 9: Avaliação física e físico-química das amostras do creme A e do creme B, no estudo de estabilidade acelerada.

		Condições de armazenamento													
		G			E				C		F		TALS		
tempo (dias)	**to**	**3º**	**7º**	**14º**	**1º**	**3º**	**7º**	**14º**	**6º**	**12º**	**7º**	**14º**	**3º**	**7º**	**14º**
pH (CA)	5,81	5,82	5,70	5,73	5,84	5,25	5,04	4,91	5,18	5,35	5,82	5,81	5,76	5,82	5,71
Aspecto (CA)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor (CA)	N	N	N	N	N	N	LA	LA	N	LA	N	N	N	N	N
Odor (CA)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Viscosidade (CA)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
pH (CB)	5,40	6,19	5,66	5,64	5,76	5,58	5,42	5,51	5,31	5,42	5,48	5,40	5,50	5,44	5,33
Aspecto (CB)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N
Cor (CB)	N	N	N	N	N	N	LA	A	LA	A	N	N	N	N	N
Odor (CB)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N
Viscosidade (CB)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: Creme A (CA); Creme B (CB)
G: Geladeira (4-8°C); **E:** Estufa (45°C); **C**: ciclo gela e degela; **F**: Freezer (-10°C); **T.A. L.S**.: Temperatura ambiente, luz solar (22°C ± 2°C)
to: Início – 24 horas após o preparo
Aspecto: N-Normal, sem alteração, LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado
Cor: N- Normal, sem alteração (amarelado); LA- Levemente alterado; A- alterado; IA- Intensamente alterado
Odor: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

Os valores de pH foram expressos com média de duplicatas. A viscosidade foi verificada apenas visualmente.

Tabela 10: Avaliação física e físico-química das amostras do gel A e do gel B, no estudo de estabilidade acelerada.

		Condições de armazenamento													
		G			E				C		F		TALS		
Tempo (dias)	**to**	**3º**	**7º**	**14º**	**1º**	**3º**	**7º**	**14º**	**6º**	**12º**	**7º**	**14º**	**3º**	**7º**	**14º**
pH (GA)	5,61	5,71	5,68	6,71	5,61	5,59	5,50	5,49	5,51	5,46	5,64	5,61	5,62	5,65	5,65
Aspecto (GA)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor (GA)	N	N	N	N	LA	LA	LA	LA	LA	A	N	N	N	N	N
Odor (GA)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N
Viscosidade (GA)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
pH (GB)	6,02	6,10	6,12	6,04	6,12	6,03	6,13	5,93	5,48	5,97	6,02	6,05	6,04	6,04	6,07
Aspecto (GB)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor (GB)	N	N	N	N	LA	LA	LA	LA	LA	A	N	N	N	N	N
Odor (GB)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Viscosidade (GB)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: Gel A (GA). Gel B (GB)
G: Geladeira (4-8°C); **E:** Estufa (45°C); **C**: ciclo gela e degela; **F**: Freezer (-10°C); **T.A. L.S**.: Temperatura ambiente, luz solar (22°C ± 2°C)
to: Início – 24 horas após o preparo
Aspecto: N-Normal, sem alteração, LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado
Cor: N- Normal, sem alteração (amarelado); LA- Levemente alterado; A- alterado; IA- Intensamente alterado
Odor: N- Normal, sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado

Os valores de pH foram expressos com média de duplicatas. A viscosidade foi verificada apenas visualmente.

Tabela 11: Avaliação física e físico-química das amostras do xampu A e do xampu B, no estudo de estabilidade acelerada.

		Condições de armazenamento													
		G			E				C		F		TALS		
Tempo (dias)	**to**	**3º**	**7º**	**14º**	**1º**	**3º**	**7º**	**14º**	**6º**	**12º**	**7º**	**14º**	**3º**	**7º**	**14º**
pH (XA)	5,83	5,84	5,81	6,78	5,82	5,82	5,80	5,87	5,83	5,84	5,72	5,80	5,79	5,70	5,78
Aspecto (XA)	N*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor (XA)	N	N	N	N	N	LA	A	A	LA	LA	N	N	N	N	N
Odor (XA)	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N
Viscosidade *(XA)	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA
pH (XB)	5,76	5,80	5,73	5,74	5,73	5,70	5,61	5,65	5,68	5,67	5,72	5,74	5,69	5,66	5,74
Aspecto (XB)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor (XB)	N	N	N	N	N	LA	A	A	LA	LA	N	N	N	N	N
Odor (XB)	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N
Viscosidade (XB)	N	N	N	N	N	LA	IA	IA	N	LA	N	N	N	N	N

Legenda: Xampu A (XA); Xampu B (XB)
G: Geladeira (4-8°C); **E:** Estufa (45°C); **C**: ciclo gela e degela; **F**: Freezer (-10°C); **T.A. L.S.**: Temperatura ambiente, luz solar (22°C ± 2°C)
to: Início – 24 horas após o preparo
Aspecto: N-Normal, sem alteração, LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado
Cor: N- Normal, sem alteração (XA: verde translúcido; XB: verde perolado); LA- Levemente alterado (pouco mais escuro); A- alterado; IA- Intensamente alterado
Odor: N- Normal (característico da essência), sem alteração; LM- Levemente modificado; IM- Intensamente modificado
Viscosidade: N – Normal (cerca de 300 cp ± 90); LA – Levemente alterado (400 cp – 800 cp); A – Alterado (800cp – 1200cp); IA – Intensamente alterado (>1200 ou <100cp)

* Quebra de viscosidade ao adicionar a fr. ac. etila de *L. salviaefolia*
Os valores de pH foram expressos com média de duplicatas.

A seguir, são apresentados os resultados quanto às características organolépticas (aspecto e cor) do creme A, creme B, gel A, gel B, xampu A e xampu B comparados com os respectivos padrões (t0) de cada amostra, avaliadas após as condições do teste de estabilidade acelerada: geladeira de 4-8 ºC, estufa a 45 ºC; ciclos gela e degela; freezer a -10 ºC; temperatura ambiente a 22 ºC e luz solar (Figuras 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40,41, 42, 43, 44 e 45).

As formulações foram analisadas 24 horas após o preparo (Tabela 12), antes de serem submetidas às condições do teste de estabilidade acelerada. Esta primeira análise foi denominada de t0, e foi utilizada como controle para as demais formulações depois de submetidas às condições do teste de estabilidade acelerada.

Tabela 12: Análise inicial das pré-formulações cosméticas (creme A, creme B, gel A, gel B, xampu A, xampu B), realizada 24 horas após os preparo (t0).

	Análise inicial (t0)			
	pH	**Aspecto**	**Cor**	**Odor**
Creme A	5,81	Homogêneo	Amarelada	Característico da essência
Creme B	5,40	Homogêneo	Amarelada	Característico da essência
Gel A	5,61	Homogêneo	Amarelada	Característico da essência
Gel B	6,02	Homogêneo	Amarelada	Característico da essência
Xampu A	5,83	Homogêneo	Vede translúcido	Característico da essência
Xampu B	5,76	Homogêneo	Verde Perolado	Característico da essência

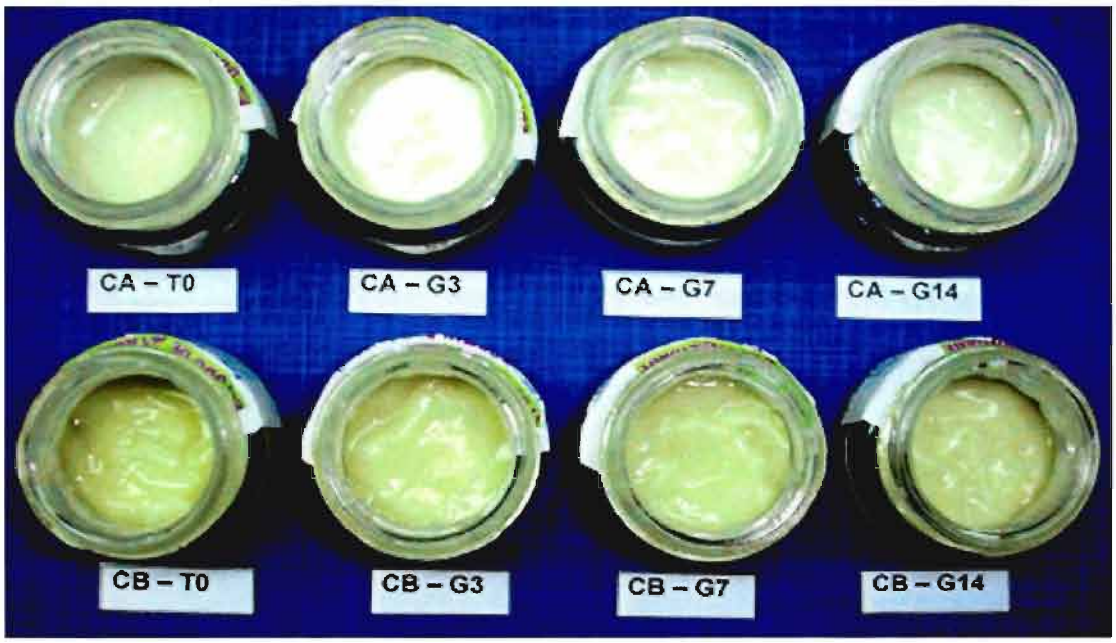


Figura 31: Teste de estabilidade acelerada do creme A e creme B – Condição de geladeira

CA – t0: controle do creme A.

CA – G3: Creme A submetido à condição de geladeira avaliado no 3° dia.

CA – G7: Creme A submetido à condição de geladeira avaliado no 7° dia.

CA – G14: Creme A submetido à condição de geladeira avaliado no 14° dia.

CB – t0: controle do creme B.

CB – G3: Creme B submetido à condição de geladeira avaliado no 3° dia.

CB – G7: Creme B submetido à condição de geladeira avaliado no 7° dia.

CB – G14: Creme B submetido à condição de geladeira avaliado no 14° dia.

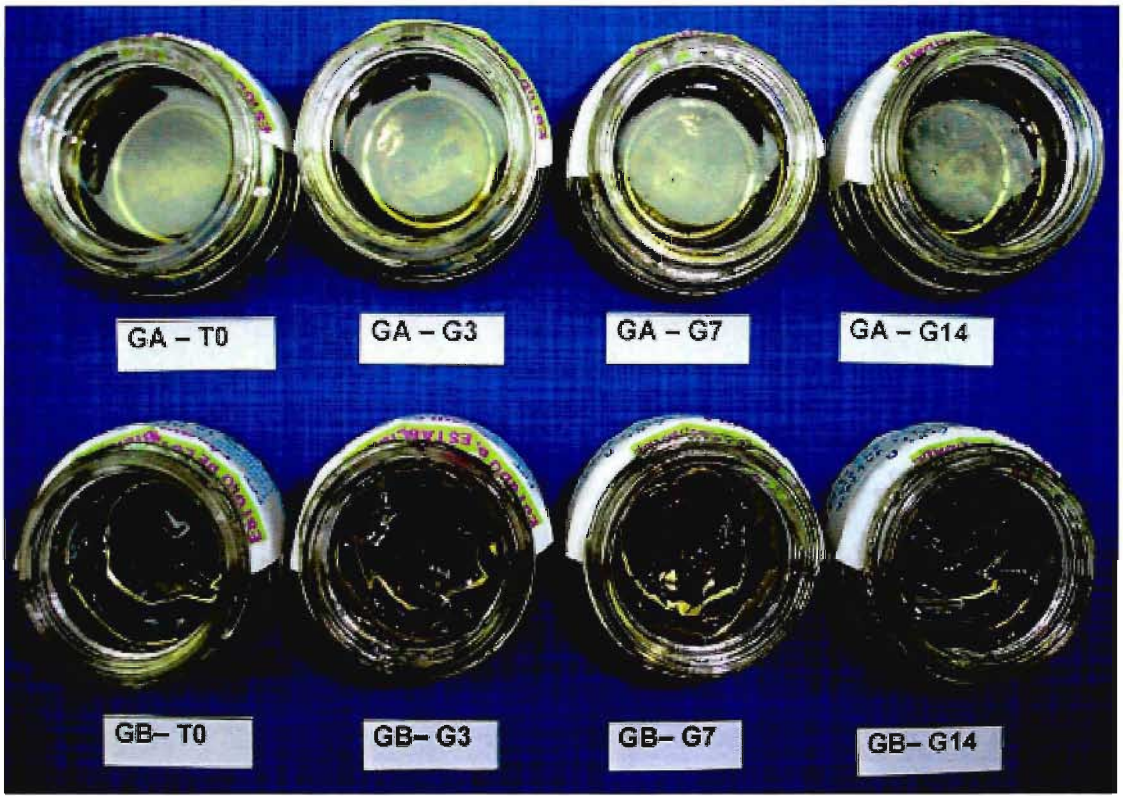


Figura 32: Teste de estabilidade acelerada do gel A e gel B – Condição de geladeira.

GA – t0: controle do gel A.

GA – G3: Gel A submetido à condição de geladeira avaliado no 3° dia.

GA – G7: Gel A submetido à condição de geladeira avaliado no 7° dia.

GA – G14: Gel A submetido à condição de geladeira avaliado no 14° dia.

GB – t0: controle do gel B.

GB – G3: Gel B submetido à condição de geladeira avaliado no 3° dia.

GB – G7: Gel B submetido à condição de geladeira avaliado no 7° dia.

GB – G14: Gel B submetido à condição de geladeira avaliado no 14° dia.

Figura 33: Teste de estabilidade acelerada do xampu A e xampu B – Condição de geladeira.

XA – t0: controle do xampu A.

XA – G3: Xampu A submetido à condição de geladeira avaliado no 3° dia.

XA – G7: Xampu A submetido à condição de geladeira avaliado no 7° dia.

XA – G14: Xampu A submetido à condição de geladeira avaliado no 14° dia.

XB – t0: controle do xampu B.

XB – G3: Xampu B submetido à condição de geladeira avaliado no 3° dia.

XB – G7: Xampu B submetido à condição de geladeira avaliado no 7° dia.

XB – G14: Xampu B submetido à condição de geladeira avaliado no 14° dia.

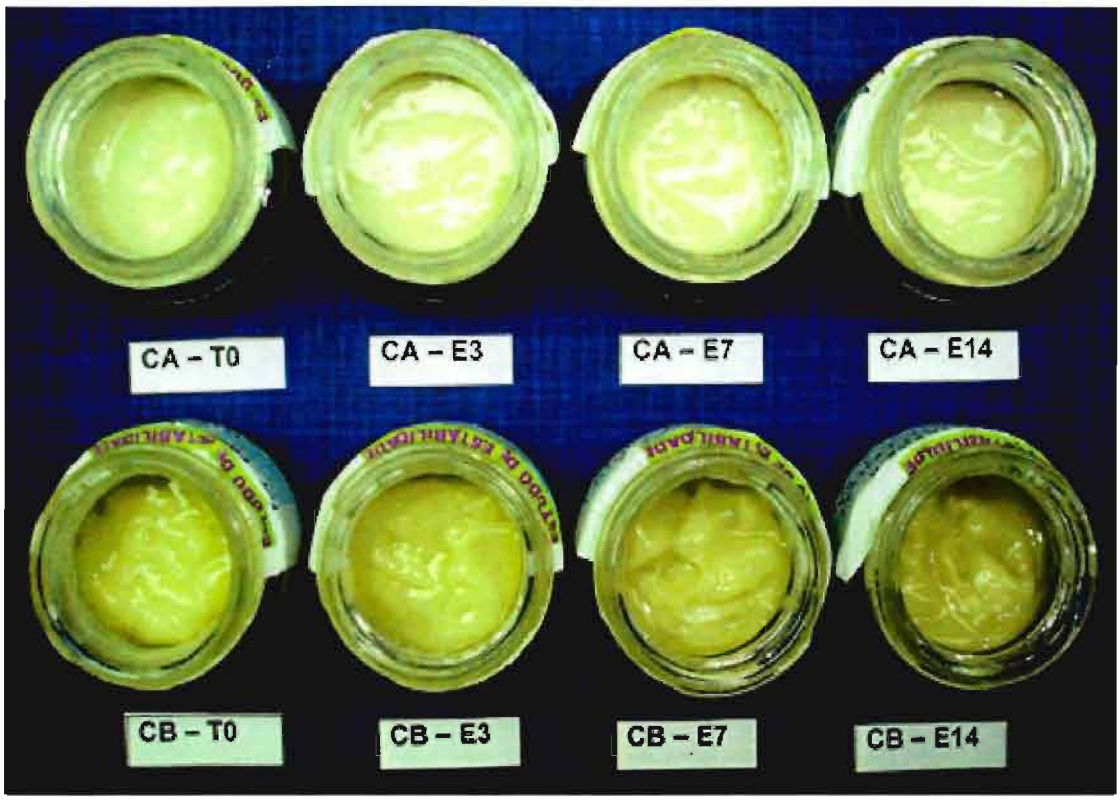


Figura 34: Teste de estabilidade do creme A. e creme B – Condição de estufa

CA – t0: controle do creme A.

CA – E3: Creme A submetido à condição de estufa avaliado no 3° dia.

CA – E7: Creme A submetido à condição de estufa avaliado no 7° dia.

CA – E14: Creme A submetido à condição de estufa avaliado no 14° dia.

CB – t0: controle do creme B.

CB – E3: Creme B submetido à condição de estufa avaliado no 3° dia.

CB – E7: Creme B submetido à condição de estufa avaliado no 7° dia.

CB – E14: Creme B submetido à condição de estufa avaliado no 14° dia.

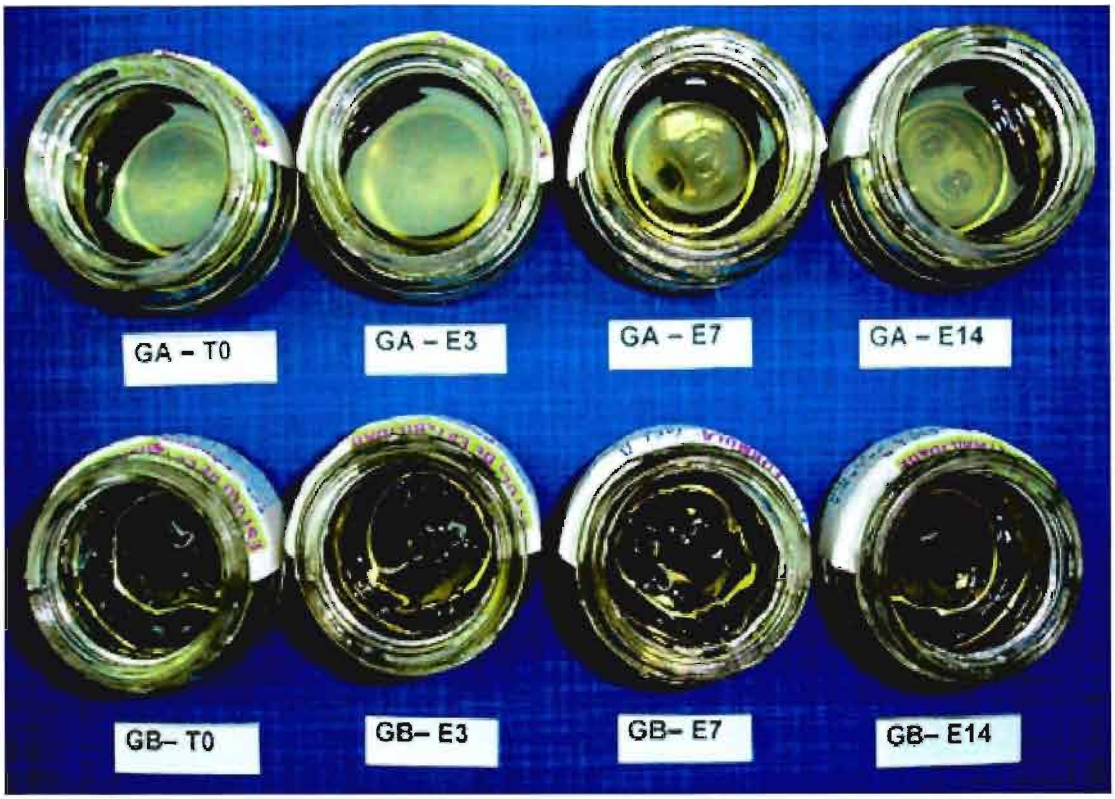


Figura 35: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B – Condição de estufa.

GA – t0: controle do gel A.

GA – E3: Gel A submetido à condição de estufa avaliado no 3° dia.

GA – E7: Gel A submetido à condição de estufa avaliado no 7° dia.

GA – E14: Gel A submetido à condição de estufa avaliado no 14° dia.

GB – t0: controle do gel B.

GB – E3: Gel B submetido à condição de estufa avaliado no 3° dia.

GB – E7: Gel B submetido à condição de estufa avaliado no 7° dia.

GB – E14: Gel B submetido à condição de estufa avaliado no 14° dia.

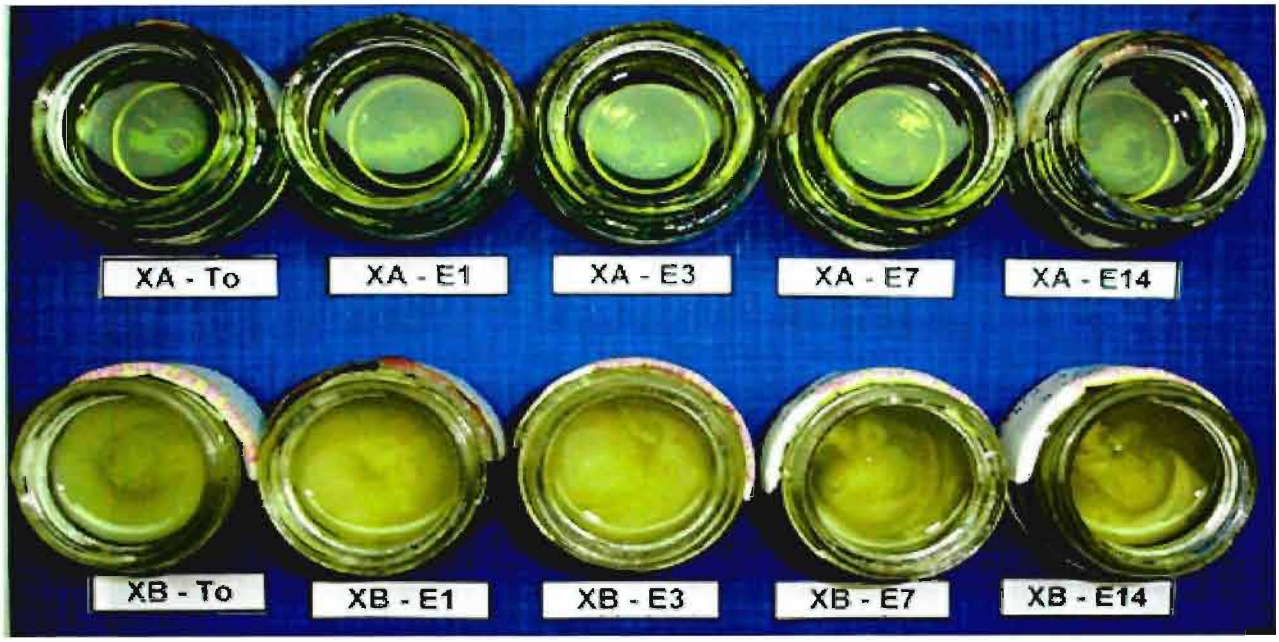


Figura 36: Teste de estabilidade acelerada do xampu A e xampu B – Condição de estufa

XA – t0: controle do xampu A.

XA – E1: Xampu A submetido à condição de estufa avaliado no 1° dia.

XA – E3: Xampu A submetido à condição de estufa avaliado no 3° dia.

XA – E7: Xampu A submetido à condição de estufa avaliado no 7° dia.

XA – E14: Xampu A submetido à condição de estufa avaliado no 14° dia.

XB – t0: controle do xampu B.

XB – E1: Xampu B submetido à condição de estufa avaliado no 1° dia

XB – E3: Xampu B submetido à condição de estufa avaliado no 3° dia.

XB – E7: Xampu B submetido à condição de estufa avaliado no 7° dia.

XB – E14: Xampu B submetido à condição de estufa avaliado no 14° dia.

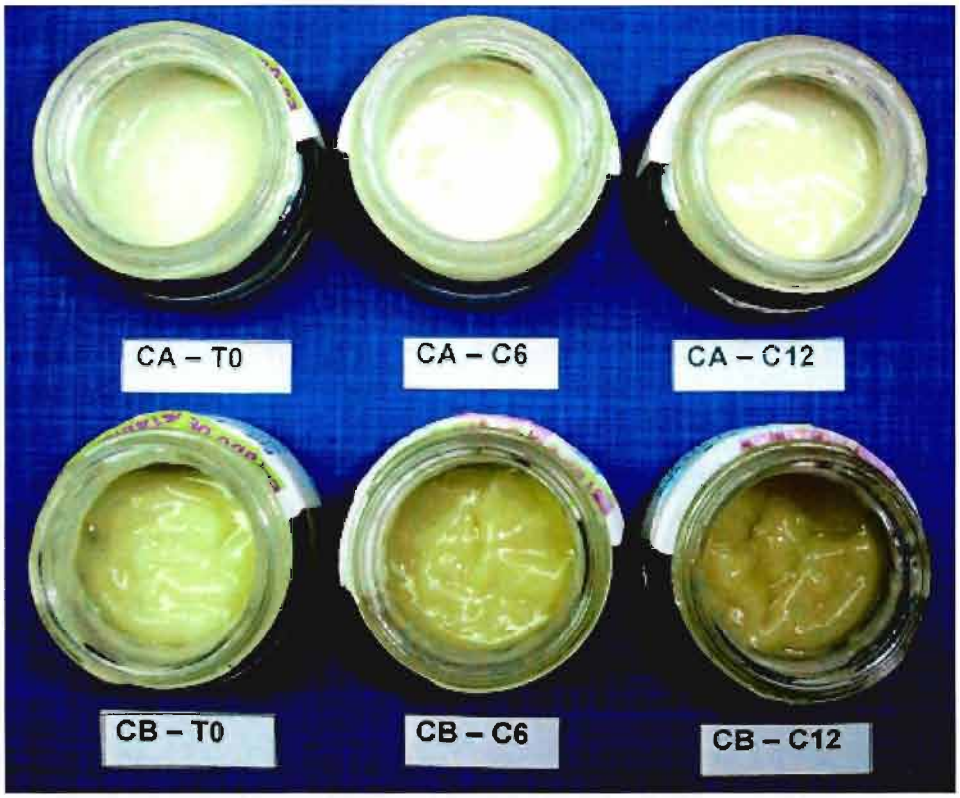


Figura 37: Teste de estabilidade do creme A e creme B – Condição de ciclos gela e degela

CA – t0: controle do creme A.

CA – E3: Creme A submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 6º dia.

CA – E7: Creme A submetido à condição de estufa avaliado no 12º dia.

CB – t0: controle do creme B.

CB – E3: Creme B submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 6º dia.

CB – E7: Creme B submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 12º dia.

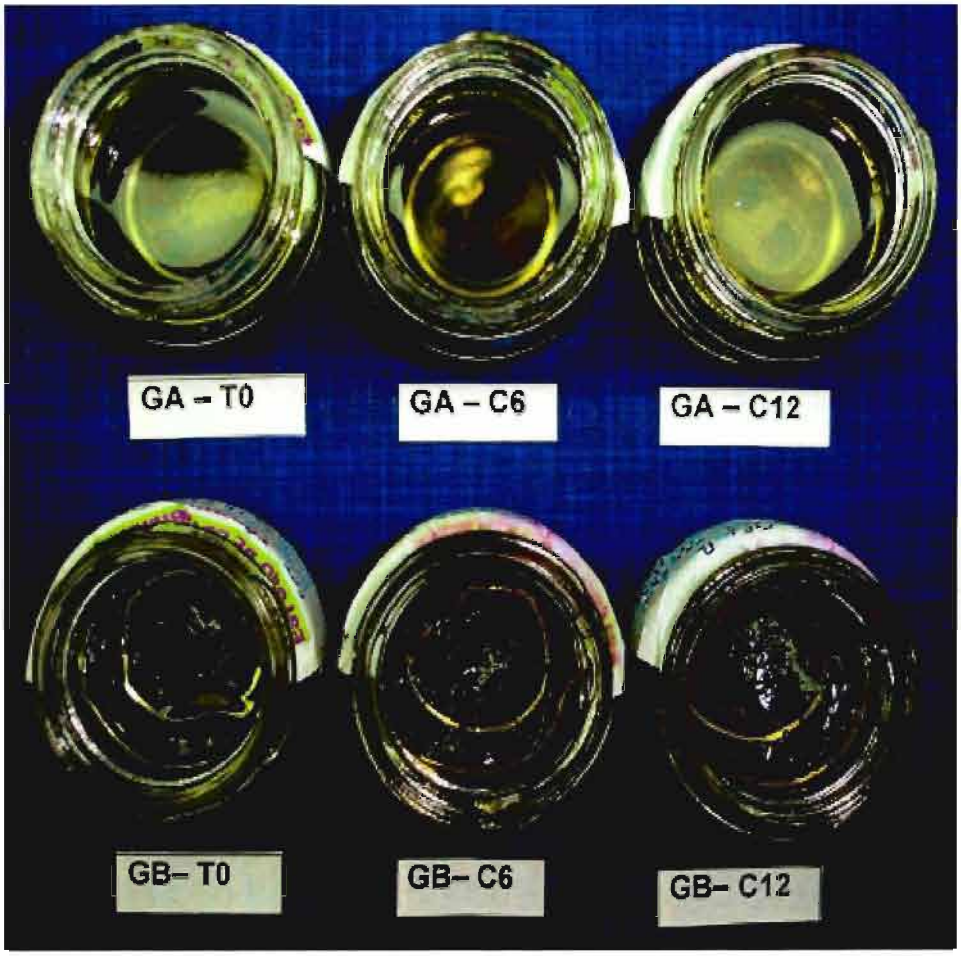


Figura 38: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B. – Condição de ciclos gela e degela

GA – t0: controle do gel A.

GA – E3: Gel A submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 6° dia.

GA – E7: Gel A submetido à condição de estufa avaliado no 12° dia.

GB – t0: controle do gel B.

GB – E3: Gel B submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 6° dia.

GB – E7: Gel B submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 12° dia.

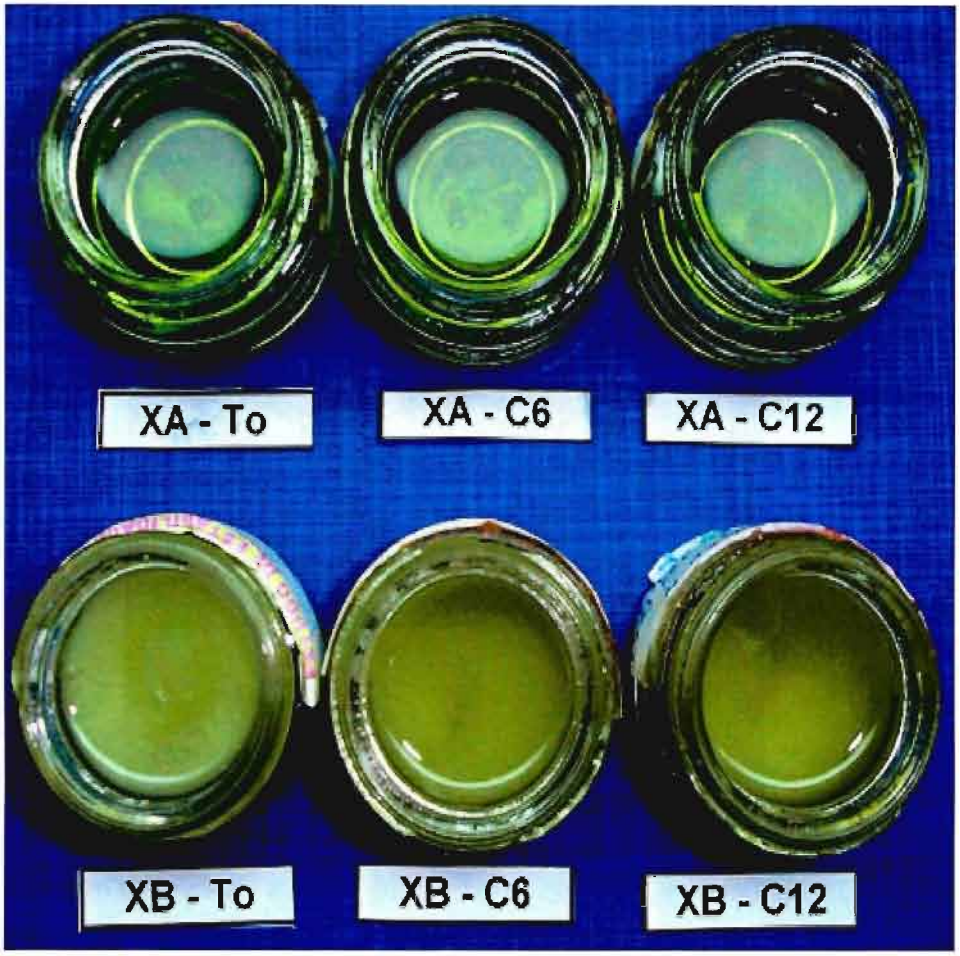


Figura 39: Teste de estabilidade acelerada do xampu A. e xampu B – Condição de ciclos gela e degela

XA – t0: controle do xampu A.

XA – E3: Xampu A submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 6° dia.

XA – E7: Xampu A submetido à condição de estufa avaliado no 12° dia.

XB – t0: controle do xampu B.

XB – E3: Xampu B submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 6° dia.

XB – E7: Xampu B submetido à condição de ciclos gela e degela avaliado no 12° dia.

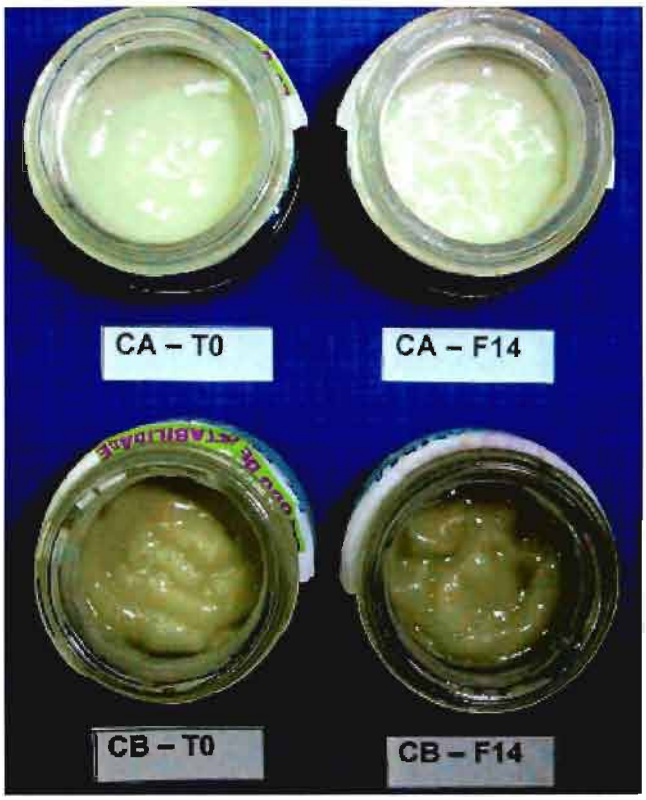


Figura 40: Teste de estabilidade acelerada do creme A. e creme B – Condição de freezer

CA – t0: controle do creme A.

CA – F14: Creme A submetido à condição de freezer avaliado no 14° dia.

CB – t0: controle do creme B.

CB – F14: Creme B submetido à condição de freezer avaliado no 14° dia.

Figura 41: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B – Condição de freezer

GA – t0: controle do gel A.

GA – F14: gel A submetido à condição de freezer avaliado no 14° dia.

GB – t0: controle do gel B.

GB – F14: gel B submetido à condição de freezer avaliado no 14° dia.

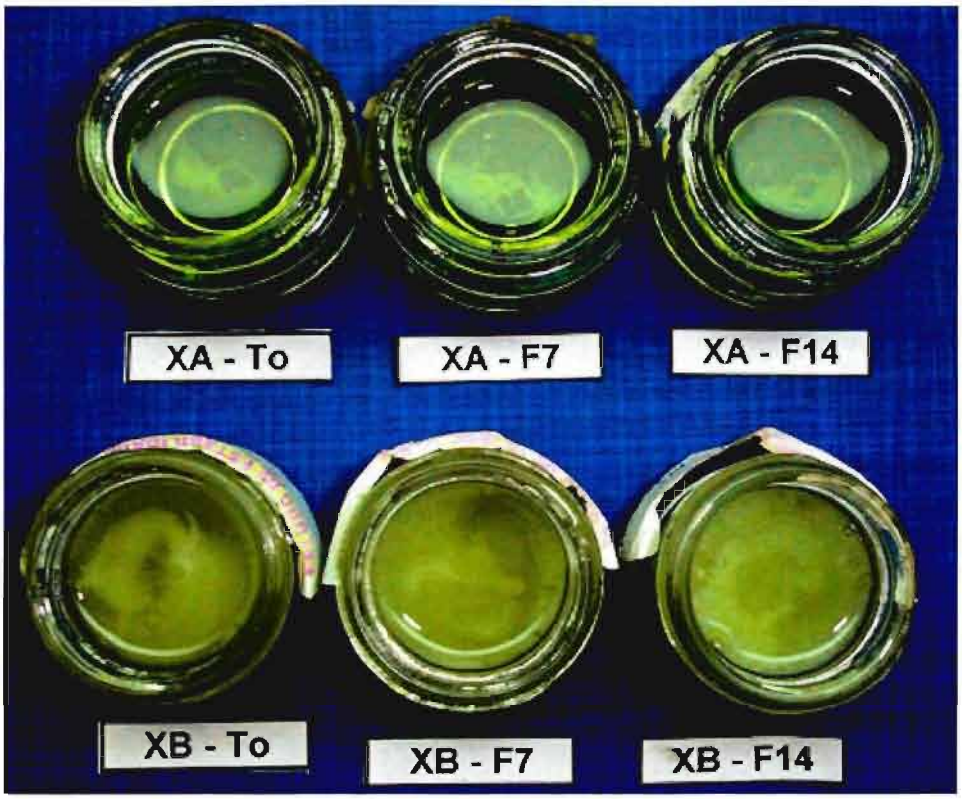


Figura 42: Teste de estabilidade acelerada do xampu A e xampu B – Condição de freezer

XA – t0: controle do xampu A.

XA – F7: xampu A submetido à condição de freezer avaliado no 7° dia.

XA – F14: xampu A submetido à condição de freezer avaliado no 14° dia.

XB – t0: controle do xampu B.

XB – F7: xampu A submetido à condição de freezer avaliado no 7° dia.

XB – F14: xampu B submetido à condição de freezer avaliado no 14° dia.

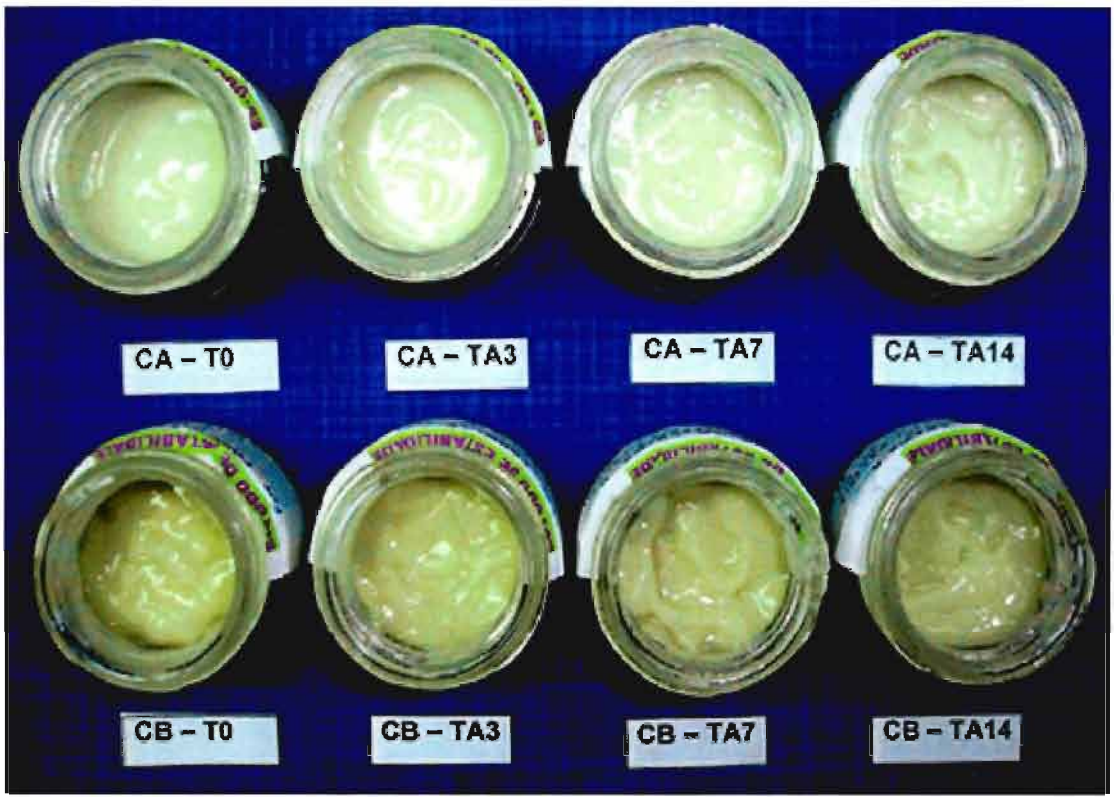


Figura 43: Teste de estabilidade acelerada do creme A. e creme B – Condição de temperatura ambiente e luz solar indireta

CA – t0: controle do creme A.

CA – TA3: Creme A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 3º dia.

CA – TA7: Creme A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 7º dia.

CA – TA14: Creme A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 14º dia.

CB – t0: controle do creme B.

CB – TA3: Creme B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 3º dia.

CB – TA7: Creme B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 7º dia.

CB – TA14: Creme B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 14º dia.

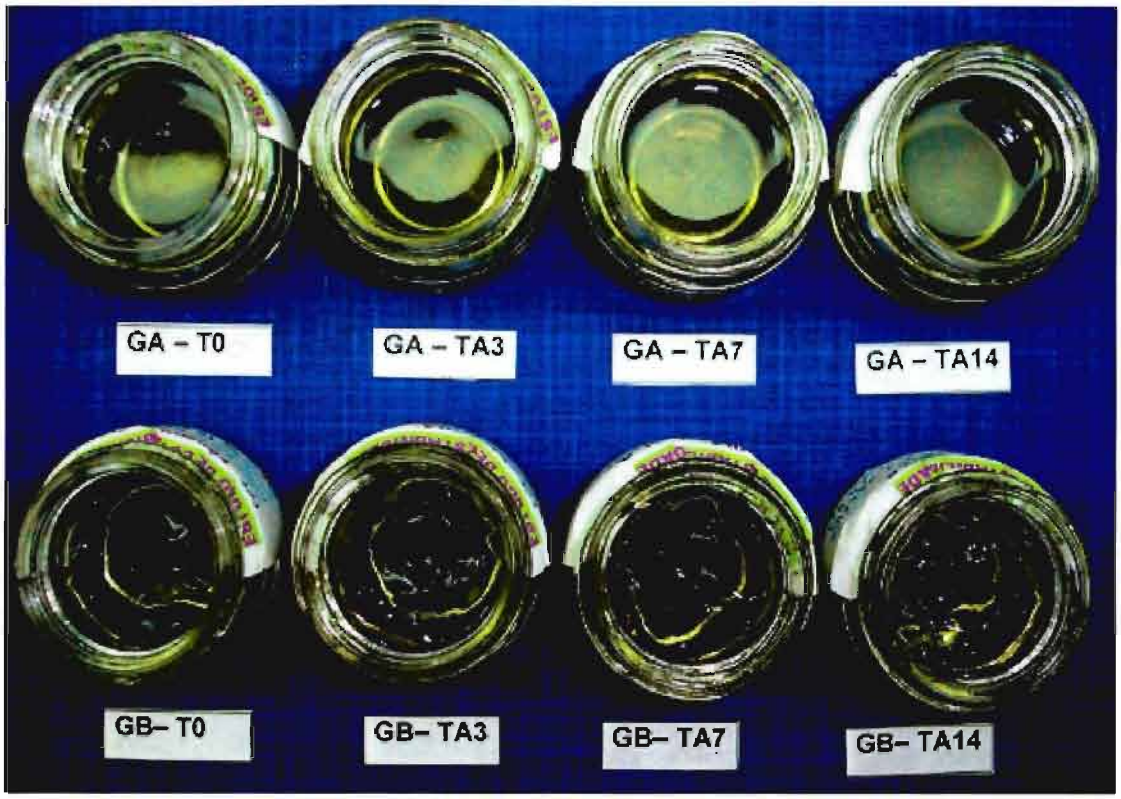


Figura 44: Teste de estabilidade acelerada do gel A. e gel B – Condição de temperatura ambiente e luz solar indireta

GA – t0: controle do gel A.

GA – TA3: gel A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 3° dia.

GA – TA7: gel A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 7° dia.

GA – TA14: gel A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 14° dia.

GB – t0: controle do gel B.

GB – TA3: gel B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 3° dia.

GB – TA7: gel B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 7° dia.

GB – TA14: gel B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 14° dia.

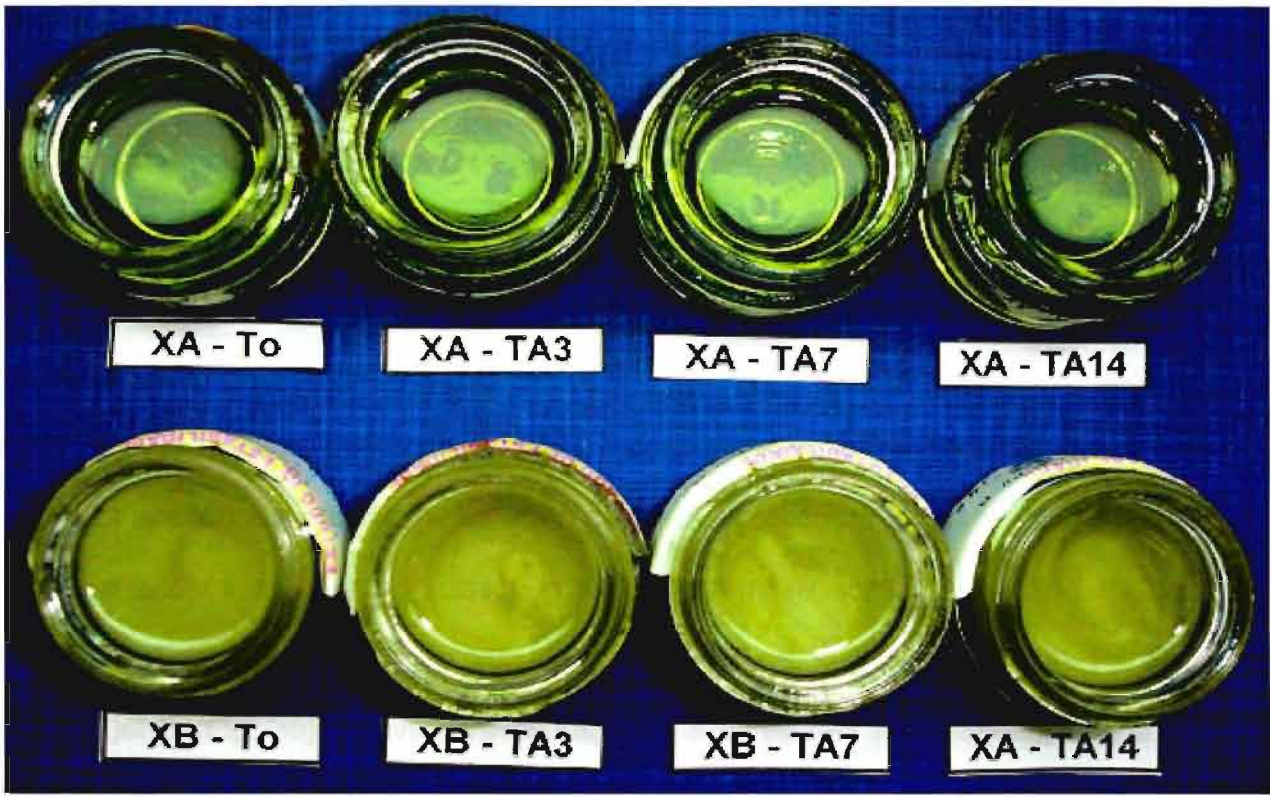


Figura 45: Teste de estabilidade acelerada do xampu A. e xampu B – Condição de temperatura ambiente e luz solar indireta

XA – t0: controle do xampu A.

XA – TA3: xampu A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 3° dia.

XA – TA7: xampu A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 7° dia.

XA – TA14: xampu A submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 14° dia.

XB – t0: controle do xampu B.

XB – TA3: xampu B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 3° dia.

XB – TA7: xampu B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 7° dia.

XB – TA14: xampu B submetido à condição de temperatura ambiente e luz solar avaliado no 14° dia.

De acordo com as tabelas 9, 10. e 11 e as figuras 31, 32, 33, 40, 41, 42, 43, 44 e 45 as formulações: creme A, creme B, gel A, gel B, xampu A e xampu B apresentaram as mesmas características físicas e físico-químicas depois de submetidas e avaliadas nas condições de geladeira de 4-8 ºC; freezer a -10 ºC e temperatura ambiente a 22 ºC e luz solar.

Como podem ser observados nas tabelas 9, 10 e 11 e figuras 34, 35, 36, 37, 38 e 39 ocorreram alterações e modificações apenas nas condições de estufa a 45 ºC e nos ciclos gela e degela, pois nestas condições em que a alta temperatura acelera a decomposição. Além de que nos ciclos gela e degela é intenso o choque térmico.

Em relação à condição de estufa o creme A apresentou leve alteração de cor durante a análise do 7º e 14º dias (Fig. 34). O creme B sofreu alteração leve na análise do 7º dia e uma alteração considerável na análise do 14º dia (Fig. 34). Para o gel A e gel B (Fig. 35), houve leve alteração nas cores das formulações, desde a primeira avaliação (1º dia) até o último dia de análise (14º dia), neste período a alteração permaneceu leve como se pode observar na fig. 35. Para as formulações de xampu como pode ser observado na tabela 11 e na fig. 36 apenas no primeiro dia de análise não foi observada alteração para ambas as formulações de xampu, A e B. A partir do terceiro dia de análise foi observado uma leve alteração na cor do xampu A e xampu B, e no sétimo e no décimo quarto dia de análise observou-se uma alteração considerável nas duas formulações. Apesar de, no xampu A essa alteração não ficar bem evidenciada devida ao reflexo da iluminação, as duas formulações se comportaram da mesma forma sofrendo a mesma intensidade de alteração na coloração quanto avaliadas na condição estufa. Sendo importante ressaltar que houve ainda uma leve alteração no odor das formulações (xampu A e B) na análise do 14º

dia, condição estufa, como pode ser observado na tabela 11. Outra alteração considerável nesta condição foi referente à viscosidade do xampu B, no qual de acordo com a viscosidade aferida por viscosímetro teríamos uma leve alteração no terceiro dia de análise em que foi aferido uma viscosidade de 430 cp, a 100 RPM com uma porcentagem de 87,0% de segurança. Já no sétimo dia de análise tivemos uma intensa alteração na viscosidade com valor de viscosidade igual a 7750 cp, a 5 RPM e 77,5% de segurança. No 14º dia de análise foi encontrada uma situação mais drástica, em que foi obtida uma viscosidade de 8360 cp a 2 RPM e 33,4% de segurança. Sendo que o padrão de normalidade, para viscosidade, adotado foi de 300 cp ± 90. Essa alteração na viscosidade na condição estufa pode ser devido a evaporação de água proveniente do aquecimento dentro da estufa com temperatura de 45 ºC e devido vedação inadequada do frasco de análise, não podendo ser considerado como um problema na formulação ou pela adição do extrato de *L. salviaefolia* como conservante.

De acordo com a figura 37 e a tabela 9, na condição de ciclos gela e degela observou-se que o creme A sofreu uma leve alteração na cor durante a análise do 12º dia. Na mesma condição de ciclos gela e degela, o creme B sofre uma leve modificação no odor e no aspecto, assumindo uma característica menos homogênea que seu controle (CB – t0), evidenciando também uma leve alteração na cor da análise do 6º dia e uma alteração considerável na análise do 12º dia (Tabela 9 e Figura 37).

Entretanto, nas formulações dos géis (A e B) – condição ciclos gela e degela, as alterações em relação à cor foram leves nas análises do 6º dia, e alterado nas análises do 12º dia para ambas as formulações, como se pode observar na figura 38 e

tabela 10. A diferença entre o gel A e o gel B, é somente em relação à intensidade dessas alterações, no gel A as modificações foram pouco mais intensas que as alterações sofridas pelo gel B, apesar desta afirmação não ficar clara quando observamos a figura 38 devido a um reflexo de luz produzido durante a reprodução fotográfica. O reflexo incide sobre a superfície do gel A na análise do 12º dia (GA – C12), levando a interpretação errônea, uma vez que a coloração do gel A na análise do 12º dia apresentou-se mais intensa que a análise do 6º dia, embora na foto, devido ao reflexo, não se tem essa impressão. Adicionalmente, o gel A também apresentou uma leve modificação no odor da formulação na análise do 12º dia (tabela 10).

Em relação às formulações de xampu A e xampu B na condição de ciclos gela e degela foi observada uma leve alteração na cor na análise do 6º e do 12º dia, para ambas as formulações (tabela 11 e figura 39). Além disso, foi observada uma leve alteração na viscosidade do xampu B, em que foi aferida uma viscosidade de 400 cp, à 100 RPM e segurança de 80,7 %. Esse aumento da viscosidade pode ser devido a mal vedação do frasco de análise, não podendo ser considerado como um problema na formulação ou pela adição do extrato de *L. salviaefolia* como conservante

Em resumo, no estudo de estabilidade acelerada das pré-formulações cosméticas houve alterações nas formulações na condição estufa a 45 ºC e na condição de ciclos gela e degela (tabela 9 e 10), justificável uma vez que o aumento da temperatura acelera o processo de decomposição. Entretanto, as alterações foram mais intensas no creme B e no gel A, logo as formulações cosméticas selecionadas para o teste de eficácia do conservante natural foram o creme A e o gel B. Com relação às formulações de xampu, tanto o xampu A como o Xampu B sofreram a alterações similares, ao avaliar os parâmetros pH, aspecto, cor e odor (tabela 11).

Entretanto, ao avaliar o parâmetro viscosidade o xampu A apresentou perda da viscosidade ao incorporar a *L. salviaefolia* como conservante, ou seja, quebra da estabilidade da formulação ao adicionarmos o extrato, esse fato pode ser justificável devido a presença do solvente para diluição da fração de acetato de etila. Por essa razão a formulação de escolha foi o xampu B com base perolada. Como estas formulações mostraram ser estável em condições extremas, tiveram uma boa aplicação como base das formulações que foram testadas no estudo de eficácia de conservantes, no caso, eficácia da *L. salviaefolia* utilizada como conservante natural.

5.7. Teste de eficácia da L. salviaefolia como conservante natural

A presença de microrganismos, em determinados níveis e tipos, em produtos não estéreis, pode ser condição relacionada à deterioração do produto, bem como o não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação pode, também, conduzir a produção com qualidade sanitária inadequada. Esse processo pode até ser observado nos casos em que o substrato oferece condições mínimas necessárias para o desenvolvimento microbiano. Os contaminantes, muitas vezes, sobrevivem e multiplicam-se em meio pobre de fatores nutricionais ou mesmo adaptam-se em condições bastante desfavoráveis. A proliferação de microrganismos pode provocar alterações de diversas naturezas, como perda do teor da substância ativa e alterações físico-químicas e/ou organolépticas do produto. Portanto, a comprovação da qualidade microbiana de produtos cosméticos, objetiva a evitar essas alterações e, principalmente, a transmissão de doenças, pois o consumidor, se em condições

debilitadas, e por vezes com imunidade baixa, toma-se susceptível à ação de microrganismos contaminantes.

Para cosméticos é permitido nível limite de microrganismos viáveis, mas restringe-se, porém, a ausência de patogênicos específicos. Assim, a formulação deve ser criteriosamente estudada no tocante a eficácia do sistema conservante do produto, essa só pode ser garantida através de teste de eficácia de conservante ou desafio. O ensaio consiste na contaminação proposital da amostra com microrganismos padrão e determina-se a carga dos sobreviventes em períodos pré-estabelecidos durante 28 dias, utilizando-se técnica de contagem microbiana validada.

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 (USP XXIX), 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 da atividade antimicrobiana do conservante na contagem de microrganismos viáveis, utilizando a técnica por semeadura em profundidade ou "Pour Plate". O teste visa à seleção das condições de neutralização do conservante durante o período de incubação das placas contendo o produto, os microrganismos e o meio de cultura no teste de eficácia de conservantes. Ressalta-se que o período de incubação para alguns fungos é de até mais que 7 dias, que resulta em tempo de obtenção do resultado do teste de eficácia diferente do preconizado. 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 é 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 é de 70 % de recuperação do microrganismo inoculado para comprovação da inativação do sistema conservante e confiabilidade no resultado. Os valores abaixo de 70% não são considerados e indicam que os inativantes e/ou a concentração dos mesmos estão inadequados, devendo ser alterados.

A Tabela 13 apresenta os resultados da recuperação dos microrganismos nas duas condições de neutralização, descrita no item (4.6.5) Validação da metodologia / Escolha de condição de neutralização do sistema conservante (USP XXIX). Observa-se que o controle apresentou a recuperação sempre maior que 70% para todos os microrganismos como era esperado, demonstrando a viabilidade dos microrganismos durante a validação 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 (USP XXIX) não é descrita a utilização de um controle, no entanto, para assegurar a validação realizou-se, também esse ensaio.

Ao se comparar às condições estudadas observa-se que somente na condição 2 foi possível recuperar todos os microrganismos (Tabela 13). Esses resultados

indicaram que para a enumeração dos microrganismos haveria a necessidade de uma diluição 10^{-1} das formulações Creme A, Gel B e Xampu B, com diluente Dey Engley (D/E). Frente a esses resultados para o teste de eficácia de conservantes, procedeu-se à diluição das formulações antes enumeração ou contagem de microrganismos viáveis, descritas no item (4.6.4) Enumeração ou contagem de microrganismos viáveis (USP XXIX, JP XIV) , nos períodos imediatamente após a inoculação, após 2, 7,14, 21 e 28 dias.

Tabela 13. Recuperação dos microrganismos avaliados nas condições de neutralização estudadas para inativação do sistema conservante e microrganismos.

Condição	Microrganismo	Controle	Creme A	Gel B	Xampu B
1	*P. aeruginosa*	>70%	>70%	>70%	<70%
	E. coli	>70%	>70%	>70%	>70%
	S. aureus	>70%	>70%	<70%	<70%
	C. albicans	>70%	<70%	<70%	<70%
	Burkholderia cepacia	>70%	>70%	>70%	<70%
	A. niger	>70%	<70%	<70%	<70%
2	*P. aeruginosa*	>70%	>70%	>70%	>70%
	E. coli	>70%	>70%	>70%	>70%
	S. aureus	>70%	>70%	>70%	>70%
	C. albicans	>70%	>70%	>70%	>70%
	Burkholderia cepacia	>70%	>70%	>70%	>70%
	A. niger	>70%	>70%	>70%	>70%

Controle = solução salina a 0,9% (p/v) estéril; amostra-teste = produto preparado com conservante, em condições assépticas; Cada algarismo representa a média do ensaio realizado em cinco réplicas.

Para avaliação da eficiência do sistema conservante, os métodos oficiais (USP XXIX 2006; JP XIV 2001; BP 2005) e não oficiais The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA, 2001) foram utilizados, pois estes fornecem informações para melhor conduzir o ensaio. Como descrito em material e método, o teste consiste na contaminação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia, Candida albicans* e *Aspergillus niger* em cada amostra e determina-se a carga dos sobreviventes em períodos pré-estabelecidos durante 28 dias, utilizando-se técnica de contagem microbiana convencional validada. Os resultados da avaliação da atividade conservante, extrato a 0,2% (p/v) , nas formulações de Creme A, Gel B e Xampu B são apresentados a seguir.

Tabela 14. Carga de sobreviventes de *Escherichia coli* ATCC 10536 (UFC/g ou mL) no teste de eficácia de conservantes

Intervalos de tempo/ Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$1,7 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$2,0 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$1,8 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$2,1 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$9,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$

Legenda:
t_0 = contagem imediatamente após a inoculação
t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação
t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação

Tabela 15. Carga de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027(UFC/g ou mL) no teste de eficácia de conservantes

Intervalos de tempo/ Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$3,0 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$2,1 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$6,2 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	< 10	< 10

Legenda:
t_0 = contagem imediatamente após a inoculação
t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação
t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação

Tabela 16. Carga de sobreviventes de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538(UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes

Intervalos de tempo/ Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$4,7 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$6,6 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$4,1 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$2,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4$	$5,1 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10

Legenda:
t_0 = contagem imediatamente após a inoculação
t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação
t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação

Tabela 17. Carga de sobreviventes de *Burkholderia cepacia* ATCC (UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes

Intervalos de tempo/ Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$9,5 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$7,8 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$9,8 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$2,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10

Legenda:
t_0 = contagem imediatamente após a inoculação
t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação
t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação

Tabela 18. Carga de sobreviventes de *Candida albicans* ATCC 10231(UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes

Intervalos de tempo/ Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$8,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$7,6 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	< 10	< 10	< 10
Xampu	$6,2 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$7,2 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$

Legenda:
t_0 = contagem imediatamente após a inoculação
t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação
t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação

Tabela 19. Carga de sobreviventes de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes

Intervalos de tempo/ Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$4,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	$9,0 \times 10^4$
Gel	$3,8 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
Xampu	$4,0 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$6,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$

Legenda:
t_0 = contagem imediatamente após a inoculação
t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação
t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação

O teste foi realizado, concomitantemente com solução salina a 0,9% (p/v) inoculada com a mesma carga microbiana da amostra teste, a suspensão foi considerada controle e tinha como intuito a verificação da viabilidade dos microrganismos desafiantes durante os 28 dias do teste. Nesta condição, verificou-se que para as bactérias *Escherichia coli* (tabela 14), *Pseudomonas aeruginosa* (tabela 15), *Staphylococcus aureus* (tabela 16) e *Burkholderia cepacia* (tabela 17) apresentaram-se viáveis durante todos os testes, assim como para os fungos *Candida albicans e Aspergillus niger* que se mantiveram, também, adequados no decorrer do tempo de avaliação. Em se tratando de manter o microrganismo em solução salina, como pode ser observado na última coluna das tabelas 14, 15, 16, 17, 18 e 19, houve decaimento do número de microrganismos sobreviventes e posterior aumento, ou mesmo só o decaimento no decorrer do tempo. esse comportamento pode ser

considerado normal uma vez que o meio de cultivo (solução salina) é pobre em nutrientes, ocorrendo uma menor multiplicação do germe. O aumento pode ser explicado pela adaptação dos microrganismos frente a essa condição.

Os critérios de aceitação do sistema conservante foram de acordo com o CTFA (2001) que requer 7 dias e 28 dias, como período de tempo de avaliação do decréscimo da carga microbiana em relação a carga inicial (t0). No entanto, para acompanhar criteriosamente o comportamento da carga microbiana durante o ensaio foram analisados, também, os intervalos de tempo de 2, 14, 21 e 28 dias. Adicionalmente, essas determinações poderiam informar a ocorrência do fenômeno conhecido como "reboud" ou "Phoenix", que apresenta decaimento do número de microrganismos sobreviventes e posterior aumento do número, no decorrer do tempo do teste (BLOOMFIELD,1988).

De acordo com os resultados analíticos descritos nas tabelas 14, 15, 16, 17, 18 e 19 pode-se afirmar que: as amostras de creme, gel e xampu na concentração de 0,2% da fração de acetato de etila do extrato etanólico de *L. salviaefolia* atendem a especificação adotada para as bactérias: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia,* e *Cândida albicans*.

Diante dos resultados obtidos com as formulações creme e gel, afirma-se que para este tipo de formulação a fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* na concentração de 0,2% não foi eficaz como conservante contra o bolor *Aspergillus niger* (Tabela 19), pois não atendem a especificação de acordo com o critério de aceitação do CTFA sendo que não pode ser constatada a redução logarítmica no intervalo de tempo igual a 7 dias. Entretanto, para a formulação de xampu, a fração de acetato de etila do extrato de *L. salviaefolia* mostrou-se eficaz. Este fato pode ser

explicado devido à presença de tensoativos na formulação do xampu o que deve ter exercido um efeito sinérgico à ação antimicrobiana do extrato.

De acordo com as tabelas 15, 16 e 17, verifica-se uma redução considerável em relação à carga de sobreviventes dos microrganismos na solução salina. Porém este fato não invalida o teste, tão pouco invalida atividade antimicrobiana da *L. salviaefolia*, uma vez que para os mesmos microrganismos nas mesmas tabelas 15, 16 e 17 pode ser verificada uma carga menor que 10 colônias desde o intervalo de tempo (T_{48}), ou seja, com apenas 48 horas de contato.

5.8. Avaliação da segurança das bases e das formulações cosméticas incorporadas com L. salviaefolia como conservante através de estudos histológicos – microscopia óptica, em substituto cutâneo dermo-epidérmico

Após o período de contato de 24 horas ou 48 horas, das amostras com o substituto cutâneo dérmico-epidérmico, corte e coloração por hematoxilina-eosina, foi observado o efeito das bases sem a incorporação da *L. salviaefolia* e das formulações cosméticas com a incorporação da *L. salviaefolia*, na epiderme de cada sistema dérmico-epidérmico. Avaliando, desta forma, a segurança de cada formulação.

Na figura 46 temos o controle chamado de branco 24h em que não foi adicionada nenhuma amostra, mas, permaneceu no sistema de cultivo na interfase ar-líquido durante as 24 horas de teste. Nesta ilustração o epitélio se mostrou organizado e reproduzindo a morfologia esperada para derme e epiderme, com diferença tintoriais devido ao amadurecimento celular, podendo ser observado ainda as lamelas de queratina, constituindo a camada córnea. Além da observação das camadas intermediária ou espinhosa e a granulosa.

Figura 46 – Branco 24h – Controle do composto dérmico-epidérmico após 24 h no sistema de cultivo na interfase ar-líquido – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 47 consta o estudo histológico da pele após o contato de 24 h com a formulação base gel, observados em microscopia óptica, revelam a morfologia da epiderme e da derme, apesar da separação dermo-epidérmica pode ser observada uma leve toxicidade devido a leve alteração na morfologia da epiderme (seta).

Figura 47 – Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a base gel sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 48 consta o estudo histológico da pele após o contato de 24 horas com a formulação cosmética gel, incorporada com *L. salviaefolia* como conservante natural. Neste caso pode-se observar uma maior toxicidade da formulação uma vez que houve uma alteração significativa na morfologia da epiderme, e morte de grande parte dos queratinócitos. Constatado devido à impossibilidade de identificação destas células como ainda pode-se visualizar na figura 46. Essa maior toxicidade quando comparamos o gel sem a incorporação da *L. salviaefolia* se deve a toxidade inerente ao extrato, porém é importante resaltar que a própria formulação sem a adição da *L. salviaefolia* já tinha demonstrado certa toxicidade.

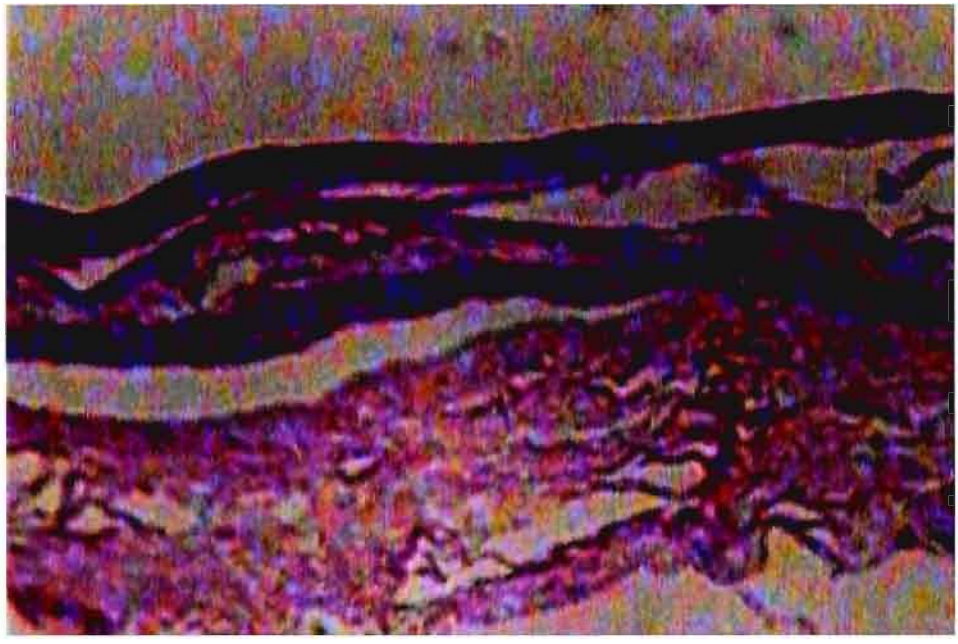


Figura 48 – Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação gel incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

A formulação creme foi a que apresentou menor toxicidade mantendo derme e epiderme com características morfológicas normais após o tempo de contato de 24 h (Figura 49).

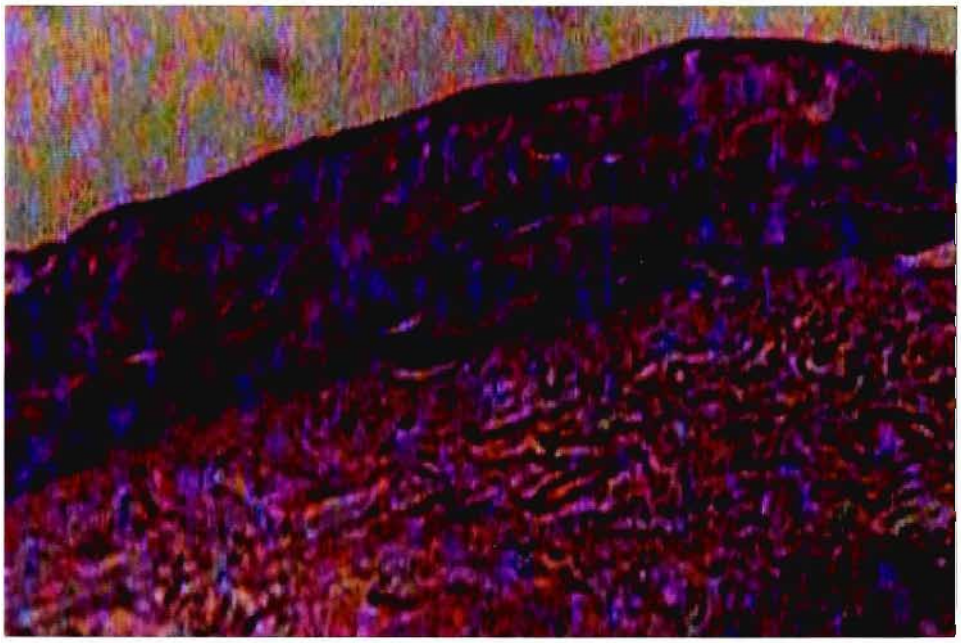


Figura 49 – Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a base creme sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 50 constatou-se a influência da formulação cosmética creme incorporada com *L. salviaefolia*, apesar do maior desprendimento da queratina foi verificada uma baixa toxicidade. Observando ainda as células de queratinócitos viáveis na epiderme. Além da manutenção na morfologia da derme e da epiderme.

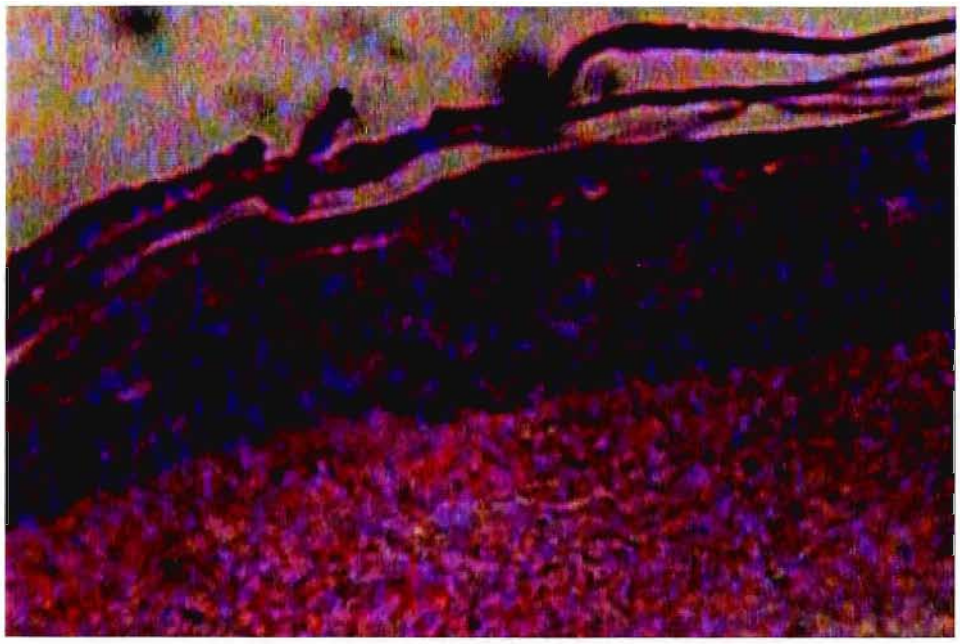


Figura 50 – Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação creme incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 51 constatou-se a toxicidade da formulação de xampu mesmo sem a adição da *L. salviaefolia*, isso se deve a presença de tensoativos, por isso são empregados, na sua maioria, em produtos de uso externo e com enxágüe. Na figura 51 observa a desprendimento de toda parte córnea de queratina, da epiderme e uma própria alteração estrutural da epiderme principalmente na camada intermediária, apesar de ainda ser possível observar células de queratinócitos viáveis principalmente próximas às papilas dérmicas na camada basal.

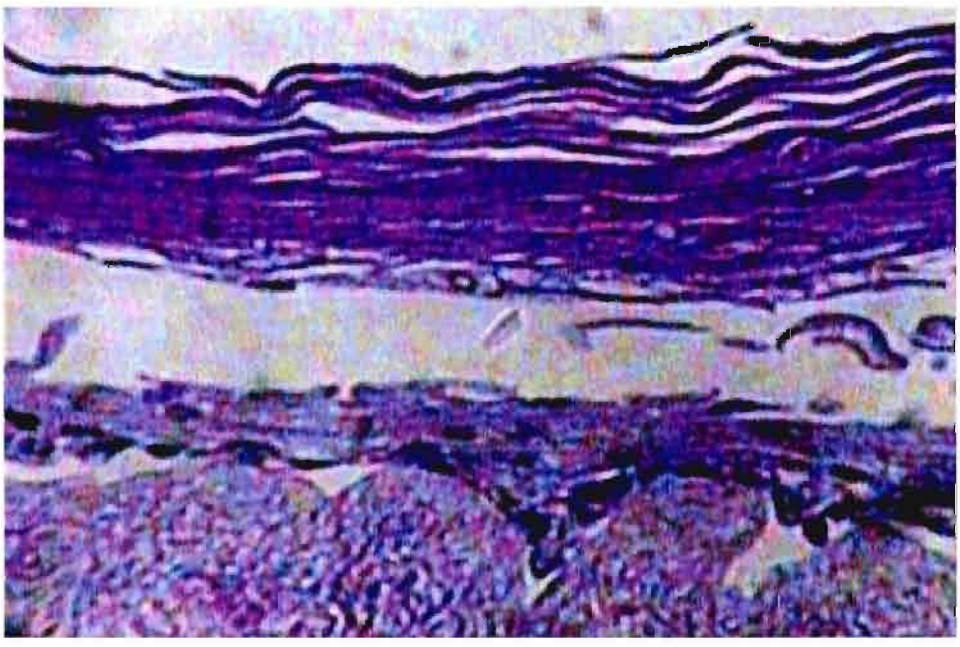


Figura 51 – Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a base xampu sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 52 tem-se o composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação cosmética xampu incorporada com *L. salviaefolia*. Os efeitos tóxicos são similares aos efeitos apresentados pela figura 51 representando a base de xampu sem a adição da fração de acetato de etila do extrato de *L. salviaefolia*. Na qual se verifica um desprendimento da camada córnea e a separação dermo-epidérmica, com alteração estrutural da epiderme. Características evidenciadas pela toxidade da base do xampu e toxicidade da *L. salviaefolia*, entretanto toda a toxicidade constatada nas figuras 51 e 52 não devem ser atribuídas somente ao extrato uma vez que a formulação sem a o extrato também se mostrou tóxica, provavelmente pela presença dos tensoativos na formulação.

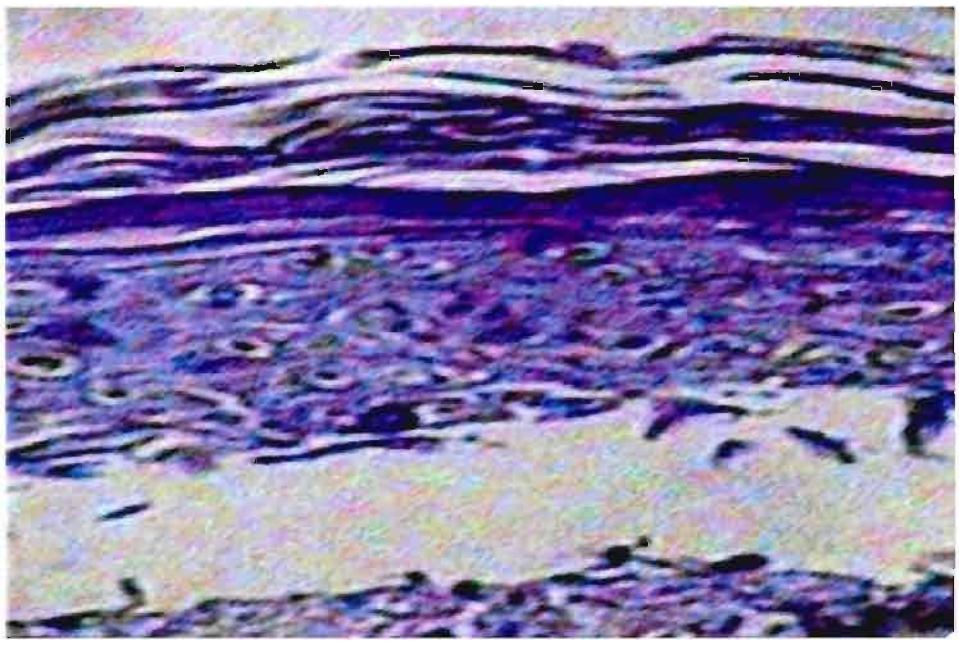


Figura 52 – Composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação xampu incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 53 temos o controle chamado de branco 48 h em que não foi adicionada nenhuma amostra, mas, permaneceu no sistema de cultivo na interfase ar-líquido durante as 48 horas de teste. Nesta ilustração o epitélio se mostrou organizado apesar da separação da derme e da epiderme, sendo que na avaliação da toxicidade para este teste não foi levado em consideração a separação da derme e epiderme, pois pode ser um artefato, desta forma a toxicidade foi avaliada conforme ao aspecto das diferenças morfológicas e diferenças tintoriais da pele. Na figura 53 pode-se evidenciar diferença tintoriais devido ao amadurecimento celular, podendo ser observado ainda as lamelas de queratina, constituindo a camada córnea. Além da observação das camadas intermediária ou espinhosa e a granulosa.

Figura 53 – Branco 48h – Controle do composto dérmico-epidérmico após 48 h no sistema de cultivo na interfase ar-líquido – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 54 tem-se a influência da amostra de gel base em 48 horas de contato com o composto dérmo-epidérmico. Nesta ilustração temos a visualização apenas da parte epidérmica em que é possível verificar a toxicidade da base gel devido às características morfológicas e tintoriais presentes na epiderme, principalmente na visualização das células de queratinócitos que ficam pouco evidentes e no desprendimento da parte córnea.

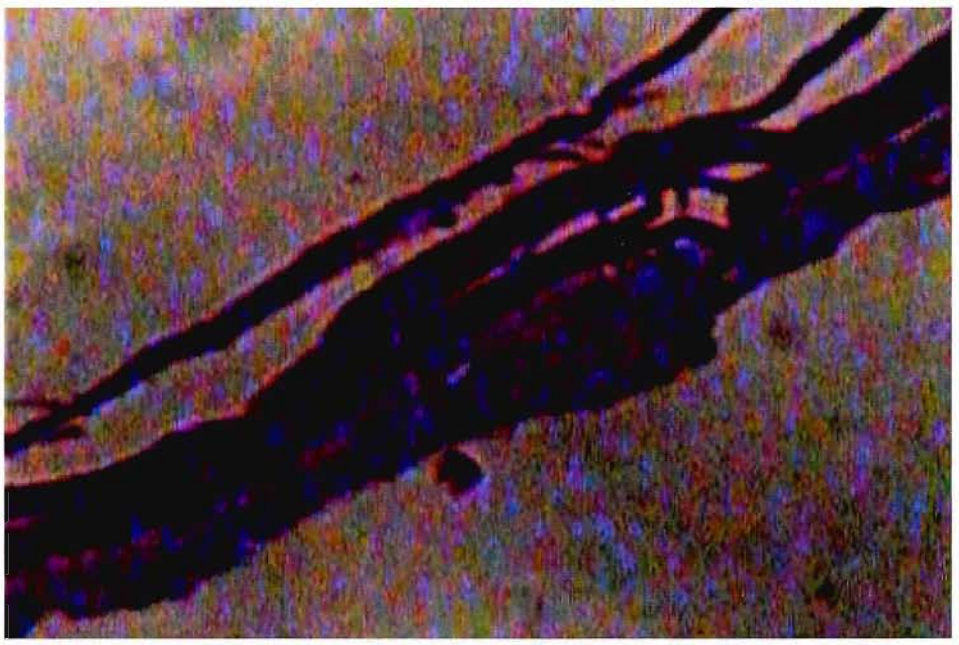


Figura 54 – Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a base gel sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Na figura 55 verifica-se a toxicidade do gel com *L. salviaefolia* em contato com o composto dérmico-epidérmico, constatando diferença na morfologia e aspectos tintoriais, desprendimento da derme e epiderme, desprendimento da camada superficial da camada córnea, dificuldade de identificação de queratinócitos viáveis. Entretanto é importante ressaltar que nesta figura temos a toxicidade da formulação base associada à toxicidade da *L. salviaefolia*. E quando comparada com a figura 54 não existem diferenças significativas. O que sugere que parte da toxicidade deve-se aos próprios constituintes da formulação base.

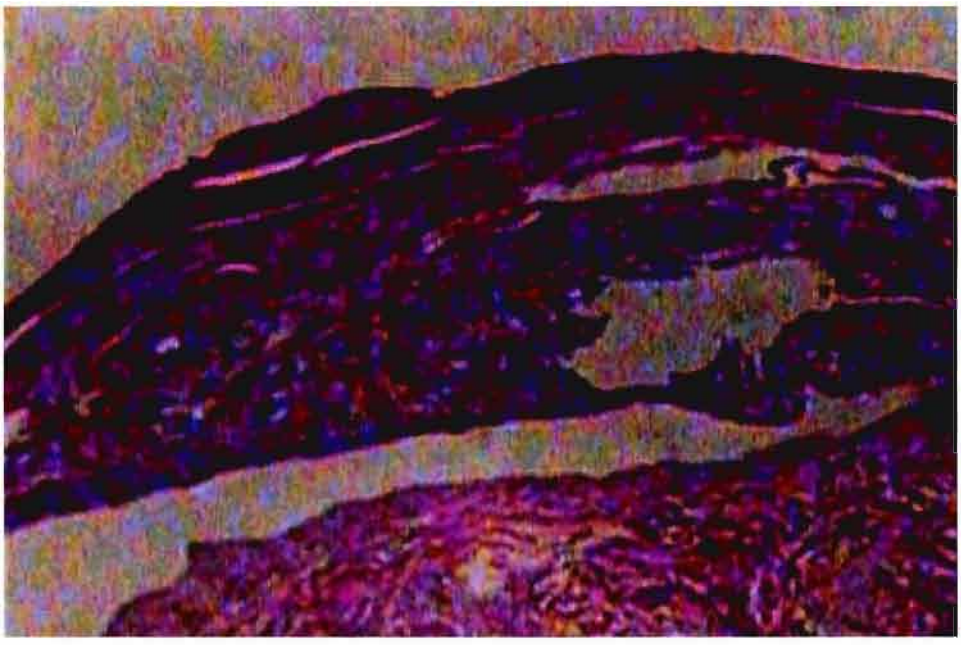


Figura 55 – Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a formulação gel incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

O estudo histológico por microscopia óptica visando avaliar a toxicidade das formulações cosméticas de creme por 48 h de contato, está evidenciado nas figuras 56 e 57.

Na figura 56 consta apenas à influência da base da formulação sem a adição da *L. salviaefolia* e na figura 57 tem-se a formulação incorporada com o extrato da planta. Em ambas as figuras tem-se a visualização apenas da epiderme. Na figura 56 pode visualizar mais facilmente queratinócitos viáveis.

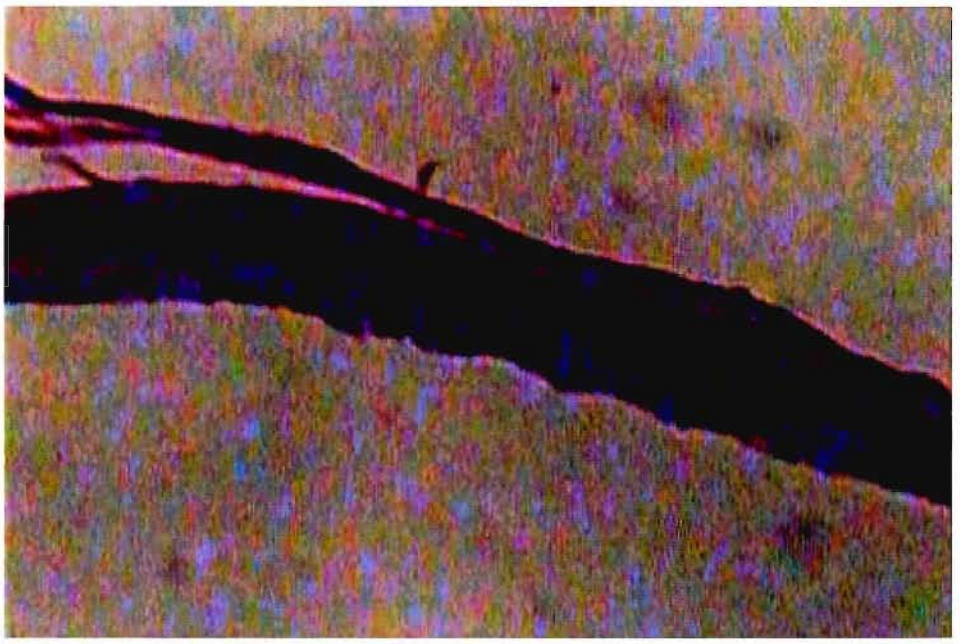


Figura 56 – Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a base creme sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Enquanto que na figura 57, a presença das células de queratinócitos viáveis não são tão facilmente detectáveis, sugerindo uma maior toxicidade apresentada pela formulação com a incorporação da *L. salviaefolia.*

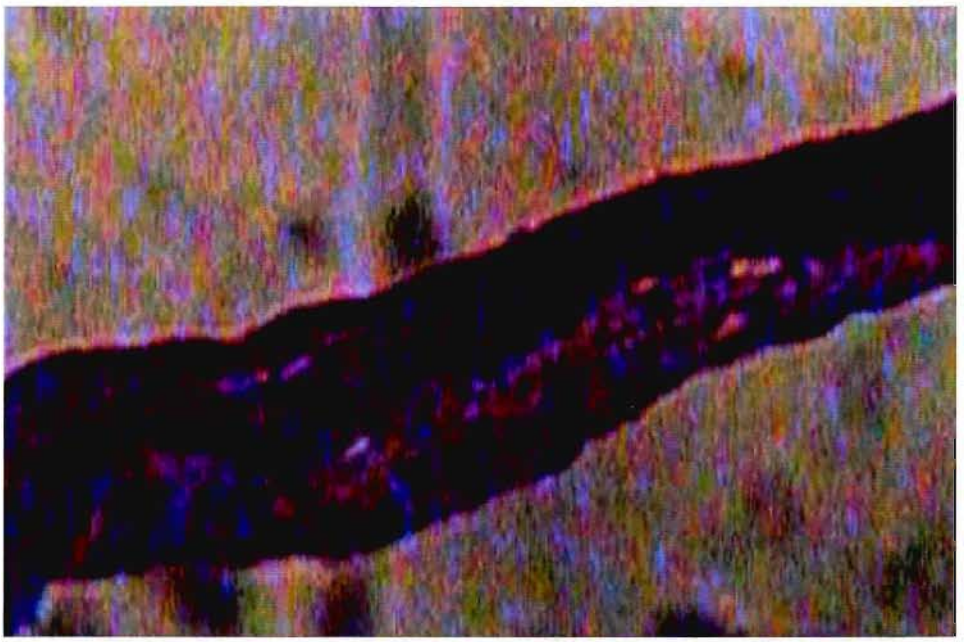


Figura 57 – Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a formulação creme incorporada de fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

A avaliação da toxicidade das formulações de xampu base e xampu incorporado com *L. salviaefolia* em composto dérmico-epidérmico estão elucidados nas figuras 58 e 59. Pode-se verificar uma toxidade significativa em ambas as formulações devido a diferenças morfológicas e tintoriais da epiderme.

Na figura 58 evidenciamos a separação da derme e da epiderme além da separação da camada córnea e da camada superficial na epiderme, adicionalmente a dificuldade em se evidenciar células de queratinócitos viáveis.

Figura 58 – Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a base xampu sem a adição de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Assim como na figura 58 na figura 59 constata-se a separação da derme e epiderme, entretanto a epiderme não apresentou grandes alterações morfológicas, o que caracteriza um nível de toxicidade semelhante entre as formulações com e sem a incorporação de *L. salviaefolia*.

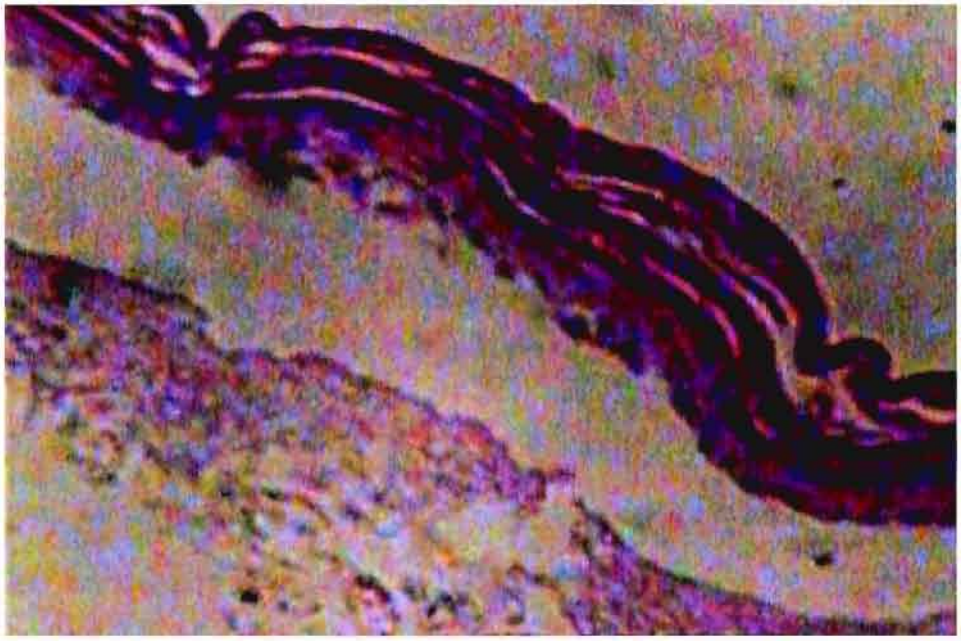


Figura 59 – Composto dérmico-epidérmico após 48 h de contato com a formulação xampu com incorporada com fr. ac. etila de *L. salviaefolia* – microscopia óptica. (aum.: 1000x)

Depois de verificar a interferência das formulações bases, sem a incorporação da *L. salviaefolia*, foi constatado que mesmo as bases das formulações, principalmente na formulação de xampu, exercem efeito tóxico perante as culturas dos substitutos cutâneos dermo-epidérmico. Desta forma em alguns casos não pode-se afrimar que tais efeitos tóxicos são devido exclusivamente a fração de acetato de etila da *Lippia saviaefolia*.

Entretanto como era esperado, com a adição da *L. salviaefolia* foi verificada leve intensificação na toxicidade das formulações. Diante deste fato foi proposto estudar a toxicidade *in vitro* da fração de acetato de etila do extrato hidroalcóolico de *L. salviaefolia.* Sendo que em tal estudo pode verificar a toxicidade do extrato em um sistema mais sensível, e em diferentes concentrações e diversos tempos de contato.

No experimento da citoxicidade em cultura de queratinócitos humanos a fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* será colocado diretamente sobre os queratinócitos. Desta maneira o teste é mais sensível que o teste *in vivo* ou até mesmo, mais sensível que o teste anterior, desta maneira os resultados serão expostos com maior segurança em relação ao estudos de toxicidade no composto dérmico-epidermico. Salientando ainda a relação de diversas concentrações e diferentes tempo de contato da fração de acetato de etila da *L. salviaefolia* em contato com os queratinócitos humanos.

5.9. Teste de toxicidade in vitro da fr. ac. etila de L. salviaefolia

Cálculo da quantidade inicial de células a serem utilizadas para o teste de viabilidade celular

Número de células	Cultura celular
2.500	
5.000	
10.000	
15.000	
25.000	
50.000	

Figura 60 – Aspecto do crescimento da cultura de queratinócitos em relação ao número de células.

De acordo com a legislação vigente no Brasil e orientação mundial, os testes *in vitro* para a avaliação da toxicidade ainda não possam substituir completamente os

testes *in vivo*, os testes *in vitro*, vem cada vez mais, sendo amplamente utilizados e nos fornecendo informações importantes quanto aos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular.

Os testes de viabilidade celular fornecem informações quanto a respostas imediatas ou curtas, tais como alterações na permeabilidade da membrana ou uma perturbação de um caminho metabólico específico, medem a proporção de células viáveis após um procedimento traumático. A maioria destes testes se baseia na ruptura da integridade da membrana que é determinada pela entrada de um corante ao qual a célula é geralmente impermeável (ex.: "trypan blue") ou a liberação de um corante normalmente adquirido e retido por células viáveis (ex.: "neutral red"). Este efeito, no entanto, é imediato e não prevê sobrevivência posterior (FRESHNEY, 2000).

Os testes de sobrevivência esclarecem a capacidade de renovação celular. Enquanto os testes de viabilidade são convenientes e geralmente rápidos e fáceis de realizar, eles mostram apenas as células mortas, ou seja, permeáveis, durante a realização do teste (FRESHNEY, 2000).

O teste de toxicidade iniciou-se com a seleção das condições do experimento. A figura 60 apresenta o crescimento da cultura de queratinócitos com diferentes concentrações de células. Baseado nos resultados estimou-se a quantidade inicial de células a serem utilizadas para o teste de viabilidade celular. A visualização ao microscópio invertido e posterior coloração das células com Rodamina B mostrou que para o teste de avaliação de viabilidade celular, poderiam ser usadas concentrações iniciais de células, variando de 15.000, onde a coloração poderia ser bem observada a olho nu, até 50.000 onde no final do experimento, as culturas ainda não haviam atingido a confluência. Entretanto, ficou estabelecido que o melhor número de células

por poço para prosseguir com os experimentos seria de 50.000 células/poço trabalhando com uma melhor visualização e segurança devido à intensidade da coloração.

De acordo com resultados obtidos no teste de citoxicidade (Figura 61) verificou-se que a *L. salviaefolia* na concentração de 0,2 %, correspondente ao CMI, foi tóxica em quase todos os tempos de contato, exceto com meia hora de contato, em que se observa uma viabilidade celular de cerca de 90%.

Na concentração de 0,1 % da fração de acetato de etila da *L. salviaefolia*, observou-se citoxicidade nos tempos de 24 e 48 horas. Entretanto nesta mesma concentração (0,1 %) com 6h de contato alcançou uma viabilidade celular de 70%, atingindo segurança nos tempos de 2h e meia hora de contato (Figura 61).

Na concentração de 0,05 % da fração de acetato de etila da *L. salviaefolia*, com 48 horas de contato demonstrou uma viabilidade celular de cerca de 70%. Nesta mesma concentração com 24 e 6 horas de contato apresentou viabilidade celular em torno de 80%, atingindo a faixa de segurança com meia e 2h de contato (Figura 61).

Já nas concentrações de 0,025 e 0,0125 % de acetato de etila de *L. salviaefolia*, apenas em 48 horas de contato observou leve toxicidade em que a viabilidade celular ficou entre 80 e 90 %. Nos demais tempos de contato testados, mostraram-se seguras (Figura 61), sugerindo que formulações cosméticas de uso externo, contendo até 0,025 % de acetato de etila de *L. salviaefolia*, podem ser consideradas seguras.

Deste modo, sugere-se que a fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* na concentração do CMI (2,0 mg/mL), demonstrou ser citotóxica apenas após 6 horas de contato, sendo que com 2 horas de contato atingiu uma viabilidade celular de pouco

menos de 30%, atingindo segurança e viabilidade celular apenas com meia hora de contato com perfil semelhante ao controle.

É importante salientar que o teste de segurança em cultura de queratinócitos humanos é extremamente sensível, pois a substância teste entra diretamente em contato com os queratinócitos, situação que não acontece na pele *in vivo*, pois na epiderme, existe a camada córnea composta por células mortas, ou melhor, queratinócitos diferenciados, os quais fornecem maior proteção contra penetração e absorção dérmica. Deste modo, o trabalho apresenta como perspectiva uma avaliação de absorção para constatação de qual concentração da *L. salviaefolia* entra realmente em contato com os queratinócitos viáveis. Entretanto, mesmo com a toxicidade determinada a *L. salviaefolia* poderia ser utilizada como conservante em formulações de enxágüe, como no caso do xampu, onde a legislação permite o uso de substâncias mais agressivas. De acordo com a RDC nº. 162 de 11 de setembro de 2001 (BRASIL 2001) é permitido o uso de tais substâncias, desde que obedecidas certas restrições. Nesta resolução têm-se uma lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, com toxicidade considerável, constando máxima concentração autorizada, limitações, condições de uso e advertência.

Outro possível uso para a *L. salviaefolia* seria como antimicrobiano seletivo. De acordo com a pesquisa desenvolvida nesse trabalho, o CMI para a fração de acetato de etila apresenta valores dentro do que limite de segurança para *S. aureus*, com CMI de 0,035 – 0,005 mg/mL; para *C. albicans* com CMI de 0,25-0,375 mg/mL e para *E. coli* com CMI de 0,5 – 0,75 mg/mL.

Citotoxicidade da *L. salviaefolia* em cultura de queratinócitos humanos

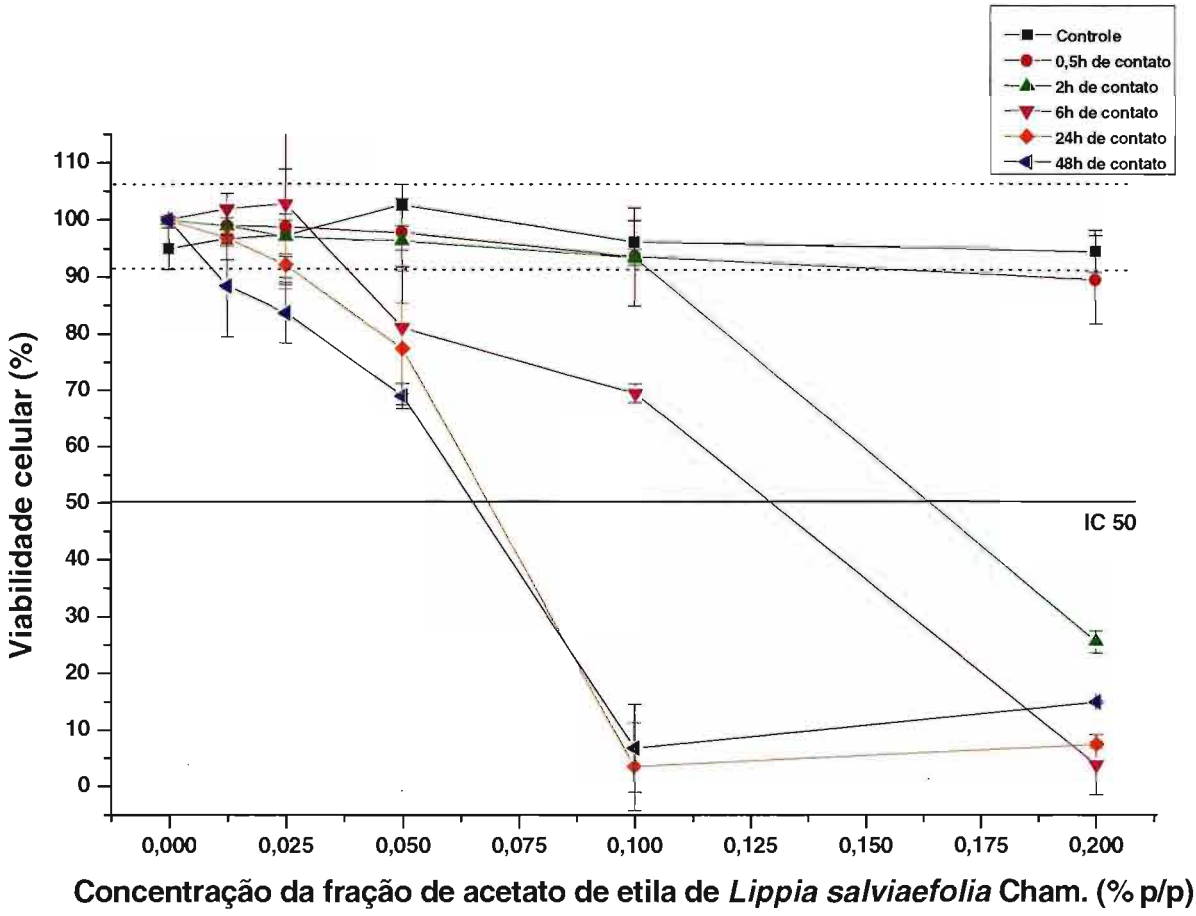


Figura 61 – Viabilidade celular através do estudo de citoxicidade em cultura de queratinócitos humanos da fr. ac. etila de *L. salviaefolia*, em diferentes concentrações (0,0125 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, e 0,2 %) e diferentes tempos de contato (0,5 h, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h e 48 h).

Considerando os resultados e os comentários apresentados no decorrer do trabalho, ressalta-se que:

Por meio da descrição anatômica, pode-se caracterizar a *L. salviaefolia* confirmando que a mesma é pertencente ao grande grupo das dicotiledôneas e a

família das Verbenáceas, devido às características anatômicas freqüentes desta família.

Ao realizar o teste de atividade antimicrobiana verificou-se que a fração de acetato de etila e a fração clorofórmica foram as frações mais ativas da *L. salviaefolia,* apresentando CMI de 0,2% para bactérias e fungos. Portanto, revelando a *L. salviaefolia* como um potente agente antimicrobiano.

Dentre as frações de acetato de etila e clorofórmica, a fração de acetato de etila foi escolhida para continuidade dos testes de eficácia de conservante e toxicicidade, devido a facilidade de purificação e melhor rendimento em relação à fração clorofórmica.

De acordo com o teste de estabilidade, as formulações mais estáveis foram o creme A e o gel B. Além dessas, escolheu-se o Xampu B, apesar de não apresentar as melhores condições, para os testes de eficácia de conservante natural. Uma vez que o Xampu A não mostrou estabilidade suficiente ao se acrescentar o extrato de *L. salviaefolia*.

No teste de eficácia de conservante foi verificado que a *Lippia salvaefolia* tem atividade antimicrobiana adequada para bactérias Gram -; Gram + e levedura e uma fraca atividade para bolor.

No teste de citoxicidade, verificou-se que a fr. ac. etila de *L. salviaefolia*, apresenta segurança em concentrações a partir de 0,05% em 48 e 24 horas de contato, em que a viabilidade celular está entre 70 e 80 %, acima do IC 50. Já em 6 horas de contato atinge-se a viabilidade celular de 70% na concentração de 0,1 %. Em 6 horas e 2 horas de contato apenas a concentração de 0,2 % está abaixo da faixa de segurança. Já em meia hora de contato todas as concentrações testadas

estão dentro da faixa de segurança, semelhante ao perfil do controle. Salientando que, o teste *in vitro* é um teste bastante sensível, pois o extrato tem contato direto com a célula, uma vez que no tecido *in vivo* tem a camada córnea que funciona como uma barreira de proteção.

6. CONCLUSÕES

A *Lippia salviaefolia* Cham mostrou-se potente agente antimicrobiano natural contra bactérias Gram -; Gram + e fungos.

A fração de acetato de etila a 0,2 % quando utilizada como conservante em formulações cosméticas apresentou conformidade no teste de eficácia de conservantes, de acordo com os critérios estabelecidos pela CTFA para bactéria e leveduras.

De acordo com o teste de citotoxicidade em queratinócitos a fração de acetato de etila pode ser utilizada como conservante em formulações de enxágüe.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J., SANCHEZ, S., BERMEJO, P., VILLAR, A., CARRASCO, L.,. Antiviral activity of some medicinal plants. **Met. Find.**, 17 (Suppl. A) p.108, 1995.

Ali, N. A. A., JÜLICH, W. D., KUSNICK, C., LINDEQUIST, U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **J. of Ethnopharmacol.**. 74, 173-179, 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos/Agência Nacional de vigilância Sanitária - 1ª ed. – Brasília ANVISA, 2004. 52 p. (Série validade em cosméticos); v.1.

AUGUSTIN, C., COLLOMBEL, C., DAMOUR, O.. Measurements of the protection of topically applied sunscreens using *in vitro* three-dimensional dermal and skin equivalents. **J. Photochem. Photobiol.** v. 66. p. 853-859, 1997.

BAHAL, SM & ROMANSKY, JM Sorption of parabens by fexible tubings. **Pharm Dev Technol.**, Aug; 6(3) : 431-40, 2001.

BAIRD, R.M., HODGES, N.A., Denyer, S.P. (Eds) (2000) Handbook of Microbiological Quality Control: Pharmaceuticals and Medical Devices Taylor & Francis, London,2000, p.254

BARRY, A.L.; 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, p. 1117-1125.

BLAUG, S. M.; HAJRATWALA, B. Kinetics of aerobics oxidation of ascorbic acid in the presence of nonionic surfactants. **J. Pharm. Sc.**, v. 63, n. 8, p. 1240-43, 1974.

BLOOMFIELD, S.F. Control in microbial contamination in non-sterile Pharmaceuticals, cosmetics and toiletries. In: BLOOMFIELD, S.F., BAIRD, R., LEAK, R.E. and LEECH, R. **Microbial quality assurance in pharmaceuticals, cosmetics and toiletries**. Ellis Horwood: Chichester, 1988, p.9-14.

BONOMI, E., NEGRETTI,F. Ricerche sul contenudo microbico di materie prime impiegatte nelle preparazioni farmaceutche. **Ann. Ist. Super. Sanitá**, v. 13, n.4, p. 805-832, 1977

BRASIL. Consulta Pública n.43, de 7 de julho de 2004. Determina a publicação do *Guia para a realização de estudos de estabilidade* (anexo). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 set. 2004.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2005.

CADWALLADER D. E., Stability Testing – Its Role in Pre-Formulation and Formulation of Cosmetics Products; **Cosm. Toilet.**., Oak Park. v. 104, n.11, p. 87-102, 1989.

CARRERA, A.C., PLANA, M.V. *Pseudomonas aerugionosa*: estudio y detección en las aguas de las industrias farmacéutica y cosmética. **Circ. Farm.**, v.298, p.71-78, 1988

CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO,J.S. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de Psidium guajava L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farm, Bon.**, v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnoparmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 135-143, 2004.

COLLINS, C.H. Antimicrobial susceptibility tests. In: _____. Microbiological methods. 7.ed. Oxford : Butterworth-Hunemann, 1995, p. 178-205.

CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. A. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Antibacterial activity of a Biphenyl and Xanthones from Kilmeyera coriacea. **Pharm. Biol.**, v. 40, n. 10, p. 485-489, 2002.

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; ASSUNÇÃO, J.C.C.; BRAZ-FILHO, R.; 2002. Constituintes químicos da *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Rev. Bras.de Farmacog.**, v. 12, supl., p. 66-67.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microb. Rev.**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CROSHAW, B. Preservatives for cosmetics and toiletries. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, , v.28, p.3-16, 1977.

CTFA Compendium of Cosmetic Ingredient. Methods. Washington: The Cosmetics, Toiletry and Fragrance Association, 2001.

CURRY, J. Water activity and preservation. **Cosmet. Toilet.**, , v.100, n.2, p.53-55, 1985.

CUTCHEON, A.R., STOKES, R. W., THORSON, L.M., ELLIS, S. M. HANCOCK, R. E. W.,. Anti-mycobacterial screening of British Columbian medicinal plants. **Intern. J. of Pharmacognosy**. 32, 77-83. 1997

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 105-108, 2004.

CHARLET E. Cosmética para farmacéuticos. Zaragoza: Acribia, 1996. 192 p.

CHATTOPADHYAY, D.; MAITI, K.; KUNDU, A.P.; CHAKRABORTY, M.S.; BHADRA, R.; MANDAL, S.C.; MANDAL, A.B. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 49-55, 2001.

CHATTOTADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A.B.; SUR, T.K.; MANDAL, S.C.; BHATTACHARYA, S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 229-237, 2002.

D'LEON, L.F.P. 2001. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosmet. &Toilet., Ed. Port.**, São Paulo, v.13, n.4, p.54-64.

DE SMET, P.A.G.M., 1997. The role of plant – derived drugs and herbal medicines. **Healthcare Drugs,** v. 54, n. 6, p. 801-840.

DIEHL, K.H. Important secondary conditions for optimal use of cosmetic preservatives. **Parfum. Kosmet.,** Heidelberg, v.71, n.60, p.396-400, 1990.

DONALD E., CADWALLADER,– Stability Testing – Its Role in Pre-Formulation and Formulation of Cosmetics Products; **Cosmet. & Toilet**., v. 104, n.11, p. 87-102, 1989.

DONY, J. Problèmes microbiologiques posès par les cosmètiques. **J. Pharm. Belg.**, Brussels, v.30, n.4, p.223-238,1975.

DRAELOS, Z. Cosméticos em dermatologia. Porto Alegre: Revinter,1999, 329p.

ELOFF J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713,1998.

EUROPEAN pharmacopoea 3 ed. supplement Paris:Maisonneuve, 1999, p.31-3; 201-202.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil 2° ed., São Paulo, Indústria Gráfica Siquiera, 197-46, p. 419-451 e 809-830.

FENNEL, C.W., LINDSEY, K. L., MC. GAW, L. J., SPARG, S.G., STAFFORD, G.I., ELGORASHI, E. E., GRACE, O. M., VAN STADEN, J., Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and satefy: Pharmacological screening and toxicology. **J. of Ethnopharmacol.**. 94, 205-217, 2004

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; LÓPEZ S.N.; ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine o San Juan province, Argentine. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 103-107, 2001.

FRANSSON, J., HAMMAR, H. Epidermal growth in the skin equivalent. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 284, p. 343-348, 1992.

FRESHNEY, R.I. **Culture of ephitelial cells:** a manual of basic technique. 4 ed. New York: Wiley, 2000, 577p.

GASQUET, M., DELMAS, F., TIMÓN-DAVID, P., KEITA, A., GUINDO, M. KOITA, N., DIALLO, D., DOUMBO, O.,. Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, ' Malarial-5". **Fitoterapia.** 64, 423-427, 1993.

GREEN, H., KEHINDE, O., THOMAS, J.. Growth of cultured human epidermis cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proc. Acad. Sci. USA**, v.76, p. 5665-566, 1979.

HAMILL, F.A.; APIO, S. MUBIRU, N.K.; MOSANGO, M.; BUKENYA-ZIRABA, R.; MAGANYI, O.W.; SOEJARTO, D.D. Tradicional herbal drugs of southern Uganda Part III: Isolation and methods for physical characterization of bioactive alkanols from *Rubus apetalus.* **J. of Ethnopharmacol.**, v. 87, p. 15-19, 2003.

HERNÁNDEZ-PEREZ, M., RABANAL, R.M., ARIAS, A., DE LA TORRE, M.C., RODRIGUES, B. Aethiopinone, an antibacterial and citotoxic agent from *Salvia aethiopis* roots. **Pharm. Biol.**. 37 (1), 17-21, 1999.

HERRERA, R. M., PÉREZ, M., MARTIN-HERRERA, D. A., LÓPEZ-GARCIA, R., RABANAL, R. M. Antimicrobial activity of extracts from plants endemic to the Canry Islands. **Phytother. Res.**. 10, 364-366, 1996.

HERSON, M.R. Estudo da composição *in vitro* de substituto cutâneo dermo-epidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena. São Paulo, 1999. 141p. **Tese de Doutorado** – Faculdade de Medicina – USP.

HO, K. Y., TSAI, C. C., HUANG, H. S., CHEN, C. P., LIN, T. C., LIN, C. CAntimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis – idaea,* L. **J. of Pharm. and Pharmacol.** 53, 187-191, 2001.

IFSCC MONOGRAF No. 2. The fundamentals of Stability Testing. Weymouth: International Federation of the Societies of Cosmetics 1992, 23p.

IROBI, O.N.; ADEDAYO, O.. Antifungal activity of aqueous extract of dormant fruits of Hyphaene thebaica (Palmae). **Pharm.I Biol.** v. 37, n. 2, p. 114-117, 1999.

JAPANESE PHARMACOPOEIA. 14. ed. Tokyo, The Society of Japanese Pharmacopoeia, 2001.

JEEVAN RAM, A.; BHAKSHU, L.Md.; VENKATA RAJU R.R. *In vitro* antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 353-357, 2004..

JETTY, A., IYENGAR, D. S. Antimicrobial activity of *Millingtonia hortensis* leaf extract. **Pharm. Biol.**, v. 38, n. 2, p. 157-160, 2000..

KA CONNORS, GL AMIDON, L. KENNON. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A handbook for pharmacists, New York: John Wiley & Sons, 1979, p. 22-31.

KARAMAN, İ.; ŞAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aquous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KELMANSON, J. E., JÄGER, A. K., VAN STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **J. of Ethnopharmacol.** 69, 241-246, 2000.

KHAN, Z.K.; KATIYAR, R. Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. **Pharm. Biol.**, v. 38, n. 2, p. 87-100, 2000.

KRIWET, K; PARENTEAU, N.V. *In vitro* skin models: tools for testing topical formulations.. **Cosmet. Toilet.,** , v.111, p.93-102, 1996.

LIMA, IO; OLIVEIRA, RAG; LIMA, EO; FARIAS, NMP; SOUZA, EL.. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Cândida. **Rev Bras Farmacognosia** 16(2): 197-201, 2006.

LOPES, DCDXP; FREITAS, ZMF; SANTOS, EP; TOMASSINI, TCB. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de Physalis angulata L. **Rev Bras Farmacognosia** 16(2): 206-210,2006.

LOPES, P.S. Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de Absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos. São Paulo, 2003. 215p. **Tese de Doutorado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

MADDEN, I., JACKSON, G.I.. Cosmetic preservation and microbes: viewpoint of the Food and Drug Administration. **Cosmet. &Toilet.**, Oak Park, v. 96, n. 10, p. 75-78, 1981.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, NJ : Prentice Hall, 2000. 9th ed. p. 750-751.

MAIA, A.M. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico.* São Paulo, 117p. 2002. [**Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo]

MAJMUDAR, G.; SMITH, M. *In vitro* screening techniques in dermatology. **Cosmet. Toilet.**, Carol Stream, v.113, p.69-76, 1998.

MALCOLM, S.A.. Microbiological monitoring and quality control. **Manuf. Chem. Aerosol News,** London, v.51, nov., p.55-56, 1980.

MARTINI, N. D., KATERERE, D. R. P., ELLOF J. N., Biological activity of five antimicrobial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. of Ethnopharmacol.**. 93, 207-212, 2004.

MATHOR, M.B. Estudos da expressão gênica mediante utilização de células transfectadas com o gene do hormônio de crescimento humano. "Possível utilização em terapia gênica". São Paulo, 1994. 154p. **Tese de Doutorado** – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP.

McCARTHY, T. J. Microbiological control of cosmetic products. **Cosmet. & Toilet.,** Oak Park, v.95, n.8, p. 23-27, 1980.

MEHMOOD, Z.; AHMAD, I.; MOHAMMAD, F.; AHMAD, S. Indian medicinal plants: A potencial source for anticandidal drugs. **Pharm. Biol.**, v. 37, n. 3, p. 237-242, 1999.

MENG, J. C., ZHU, Q. X., THAN, R. X. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from Soroseris hookeriana subsp. *Erysimoides*., **Planta Medica**. 66, 541-544, 2000.

MITAINE A. C. Indole Alkaloids from the trunk Bark of aspidosperma megalocarpon, **Planta Medica**. 64: 487, 1998.

MITAINE, A. C., et al. Alkaloids from Aspidosperma species. **Planta Medica**. 62: 458-461,1996.

MITSCHER, L.A., DRAKE S., GALLAPUDI, S. R., OIUNTE, K. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **J. of Natural Product**. 50, 1025-1040, 1987.

MONTEIRO- RIVIÈRE, N.A., INMAN, A.O., SNIDER, T.H., BLANK J.A., HOBSON, D.W. Comparison of an in vitro skin model to normal human skin for dermatological research. **Microsc. Res. Teach.** V.37, p.172-179, 1997.

MOODY, J.O.; ADEBIYI, O.A.; ADENIYI, B.A. *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu) **J. of Ethnopharmacol.**, v. 92, p. 57-60, 2004.

MORETTO, L.D. A estabilidade de fármacos e medicamentos. Pharmaceutical Tech., São Paulo, v. 3, n. 4, p. 46-48, 1999.

MORTON In: **Atlas of Medicinal Plants of Middle America** I, Springfield, Illinois, USA (1981), pp. 745-750.

OKEKE, M.I.; IROEGBU, C.U.; EZE, E.N.; OKOLI, A.S.; ESIMONE, C.O. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 119-127, 2001.

OKOLI, A.S.; IROEGBU, C.U.. Evaluation of extracts of *Anthocleista djalonensis*, *Nauclea latifolia* and *Uvaria afzalli* for activity against bacterial isolates form cases of non-gonococcal urethritis. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 92, p. 135-144, 2004.

O'NEILL, J.J., MEAD, C.A. The parabens: bacterial adaptation and preservative capacity. **J.Soc. Cosmet.Chem**. New York, v.33, p.75- 84, 1982.

Orth, D.S.. Preservative Efficacy Testing of Aqueous Cosmetics and Drugs Without Counting Colonies. **Cosmet. &Toilet**. 116:41-47, 2001.

PARKER, M. Microbial ecotics. **Soap Perfum. Cosmet**., v.55, p.90-93, 1982.

PASCUAL, M.E., SLOWING, K., CARRETEO, E., SÁNCHEZ MATA, D., VILLAR, A. *Lippia:* Tradictional uses, chemistry and Pharmacology: a review. **J. of Ethnopharmacol.** 76, Issue 3, 201-214, 2001.

PENNA, C., MARINO, S., VIVOT, E., CRUAÑES, M. C., MUÑOZ, J. DE D., CRUAÑES, J., FERRARO, G., GUTKIND, G., MARTINO, V., Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J. of Ethnopharmacol.** 77, 37- 40, 2001.

PHARMACOPÉE francaise 8 ^{eme} ed. Paris, Ordre Nacional des pharmaciens, 1965, p.453-475 e 1170-1189.

PINTO, J.A.P.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Dosagem microbiológica de antibióticos e fatores de crescimento. In: _____. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2003. p. 261-287.

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

PRISTA, L. N., BAHIA, M. F. G., VILLAR, E. Dermofarmácia e Cosmética. Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1992. v. 1, 300p.

PRISTA, L. N., BAHIA, M. F. G., VILLAR, E. Dermofarmácia e Cosmética. Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1992, v. 2, 284p.

PRUNIÉRAS, M. Manual de Cosmetologia Dermatológica. São Paulo: Organização Andrei, 2.ed., 1994, 397p.

RABANAL, R. M., ARIAS, A., PRADO, B., HERNÁNDEZ-PEREZ, M., SANCHEZ-MATEO, C. C., Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **J. of Ethnopharmacol.** 81, 287-292, 2002.

RAJANI, M.; SAXENA, N.; RAVISHANKARA, M.N.; DESAI, N.; PADH, H.. Evaluation of the antimicrobial activity of ammoniacum gum from *Dorema ammoniacum*. **Pharm. Biol.,**, v. 40, n. 7, p. 534-541, 2002

RAMSAMOOJ, R., STRNDE, L., KAIN, M.H., DOOLIN, E.J., HEWITT, C.W. A novel in vitro model for xenorejtion and immune mechanisms using bioengineered living skin equivalents. **Transplant. Proc.** V.30. p. 1087-1088, 1998.

RÉGNEIR, M., CARON, D., REICHERT, U., SCHAEFER, H. Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro the barrier function of the skin. **Skin Pharmacol.** V.5, p.49-56, 1992.

RÉGNIER, M., ASSELINEAU, D., LENOIR, M.C. Human epidermis reconstructed on dermal substrates in vitro : an alternative to animal in skin pharmacology. **Skin Pharmacol.** V. 3. p. 70-85, 1990.

RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of culture epidermal keratinocytes. **Nature**, London, v.265, p.421-427, 1977.

RHEINWALD, J.G.; GREEN, H.. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. **Cell**, Cambridge, v.6, p.317-330, 1975a.

RHEINWALD, J.G.; GREEN, H.. Serial cultivation of strains of human keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, Cambridge, v.6, p.334-344, 1975b.

RIBEIRO, A. M., KHURY E., GOTTARDI D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: Anais do CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA – 10ª edição., São Paulo. ABC. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 1996. p. 349-375.

RIBEIRO, A.M. Desenvolvimento de produtos cosméticos: teste de estabilidade. São Paulo: ANVISA, 2001. n.p. [Apostila].

RUBERTO, G., BARATTA, M. T., DEANS, S. G., DORMAN, H. J. D.,. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foenicullum vulgare* and *Criyhmum maritimum* essencial oils. **Planta Medica**. 66, 687-693, 2000.

SAHM, D.F.; WASHINGTON II, J.A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. 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. 110, p. 1105-1116.

SCAZZOCCHIO, F.; COMETA, M.F.; TOMASSINI, L.; PALMERY, M. Antibacterial activity of Hydrastis Canadensis extract and its major isolated alkaloids. **Planta Medica**, v. 67, p. 561-564, 2001.

SHRIMALI, M.; JAIN, D.C.; DAROKAR, M.P.; SHARMA, R.P.. Antibacterial activity of Ailanthus excelsa (Roxb). **Phyto. Res.** 15, p. 165-166, 2001.

SIMÕES, CLÁUDIA M. O., et al Farmacognosia da Planta ao Medicamento, Porto Alegre : Ed. UFRGS 1a ed.,1999, p. 248-249.

SMART, R., SPOONER, D.F.. Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.23, 1972, p.721-737.

SMITH, J.L.. Product testing for preservation efficacy. **Cosmet. & Toilet.**, v. 92, n.8, p.30, 32, 34, 1977.

SOKMEN, A., JONES, B. M., ERTURK, M.. The in Vitro antibacterial activity of Turkiv medicinal plants. **J. of Ethnopharmacol.** 67, 79-86, 1999.

SPOONER, D.F.. Hazards associated with the microbiological contamination of non-sterile pharmaceuticals, **Cosmetics and Toiletries**. In: BLOOMFIELD, S.F., BAIRD, R., LEAK, R.E., LEECH, R. Microbial quality assurance in **Pharmaceuticas, Cosmetics and Toiletries**. Chichester, Ellis Horwood, 1968, p. 15-33.

SPRINGFIELD, E.P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two Carpobrotus species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, p. 434-439, 2003.

SRINIVASAN, D., NATHAN, S., SURESH, T., PERUMALSAMY, O., Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **J. of Ethnopharmacol.** 74, 217-220, 2001.

STAIANO-COICO, L., HIGGINS, P.J., DARZYNKIEWICZ, Z., KIMMEL, M., GOTTLIEB, A.B., PAGAN-CHARRY, I., MADDEN, M.R., FINKEKLSTEIN, J.L., HEFTON, J.M. Human keratinocyte culture – identification and staging of epidermal cell subpopulations. **J. Clin. Invest.**, v.77, p.396-404, 1986.

SUFFREDINI, I. B., BACH, E. M., OHARA, M. T., SAKUDA-KANEKO, T.M., YOUNES, R. I. N., VARELLA, A. D.. Antibacterial activity of apocynacea extrats and MIC of tabernaemontana angulata stem organic extract. **Rev. Bras. Ciênc. Farm..** São Paulo: , v.38, n.1, p.89 – 94, 2002.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysacharides. In Microbial Extracellular polymeric substances, Wingender, J. et al Eds., p.73-92, Springer. Apud: The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol.,** Cambridge, v.9, n.5, p. 222-227.

TAGET, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K. GEBRE-MARIAM,T., Antimicrobial activies fo some selected tradicional Ethiopian medicinal plants used in the tratament of skin disorders. **J. of Ethnopharmacol.** 100, p. 168-175, 2005.

TENEMBAUM, S. Considerations leading to development of the microbial limit guideliness of the CTFA. **Cosmet. Toilet**., v. 93, n.3, p. 78-83, 1977.

TERBLANCHÉ, F.C. & KORNELIUS, G.,. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) A literature review. **J..Ess.Oil Re.** 8, 471-485, 1996.

THORNSBERRY, C. Antimicrobial Susceptibility testing: General Considerations. . 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. 107, p. 1059-1064.

TORTORA, G.J., FUNKE,B.R., CASE, C.L. **Microbiology: an introduction**. 7º ed. Longman: Benjamin Cummings, 2001. cap.20, p.568.

UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIX ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VAN ABBÉ, N.J. HUGHES, O., DIXON, H. WOODROFFE, R.S.C. The hygienic manufacture and preservation of toiletries and cosmetics. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, , 1970, v.21, p.719-800.

VERPOORTE, R.. Methods for the Structure Elucidation of Alkaloids. **J. of Natural Product**, v. 49 (1), p. 1 – 25, 1986.

WITTERN, P.; ANSMANN, A.; HÜTTINGER, R.; BILLEK, D.; CHARLET, E.; HOENEN, L.;KUCZERA, K.; MOTITSCHKE, L.; QUACK, J.; SEIB, K.; UMBACH, I.; WOLFF, G.. Stability testing of cosmetic emulsions. **Cosmet. & Toilet.**, v.100, n. 10, p.33-39,1985.

ZGODA, J.R., PORTER, J.R. A convenient microdilution method for sreening natural products against bacteria and fungi. **Pharm. Biol.**, v. 39, n. 3, p. 221-225, 2001.

ANEXOS OBRIGATÓRIOS

FICHA DO ALUNO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

9139 - 3202501/2 - Beatriz Resende Freitas

Email:	freitasbeatriz@uol.com.br
Data de Nascimento:	12/01/1977
Cédula de Identidade:	RG - 3254199 - GO
Local Nascimento:	Estado de Goiás
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica - Universidade de Ribeirão Preto - Associação de Ensino de Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - 1998
Mestrado:	Mestre em Fármaco e Medicamentos - Área: Produção e Controle Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2002
Curso:	Doutorado em Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data da Matrícula:	02/02/2004
Início da Contagem de Prazo:	02/02/2004
Data Limite:	02/02/2008
Orientador(es):	Prof(a). Dr(a). Telma Mary Kaneko - 02/02/2004 a -- E.Mail: tsakuda@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 04/05/2005
Exame de Qualificação:	Aprovado em 01/08/2007
Data do Depósito do Trabalho:	
Data máxima para aprovação da Banca:	
Título do Trabalho:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Ocorrência:	Última matrícula em 20/07/2007

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBF5710-6	Obtenção Racional de Insumos de Plantas Medicinais	03/03/2004	11/05/2004	90	6	93.00	A	N	Concluída
FBT5700-1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	01/09/2004	02/11/2004	90	6	90.00	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou do XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, com apresentação do trabalho, intitulado: "Atividade antimicrobiana dos extratos de ´Lippia salviaefolia´ (Verbenaceae) ", publicado em anais, v. 1, p. 83, 2004, Manaus, Amazonas, Brasil	16/11/2004	19/11/2004	-	1	0.00	-	-	-
FBF5756-2	Segurança Biológica de Produtos Farmacêuticos e Biomateriais	09/05/2005	17/07/2005	90	6	100.00	A	N	Concluída
FBF5744-6	Seminários Gerais de Fármaco e Medicamentos II	22/08/2005	04/12/2005	30	2	100.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	20	20	**Disciplinas:**	21
Atividades Programadas:	0	0	**Atividades Programadas:**	0
Seminários:	0	0	**Seminários:**	0
Estágios:	0	0	**Estágios:**	0
Total:	20	20		21

Créditos Atribuídos à Tese : 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.

Situação em: 28/01/2008 17:59

Cópia do Aval do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 003/2004

São Paulo, 20 de fevereiro de 2004.

Ilmo(a) Sr(a).
Telma Mary Kaneko

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 16 de fevereiro do corrente ano, **APROVOU** o projeto "Avaliação da atividade antimicrobiana e da citoxicidade de extratos de folhas de Rubus rosaefolius Sm. Visando sua aplicação como conservante em cosméticos " (Protocolo nº 229) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 - Fax (11) 3031-8986 - e-mail: rtrigo@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

05508-900 - Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - São Paulo - Brasil.

São Paulo, 27 de abril de 2006

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do CEP/FCF

Prezada Senhora,

Vimos, por meio desta, solicitar a possibilidade de alteração do título do projeto de pesquisa intitulado *Avaliação da atividade antimicrobiana e da citoxicidade de extratos de folhas de Rubus rosaefolius Sm. visando sua aplicação como conservante em cosméticos* (CEP /FCF/USP nº229) para *Avaliação da atividade antimicrobiana e da citoxicidade de extratos de vegetais visando a aplicação como conservante.*

Justificamos a solicitação, pois pretendemos estudar os extratos de folhas da *Lippia salviaefolia Cham.* e extratos da semente de Senna occidentalis com os mesmos métodos e grupo de pesquisadores envolvidos no referido projeto.

Informamos que estamos enviando, em anexo, o projeto com as modificações pretendidas.

Agradecemos antecipadamente e colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 101/2006

São Paulo, 03 de agosto de 2006.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
FBF

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de julho de 2006, **APROVOU** as alterações do projeto "Avaliação da atividade antimicrobiana e da citoxicidade de extratos de folhas de Rubus rosaefolius Sm. Visando sua aplicação como conservante em cosméticos " (Protocolo CEP nº 229) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br