**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Potencial do extrato pirolenhoso da madeira de eucalipto como
agente conservante de cosméticos e saneantes**

Raquel Silveira Ramos Almeida

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Programa: Recursos
Florestais. Opção em: Tecnologia de Produtos
Florestais**

**Piracicaba
2012**

Raquel Silveira Ramos Almeida
Engenheiro Química

**Potencial do extrato pirolenhoso da madeira de eucalipto como agente
conservante de cosméticos e saneantes**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ OTÁVIO BRITO**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Programa: Recursos Florestais. Opção
em: Tecnologia de Produtos Florestais**

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Almeida, Raquel Silveira Ramos

Potencial do extrato pirolenhoso da madeira de eucalipto como agente conservante de cosméticos e saneantes / Raquel Silveira Ramos Almeida.- - Piracicaba, 2012.
110 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Balanço de massa 2. Carbonização 3. Cromatografia 4. Espectrometria de massa
5. Eucalipto 6. Extrato pirolenhoso I. Título

CDD 634.9734
A447p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

HOMENAGEM SAUDOSA

Ao meu pai, Algemiro Coelho Ramos e minha irmã Ruth Ramos Razera, pessoas maravilhosas que sempre me deram apoio, incentivo e inspiração.

DEDICO

À minha mãe Jandyra Silveira Ramos que sempre está comigo em todos os momentos importantes de minha vida.

OFEREÇO

Ao meu esposo Henrique e aos meus filhos Bruno e Anita,
pela compreensão durante todo o percurso de meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. José Otavio Brito, pela orientação, pelo incentivo e principalmente, pela paciência em transmitir os conhecimentos sobre as florestas e suas árvores.

Ao Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprimoramento profissional.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais, em especial ao técnico Udemilson Luis Ceribelli dos Laboratórios Integrados de Química, Celulose e Energia-LQCE /ESALQ /USP, pela dedicação e apoio na realização dos trabalhos.

Ao pesquisador Dr. Eduardo Gloria Micotti, pela disponibilização e apoio na realização das análises, no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN)/ESALQ/USP.

À empresa São Manoel, pelo fornecimento de materias e informações relevantes aos trabalhos.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Sílvia Maria Zinsly pela orientação bibliográfica.

Ao colega Marcel Miranda Taccini, pela troca de conhecimentos, apoio e incentivo na realização dos trabalhos .

Aos colegas e estagiários do Departamento de Ciências Florestais, em especial aos companheiros do Laboratórios Integrados de Química, Celulose e Energia – LQCE, pelo apoio e incentivo e a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À minha família que me fortalece em meus desafios e conquistas em especial aos meus irmãos Ester e Caio, minha tia Maria da Glória e meus sobrinhos Renato, Paula e João Pedro.

EPÍGRAFE

"Para entrar em estado de árvore é preciso partir de
um torpor animal de lagarto às três horas da tarde,
no mês de agosto.

Em dois anos a inércia e o mato vão crescer em
nossa boca.

Sofreremos alguma decomposição lírica até o mato
sair na voz.

Hoje eu desenho o cheiro das árvores."

Manoel de Barros - O livro das ignorâncias

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 O setor florestal no Brasil e a eucaliptocultura	27
2.2 A produção de carvão vegetal e o extrato pirolenhoso	28
2.3 O extrato pirolenhoso e suas origens.....	31
2.4 Referências de aplicação do extrato pirolenhoso.....	33
2.4.1 Normas.....	33
2.4.2 Pesquisas sobre aplicação do extrato pirolenhoso	34
2.5 Os produtos “naturais/orgânicos” e a indústria cosmética e de produtos de limpeza.....	34
2.6 Conservantes	36
2.6.1 O conservante ideal.....	39
2.6.2 Regulamentações e Aprovações.....	39
2.7 Exigências e desafios dos conservantes naturais para cosméticos e saneantes	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Material.....	43
3.1.1. Extrato pirolenhoso obtido em escala industrial	43
3.1.2. Extrato pirolenhoso obtido em escala de laboratório.....	43
3.2 Método	44
3.2.1 Obtenção dos extratos pirolenhosos..	44
3.2.1.1 Extrato pirolenhoso de laboratório.....	44
3.2.1.2 Extrato pirolenhoso industrial	44
3.2.2 Balanço de massa e cálculo de rendimentos em carvão e co-produtos obtidos em escala de laboratório	47
3.2.3 Determinação do pH do extrato pirolenhoso obtido em escala industrial e de laboratório	48
3.2.4 Análise organoléptica do extrato pirolenhoso.....	48

3.2.5. Análises cromatográficas do extrato pirolenhoso obtido em escala industrial e de laboratório	49
3.2.6 Processo de destilação para determinação do teor de alcatrão	50
3.2.7 Balanço de massa e cálculo de rendimentos em alcatrão e extrato pirolenhoso destilado obtido em escala industrial e laboratorial	51
3.2.8 Avaliação do potencial antifúngico dos extratos pirolenhosos	52
3.2.9 Identificação e Análise da composição química de frações antifúngicas de extrato pirolenhoso	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Resultados do balanço de massa e cálculo de rendimentos em carvão e co-produtos obtidos em escala de laboratório (PLO).....	57
4.2 Determinação do pH do extrato pirolenhoso obtido em escala industrial e de laboratório.....	57
4.3 Análise organoléptica do extrato pirolenhoso	58
4.4 Resultados dos balanços de massa e cálculo de rendimentos em alcatrão e extrato pirolenhoso destilado obtido em escala industrial (PIO) e laboratorial (PLO).....	59
4.5 Resultados das análises cromatográficas do extrato pirolenhoso	59
4.6 Análises da avaliação do potencial antifúngico dos extratos pirolenhosos.....	64
4.7 Identificação e Análise da composição química de frações antifúngicas de extrato pirolenhoso	66
4.8 Potencial do extrato pirolenhoso para aplicação em produtos cosméticos e saneantes	68
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES	79
ANEXOS.....	97

RESUMO

Potencial do extrato pirolenhoso da madeira de eucalipto como agente conservante de cosméticos e saneantes

O extrato pirolenhoso é uma substância orgânica resultante da condensação da fumaça gerada durante a carbonização da madeira ou de outras fontes de matéria-prima vegetal, sendo constituído por, pelo menos, 80% de água e dezenas de compostos, dentre os quais se incluem substâncias fenólicas, aldeídos e ácidos orgânicos. Portanto, não seria utópico supor-se que nessa gama de compostos possam estar incluídas substâncias que apresentem propriedades conservantes para aplicações na área cosmética e de saneantes. É nessa direção que se avaliou o potencial de utilização do extrato pirolenhoso da madeira de eucalipto. Especificamente, houve a intenção de se estudar as características e propriedades do extrato pirolenhoso obtido dessa madeira levando-se em conta duas fontes distintas; avaliar em particular suas propriedades antifúngicas, e as possibilidades do uso do extrato pirolenhoso como conservante, na substituição de ingredientes como, por exemplo, o formaldeído, ainda hoje utilizado na indústria em formulações de produtos cosméticos e atualmente proibido em produtos saneantes, segundo nova resolução RDC 35/08 da ANVISA. Foi estudado o extrato pirolenhoso obtido da carbonização de cavacos da madeira, à temperatura final de 400°C, no tempo de aquecimento de 2,5h, em um forno-mufla conjugado a um sistema de coleta de gases condensáveis. Estudou-se também o extrato pirolenhoso obtido da carbonização da madeira de eucalipto, coletado entre as temperaturas de 80 e 120°C, em fornos de alvenaria, numa carvoaria localizada na região de Atibaia, São Paulo, estocado por 3 anos. Os compostos químicos presentes em ambos os extratos foram identificados mediante análises em cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massa (GC/MS). De forma geral, as análises dos extratos demonstraram a presença de uma gama de compostos oxigenados, tais como ácidos carboxílicos, ésteres, éteres e cetonas. Além disso, foram detectados fenol, guaicol e derivados fenólicos. Qualitativamente, o extrato pirolenhoso industrial, apresentou menor número de componentes químicos ligados ao alcatrão, o quê também foi comprovado quantitativamente pela análise do teor de alcatrão, mediante destilação simples. O produto que apresentou o melhor potencial antifúngico foi o extrato pirolenhoso laboratorial, coincidindo com o fato dele possuir maior número de componentes ligados ao alcatrão. Pela análise da composição química de frações antifúngicas de extrato pirolenhoso, os potenciais ativos da amostra a serem considerados foram: corilon, mequinol, 2-metoxi 4-metilfenol, 4-etil 2-metoxifenol, 2,6 – dimetoxifenol, 1,2,4-trimetoxibenzeno e 5-tert-butilpirogallol. As diferenças nas participações dos compostos fracionados mostraram-se também estatisticamente diferentes, com os maiores valores sendo apresentados pelo extrato laboratorial. Em todos os extratos estudados, verificam-se componentes que são descritos na literatura como potencialmente tóxicos e suas presenças restringem o uso dos mesmos em produtos cosméticos, no entanto, a alternativa de uso do extrato para aplicação em saneantes se mostra promissora.

Palavras-chave: Carbonização; Balanço de massa; Cromatógrafo-espectrômetro de massa; Extrato pirolenhoso; Eucalipto

ABSTRACT

Potential of pyroligneous extract of eucalyptus wood as a preservative of cosmetic and sanitizing products

The pyroligneous extract is an organic substance resulting of condensation of the smoke generated by the carbonization of the wood or other vegetal raw material. It has at least 80% of water and contains many compounds including: phenolic substances, aldehydes and organic acid. It would not be utopian, therefore, to assume that, in this gamma of compounds there could be substances having preservative properties for cosmetic and sanitizing products. This study evaluates the potential of the pyroligneous extract of eucalyptus wood. Specifically, the characteristics and properties of the pyroligneous extract from eucalyptus wood from two distinct sources; to evaluate in particular its antifungal proprieties and the possibility of using the pyroligneous extract as a preservative. This would substitute, for example, the formaldehyde currently used in the cosmetic industry in the manufacturing of shampoos and soaps. In fact formaldehyde has now been forbidden in sanitizing products; resolution RDC 35/08 of ANVISA. The experiment consisted of carbonization of wood at a final temperature of 400° C at a residence time of 2,5h in an oven-muffle joined a system to collect the condensable gases. Also, the pyroligneous extract obtained from the carbonization of the eucalyptus wood was used. This had been collected at temperatures between 80 °C and 120 °C from masonry ovens at a charcoal producer located in the Atibaia region of the State of São Paulo stored for 3 years. The chemical compounds of both extracts were identified by analyses of a gaseous chromatograph connected to the mass spectrometer (GC/MS). In general, the analysis of extracts demonstrated the presence of oxygenated components gamma such as carboxylic acids, esters, ethers and ketenes. Moreover, phenol, guaicol and phenol derivatives were detected. The industrial pyrolignous extract, in qualitative terms, presented fewer chemical components related to the tar, and also this was proven by the tar quantitative analyzes using the method of simple distillation. The product that showed better potential antifungal results was the laboratory pyrolignous extract, coinciding with the fact that it contains a higher number of components related to the tar. From the analysis of the chemical of antifungal pyrolignous extract fractions, the potential actives under consideration from the sample were: corilon, mequinol, 2-metoxi 4-metylphenol, 4-etyl 2-metoxi phenol, 2,6-dimetoxi phenol, 1,2,4-trimetoxi benzene and 5-tert-butylpirogallol. There was a significant statistically difference observed between the industrial and laboratory processes; the laboratory result showed a better participation of its fractionated compounds than those from the industrial. Toxic compounds described in the literature were shown to be presented in both of the studied extracts. These restrict use in cosmetic products, although they are still promising in sanitising products.

Keywords: Carbonization, Material balance, Chromatograph-mass spectroscopy; Pyroligneous extract; Eucalyptus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de recuperação de gases da carbonização de madeiras.....	31
Figura 2 – Processo de pirólise e coleta dos gases	45
Figura 3 – Equipamento utilizado na pirólise laboratorial.....	46
Figura 4 – Processo industrial de pirólise e coleta dos gases.....	46
Figura 5 – Processo de Destilação Simples.....	50
Figura 6 – Cromatograma produzido nas carbonizações do experimento obtido a 400° C e 2,5h na escala laboratorial.....	61
Figura 7 – Cromatograma produzido nas carbonizações do experimento obtido na escala industrial.....	61
Figura 8 – Curva de inibição do extrato pirolenhoso amostra da escala industrial (PIO) e amostra laboratorial (PLO).....	64
Figura 9 – Placa de Bioautografia observada após 7 dias a esquerda e placa com revelação com solução metanólica de ácido sulfúrico a 10%, a direita.....	66
Figura 10 – Cromatograma da amostra laboratorial utilizando-se Metanol.....	67
Figura 11 – Cromatograma da amostra laboratorial utilizando-se Acetato de Etila..	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Balanço de massa das carbonizações.....	57
Tabela 2 - Resultados obtidos de pH.....	58
Tabela 3 - Balanço de massa das destilações.....	59
Tabela 4 - Compostos químicos presentes nos extratos pirolenhosos.....	62
Tabela 5 - Compostos químicos presentes nos extratos pirolenhosos obtidos da escala laboratorial (PLO) e da escala industrial (PIO) com seus percentuais de participação.....	63
Tabela 6 - Resultados obtidos da análise de inibição.....	65
Tabela 7 - Frações bioativas presentes nos extratos pirolenhosos.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIPLA	Associação Brasileira de Produtos de Limpeza e Afins
AFSSAPS	Agência Francesa de Segurança Sanitária dos Produtos de Saúde
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
CMR1	“Categoria 1 de Substâncias Carcinogênicas, Mutagênicas, Tóxica de Reprodução (do inglês, <i>Carcinogenic, Mutagenic, Reproduction Toxic Substances Category 1</i> °).
DE	Detectável, mas com percentuais muito baixos, apenas traços
EMEA	Agência Européia para Avaliação de Produtos Medicinais
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês, <i>Environmental Protection Agency</i>)
FDA	Fundação de Alimentos e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
FISPQ	Ficha de Segurança de Produtos Químicos
GC/MS	Cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massa
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research and Cancer</i>)
MSDS	Ficha de Segurança do Material (do inglês, <i>Material Safety Datasheet</i>)
ND	Não detectado
OSHA	Segurança e Saúde Ocupacional (do inglês, <i>Occupational Safety and Health</i>)
PA	Peso do alcatrão (g)
PCS	Peso do carvão seco (g)
PGC	Peso do gás condensado (g)
PIB	Produto interno bruto
PIO	Extrato (licor) pirolenho obtido em escala industrial
PLO	Extrato (licor) pirolenho obtido em escala laboratorial
PLP	Peso do extrato (licor) pirolenhoso (g)
PMS	Peso da madeira seca (g)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RGA	Rendimento gravimétrico em alcatrão (%)
RGC	Rendimento gravimétrico em carvão (%)
RGGC	Rendimento gravimétrico em gases condensáveis (%)
RGLD	Rendimento gravimétrico em extrato (licor) pirolenhoso destilado (%)
RGNC	Rendimento gravimétrico em gases não-condensáveis (%)
RLP	Rendimento gravimétrico em extrato (licor) pirolenhoso (%)
SBS	Sociedade Brasileira de Silvicultura
SCCP	Comitê Científico da União Européia para Produtos de Consumo

1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos naturais tem crescido muito nos últimos anos, principalmente devido aos conceitos que a eles são atrelados, em relação à saúde do consumidor e à preservação do meio ambiente. Além disso, existe um movimento mundial crescente, no sentido de se incluir os atributos de produto natural e/ou orgânico a uma gama cada vez maior de cosméticos por meio de ingredientes, dentre os quais se encontram aqueles que possuam ação anti-microbiana, os chamados conservantes (COSMETICS & TOILETRIES, 2007).

No setor de saneantes, as tendências mundiais mais marcantes são o desenvolvimento e o lançamento de produtos de limpeza com matéria-primas e ingredientes mais “amigáveis” ao meio ambiente. A indústria tem se dedicado nos últimos anos ao desenvolvimento de novas tecnologias para a substituição de ingredientes considerados nocivos, por exemplo, formol, por outros conservantes (QUÍMICA E DERIVADOS, 2011).

Conservantes são substâncias adicionadas aos produtos de higiene pessoal, cosméticos, perfumes e saneantes com a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações causados por microorganismos, durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante a utilização do produto (COSMÉTICOS E PERFUMES, 2010; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2008a).

Existe uma lista de substâncias de ação conservante permitidas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde) para produtos de higiene pessoal, ou seja, cosmética. Um exemplo é o ácido benzóico, tricloro-3,4,4-hidróxi-2-difeniléter, mais conhecido pelo nome comercial Triclosan e o 3-hidroxi-4-isopropil tolueno, ambos com definições sobre a máxima concentração permitida, suas condições e advertências de uso. O formaldeído ainda é considerado a substância mais utilizada e popular no meio cosmético. A solução de formaldeído, o formol, é a matéria-prima com utilização permitida em cosméticos nas funções de conservante, com limite máximo de 0,2% no total do produto. É também utilizado como agente endurecedor de unhas (limite máximo de uso permitido de 5%). Entretanto, o formol, em aplicações diferentes das citadas e em limites acima dos permitidos, seria nocivo à saúde. Seu contato com a pele pode causar irritação,

vermelhidão, dor e queimaduras. Por inalação, seus danos podem resultar em câncer, irritação e sensibilização do trato respiratório. Pode ainda causar graves ferimentos nas vias respiratórias, levando ao edema pulmonar e pneumonia. O formol é fatal em altas concentrações (ANVISA, 2008c).

No caso de saneantes, uma nova resolução do governo brasileiro, a RDC35/08, proíbe o uso de formaldeído e considera a necessidade de bani-lo das formulações de tais produtos, devido à sua reconhecida carcinogenicidade e atual classificação toxicológica pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*). Ainda há o artigo 5º da Resolução RDC nº. 184 de 22 de outubro de 2001 que proíbe o uso de substâncias carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas nas formulações de produtos saneantes (ANVISA, 2008b).

Os produtos orgânicos (por exemplo, os cosméticos orgânicos) são uma opção interessante para quem busca atender as aspirações de saúde, ecologia e responsabilidade social, indo contra todo possível efeito nocivo de substâncias como o formaldeído. Mas para aproveitar esta nova tendência, é necessária atenção a alguns detalhes importantes como o de enfrentar o desafio de selecionar um conservante adequado para a formulação e uma embalagem que irão compor o produto (COSMETIC & TOILETRIES, 2007). O pesquisador deve esquecer os sistemas conservantes tradicionais e prestar atenção a ingredientes que tenham potencial ação anti-microbiana como poderia ser o caso do extrato pirolenhoso.

O extrato pirolenhoso é uma substância orgânica resultante da condensação da fumaça gerada durante a carbonização da madeira ou de outras fontes de matéria-prima vegetal, sendo constituído pelo menos de 80% de água e dezenas de compostos, dentre os quais se incluem-se substâncias fenólicas, aldeídos e ácidos orgânicos Quadros (2005) e Loo (2007). Não seria utópico, portanto, supor-se que nessa gama de compostos, possam existir substâncias que apresentem propriedades conservantes para aplicações na área cosmética e de saneantes.

Ao se propor a utilização do extrato pirolenhoso, em geral considerado no Brasil como subproduto do processo de carbonização da madeira, estaria sendo oferecida a oportunidade para se agregar mais valor à matéria-prima da qual o mesmo é produzido. Como consequência, a floresta estaria sendo mais valorizada, não apenas para obtenção de carvão, mas também graças ao valor econômico dado aos gases emitidos no processo de carbonização. Além disso, haveria uma importante redução de emissões gasosas impactantes ao ambiente. Nesse sentido,

já existem experiências importantes quanto a aplicação do extrato pirolenhoso como agente quelante e complexante orgânico de fertilizantes orgânicos e organominerais (LIMA, 2008). A abertura de um potencial de aplicação para o produto como agente conservante natural para indústria cosmética e de saneantes abriria um leque adicional para sua valorização ainda maior como matéria-prima.

No entanto, deve-se ressaltar que, diante da grande quantidade de compostos presentes no extrato pirolenhoso, qualquer estudo que vise determinar o seu potencial de utilização, sobretudo em novas áreas como as mencionadas, deve levar em conta a necessidade de se ter uma série de informações, que incluem o conhecimento preciso da sua composição e características físico-químicas. No campo da aplicação da indústria cosmética, faz-se também necessário avaliar suas propriedades anti-microbianas e a detecção da presença de possíveis ingredientes tóxicos ao ser humano. Pelo exposto, justifica-se a realização do presente trabalho.

O estudo teve por **objetivo geral** avaliar o potencial de utilização do extrato pirolenhoso da madeira de eucalipto como agente conservante de produtos cosméticos e saneantes.

Como **objetivos específicos** pretendeu-se:

- Estudar as características e propriedades do extrato pirolenhoso levando-se em conta as duas fontes distintas de obtenção: processo em escala laboratorial e processo em escala industrial;
- Avaliar aspectos microbiológicos do extrato pirolenhoso obtido;
- Avaliar as possibilidades do uso do extrato pirolenhoso como conservante em produtos cosméticos e saneantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O setor florestal no Brasil e a eucaliptocultura

Com base no ano de 2007, a indústria florestal brasileira representou 3,4% do produto interno bruto (PIB) nacional, ou seja, um equivalente a US\$ 44,6 bilhões. As exportações foram de US\$ 9,1 bilhões, equivalentes a 5,6% das exportações totais brasileiras (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA - SBS, 2008).

No Brasil, a área ocupada por florestas naturais é cerca de 510 milhões de ha enquanto as florestas plantadas ocupam 6,8 milhões de ha, dos quais 4,52 milhões de ha (66%) com eucalipto; 1,79 milhão de ha (27%) com pinus; 0,47 milhão de ha (7%) com outras espécies (acácia negra, seringueira, paricá, teca, araucária e outras) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTA PLANTADA - ABRAF, 2010). Os principais produtos são a madeira em toras e seus derivados: (madeira serrada, papel e celulose, carvão vegetal, lenha, aglomerados e compensados, entre outros) (SBS, 2008).

Dentre os produtos florestais não madeireiros, destacam-se os taninos (10 mil t/ano de 190 mil ha de acácia), a borracha natural (110 mil t/ano de 81 mil ha de seringueira, suprimindo 35% do consumo nacional), goma resina, breu e terebintina de pinus (106 mil t de goma resina/ano), óleos essenciais de eucalipto (1,0 mil t/ano de 10 mil ha de eucalipto) (SBS, 2008).

A instituição do Código Florestal em 1965 e os incentivos fiscais concedidos pelo Governo Federal a partir de 1966 (extintos em 1987) propiciaram o incremento das atividades de reflorestamento com espécies de rápido crescimento por parte das empresas do setor de papel e celulose, bem como do setor de carvão vegetal (SBS, 2008). As plantações florestais trouxeram alívio da pressão sobre as florestas naturais e também a criação e desenvolvimento dos departamentos de silvicultura dessas empresas, no ímpeto de aumentar o rendimento da matéria prima em suas plantas industriais.

A expansão da eucaliptocultura é consequência direta da expansão dos mercados interno e externo de celulose a partir da década de 1970 e da crescente valorização da biomassa como insumo energético viável a partir das crises do petróleo (1973 e 1979) e da incorporação definitiva da temática ambiental nas

discussões sobre desenvolvimento sustentável a partir da década de 1990 (COUTO et al., 2008).

O eucalipto é uma espécie arbórea que se destaca devido à extensão de sua área plantada nas regiões de clima tropical, tendo como maiores referências Brasil, Índia, África do Sul, Portugal, Angola, Espanha e China. O Brasil tornou-se o maior produtor mundial de eucalipto principalmente devido ao seu potencial edafo-climático. Os principais produtores brasileiros são os estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia (ALVES, 2005). Levando-se em consideração o ano base de 2009, o Brasil possui uma região reflorestada com eucalipto de mais de 4,5 milhões de ha (ABRAF, 2010).

O gênero *Eucalyptus* ou eucalipto pertence à família Myrtaceae e possui como centro de origem a Austrália e regiões próximas ao Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Java e sul das Filipinas, ou seja, uma faixa compreendida entre latitudes 9° N e 44° S. Este gênero compreende mais de 700 espécies, várias das quais são de grande importância econômica (ELDRIDGE, 1993; UDOVICICI et al., 1995 apud ALVES 2005).

O híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, popularizado como *Eucalyptus urograndis*, foi obtido via programas de melhoramento genético, para permitir melhor qualidade das florestas plantadas e, conseqüentemente, maior produtividade de matéria-prima para a obtenção de celulose. A produtividade inicial da década de 1960, estimada em torno de 20m³/ha/ano, foi elevada para atuais 45-60 m³/ha/ano. Embora a maior parte das plantações de eucalipto no Brasil tenha por finalidade a produção de papel e celulose (52 milhões de m³, em 2009) e carvão vegetal/lenha industrial (51 milhões de m³ em 2009), tem aumentado a utilização da madeira para construção civil e das folhas para extração de essências (ABRAF, 2010; SILVA; BRITO; SILVA, 2006; ROSSI, 2009; BRAGA, 2008).

2.2 A produção de carvão vegetal e o extrato pirolenhoso

A produção de carvão vegetal, no Brasil, é destinada ao atendimento da demanda de diversos segmentos da indústria (siderurgia, metalurgia, cimento, etc), bem como para utilização residencial urbana e rural. O setor siderúrgico é o que mais se destaca (BRITO, 1990).

A produção é realizada por meio do processo denominado carbonização ou pirólise, que consiste na decomposição da biomassa pelo calor, sob controle da presença de ar. É um processo constituído por uma série de reações complexas, onde o calor fraciona a estrutura molecular da biomassa, liberando compostos de carbono na forma sólida, líquida e gasosa, que poderão ser utilizados como combustíveis ou insumos químicos (DINIZ, 2005).

A quase totalidade das 10 milhões de toneladas anuais de carvão vegetal produzidas no Brasil (o maior produtor mundial, respondendo por cerca de 30% do total) é obtida pela carbonização conduzida de forma artesanal, em fornos construídos em alvenaria (BRITO, 1990). Em diversos outros países, empregam-se as chamadas retortas, equipamentos geralmente construídos em metal, onde a carbonização é conduzida sob regime totalmente industrial, com elevado nível de controle de processo (QUADROS, 2005).

A tecnologia utilizada no Brasil descarta, na maioria das vezes através da emissão de gases à atmosfera, muitos componentes químicos. Dessa forma, o resultado global das emissões de gases é importante tanto com relação a aspectos ambientais quanto de perda de possíveis produtos químicos que poderiam agregar valor à produção de carvão vegetal (BRITO, 1990).

Segundo Pimenta et al. (2000), os poluentes provenientes do processo de carbonização podem ser classificados em três grupos principais: materiais particulados, gases não condensáveis e os compostos orgânicos condensáveis. O material particulado compõe-se de cinzas, partículas de carvão e fuligem, que são arrastadas do leito de carbonização dentro de micro gotículas de alcatrão. Os gases não condensáveis, por sua vez, se compõem essencialmente de CO_2 , CO, H_2 e CH_4 , enquanto que os compostos orgânicos condensáveis são um grupo formado por compostos orgânicos agrupados em classes químicas variadas (BARCELLOS, 2002). A fumaça de carbonização apresenta em sua composição subprodutos tóxicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que apresentam atividade mutagênica e cancerígena (PIMENTA et al., 2000; CRISTALE et al., 2008).

Uma vez condensados mediante resfriamento, os compostos orgânicos dão origem a duas frações: aquosa (extrato pirolenhoso) e oleosa (alcatrão). (QUADROS; 2005; CAMPOS, 2007).

O extrato pirolenhoso é a fração aquosa do líquido condensado, de cor marrom, contendo pelo menos 80% de água. O restante da sua composição

apresenta uma gama de dezenas de componentes químicos, com destaque para o ácido acético, o álcool metílico e a acetona (QUADROS, 2005; LOO et al., 2007).

O alcatrão, que é a fração oleosa ou pesada do condensado, apresentando coloração negra, é composto por dezenas de produtos químicos, mostrando-se mais denso e viscoso que o extrato pirolenhoso, do qual se separa, em sua maior parte, por simples decantação. A separação mais completa é obtida mediante a destilação do líquido condensado. O alcatrão decantado apresenta composição rica em compostos fenólicos. As principais referências de uso para o alcatrão são: como combustível; como matéria-prima para obtenção de fenóis com finalidades químicas e farmacêuticas; como preservativo de madeira; na produção de solventes, tintas e vernizes.(FOELKEL, 2012). Se no exterior a maior ênfase é para usos químicos, no Brasil, a sua recuperação tem sido conduzida desde a década de 80 para utilização como combustível em fornalhas.

Apesar do extrato pirolenhoso conter muitos compostos químicos, as concentrações dessas substâncias são relativamente muito baixas, comparadas à quantidade de água no extrato, conforme observado por Quadros (2005) e Loo et al. (2007). A grande maioria dos mesmos constitui-se de ácidos, especialmente o ácido acético. Fengel e Wegener (1984) relataram que a degradação térmica da hemicelulose gera ácido acético, metanol, furfural, aldeídos e cetonas. Geralmente os ácidos são formados da destruição da celulose, hemicelulose e lignina. Com relação aos componentes fenólicos e seus derivados, provavelmente eles são oriundos da pirólise da lignina. Segundo Ratanapisit et al. (2009), geralmente a quantidade de compostos fenólicos aumenta com o aumento da temperatura de pirólise.

A figura 1 mostra uma ilustração sobre os produtos que podem ser obtidos da carbonização da madeira, incluindo-se o extrato pirolenhoso.

Figura 1 – Esquema de recuperação de gases da carbonização de madeiras. Os valores (em kg) correspondem aos rendimentos médios de produtos obtidos da carbonização da madeira de eucalipto (valores laboratoriais para madeira seca) (BRITO, 2000)

2.3 O extrato pirolenhoso e suas origens

A fabricação e utilização do extrato pirolenhoso é muito antiga. Na China, existem relatos de sua utilização há milênios atrás e na Índia foi muito utilizado para tratamento de doenças. Na Europa, século 17, já havia destilação seca de madeira para produção de alcatrão, com relato de aproveitamento do líquido pirolenhoso. O início da produção do extrato pirolenhoso em maior quantidade ocorreu a partir de 1813 na Inglaterra, para ser utilizado na coloração do linho (CAMPOS, 2007).

Uma monografia produzida pela Sociedade Britânica para a História da Ciência (BRITISH SOCIETY FOR THE HISTORY OF SCIENCE - BSHS, 1988) enumera três companhias produzindo o ácido pirolenhoso em 1820 na Inglaterra e aponta para a introdução dos destiladores para a produção do extrato pirolenhoso em 1826. Em 1941, já havia oito companhias produzindo o extrato pirolenhoso com grandes lucros.

A divulgação das primeiras pesquisas com o extrato pirolenhoso no Japão data de 1874. Em 1893, as pesquisas experimentais visavam a construção de fornos e de técnicas de carbonização para obtenção de óleo de terenbentina e alcatrão. Após a Segunda Guerra, em 1944, no país iniciou-se a utilização do extrato pirolenhoso nas lavouras. Em 1945, foi publicado o primeiro livro, intitulado

“Fabricação e Utilização do Extrato Pirolenhoso”, por Tatsujiro Fukuda, com relatos interessantes sobre a eficiência do extrato pirolenhoso na cultura do arroz, sendo utilizado contra pragas e pássaros e no processo de compostagem e esterelização (CAMPOS, 2007).

No Brasil, a demanda por produtos naturais e/ou orgânicos tem crescido muito nos últimos anos e, nesse contexto, o extrato pirolenhoso tem sido uma das referências (GLOBO RURAL, 2009). O interesse pelo produto é decorrente do seu reduzido nível de toxidez, protegendo, dessa forma, a saúde do agricultor, bem como a do consumidor.

O pioneirismo em relação ao uso do extrato pirolenhoso na agricultura no Brasil é atribuído ao Agrônomo Shiro Miyasaka, fundador da Associação dos Produtores de Agricultura Natural de São Paulo (APAN), que passou a ser uma das referências brasileiras nessa área. Atualmente, pode-se encontrar produtos comerciais disponíveis à base de extrato pirolenhoso para aplicação agrícola e sua utilização é proposta, por exemplo, como veículo para os micronutrientes de plantas, ajuste de pH, entre outras propriedades não confirmadas, como controle de pragas. (ECOPIROL; BAUSIL, 2009).

Tipicamente, o extrato pirolenhoso aparenta ser um líquido de cor marrom avermelhada que assemelha-se à combinação de chá preto, da cor da cerveja ou vinho. O extrato pirolenhoso pode variar da cor verde escura para uma vermelha escura, dependendo da estocagem, do processo de fabricação, do tipo de madeira e suas condições climáticas. O pH do extrato pirolenhoso é baixo, variando de 2 a 3, devido à sua elevada quantidade (8 a 10%) de ácidos voláteis, principalmente ácido acético e ácido fórmico, sendo que os mesmos são responsáveis pelas propriedades corrosivas do extrato (SIPILÄ et al., 1998; AUBIN et al., 1980; LOO et al., 2007).

De acordo com Campos (2007), o extrato pirolenhoso puro não é concentrado, diluído ou misturado com quaisquer substâncias similares. Ele é produzido por meio da colocação da solução não diluída natural no tanque de armazenamento, à espera da estabilização natural com posterior filtragem da solução com carvão ativado para refinamento (eliminando as pequenas impurezas). Ele deve ser acondicionado em recipiente fácil de reconhecer e resistente aos ácidos, além de nunca ser armazenado em vasilhas de ferro ou alumínio. Seu odor característico é o cheiro de defumados. Deve-se evitar o contato do extrato pirolenhoso bruto com a pele e o alcance de crianças.

Definições para o controle de qualidade do extrato pirolenhoso obtido de diferentes métodos de produção, assim como sua utilização, ainda não existem que especifiquem seus constituintes e uma norma mais rígida de controle de qualidade torna-se necessária para garantir a segurança e eficácia desse produto. Um procedimento que garantiria a segurança e eficácia do produto seria a especificação de sua composição.

2.4 Referências de aplicação do extrato pirolenhoso

2.4.1 Normas

As regras de utilização do ácido pirolenhoso têm passado por mudanças. Inicialmente o extrato pirolenhoso era considerado um composto quelante/complexante, segundo a Secretária de Apoio Rural e Cooperativismo do Ministério da Agricultura e Abastecimento (2004). Na agricultura, embora não existisse muito material científico que comprovasse a propriedade quelante do extrato, ele era utilizado para liberar os metais pesados adsorvidos no solo e aumentar a sua disponibilidade, de forma que as plantas pudessem extrair maior quantidade de metais (LIMA, 2008).

Em dezembro de 2008, o Ministério da Agricultura publicou a instrução normativa nº 64, que mudava as regras proibindo a utilização de produtos que tivessem contaminantes maléficos à saúde humana e mencionavam entre eles o ácido pirolenhoso. Segundo Michella Taki, agrônoma da Cativar, Cooperativa de Técnicos do Vale do Ribeira, essa instrução normativa proibia a utilização desse ácido devido a falta de dados conclusivos sobre suas propriedades; por conter alcatrão na sua composição, o produto entrou na lista de produtos proibidos na agricultura orgânica (GLOBO RURAL, 2009).

Em 2009, a Secretaria de Defesa Agropecuária e Abastecimento aprovou uma nova instrução normativa nº25 sobre especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. Nela o ácido pirolenhoso é aprovado como agente quelante e complexante orgânico autorizado para fertilizantes orgânicos e organominerais, além

de aprovado como aditivo autorizado para uso em fertilizantes orgânicos organominerais.

2.4.2 Pesquisas sobre aplicação do extrato pirolenhoso

Pesquisas sobre controle de bactérias indicam que o extrato pirolenhoso é eficaz no controle da *Pseudomona sp* (DE MELO et al., 2007).

Em estudos conduzidos *in vitro* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, a aplicação de extrato pirolenhoso mostrou-se mais eficiente na redução do crescimento micelial do que no tratamento com óleo da planta “nim”. Os resultados do extrato pirolenhoso mostraram-se muito próximos ao tratamento testemunha positiva (MELLO et al., 2002). Outra pesquisa comparou produtos químicos preservantes e extrato pirolenhoso obtido a partir de três espécies do cerrado (*Vochysia thyrsoidea*, *Qualea grandiflora* e *Pouteria ramiflora*) na inibição de fungos emboloradores (*Aspergillus Níger* e *Trichoderma sp.*) em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), quando comparado com o pentaclorofenato de sódio (PCP-Na), tribromofenol (TBF), tribromofenato de sódio (TBP-Na) e 3-iodo-2 propinil butil carbamato (IPBC), comercialmente utilizados para esta finalidade. Os resultados indicaram que os extratos pirolenhosos foram mais eficientes no controle do fungo *Aspergillus Níger* em relação ao *Trichoderma sp* (DA COSTA et al., 2003).

2.5 Os produtos “naturais/orgânicos” e a indústria cosmética e de saneantes

Atualmente o cosmético e saneante são definidos como descrito a seguir segundo ANVISA (1977).

Cosmético - O de uso externo, destinado à proteção ou ao embelezamento das diferentes partes do corpo, tais como pós faciais, talcos, cremes de beleza, creme para as mãos e similares, máscaras faciais, loções de beleza, soluções leitosas, cremosas e adstringentes, loções para as mãos, bases de maquiagem e óleos cosméticos, rouges, *blushes*, batons, lápis labiais, preparados anti-solares, bronzeadores e simulatórios, rímeis, sombras, delineadores, tinturas capilares, agentes clareadores de cabelos, fixadores, laquês, brilhantinas e similares, tônicos capilares, depilatórios ou epilatórios, preparados para unhas e outros

Saneante Domissanitário - Substância ou preparação destinada à higienização desinfecção ou desinfecção domiciliar, em ambientes coletivos ou públicos, em lugares de uso comum e no tratamento da água, compreendendo:

a) Inseticida - destinado ao combate, à prevenção e ao controle dos insetos em habitações, recintos e lugares de uso público e suas cercanias.

b) Raticida - destinado ao combate a ratos, camundongos e outros roedores, em domicílios, embarcações, recintos e lugares de uso público, contendo substâncias ativas, isoladas ou em associação, que não ofereçam risco à vida ou à saúde do homem e dos animais úteis de sangue quente, quando aplicado em conformidade com as recomendações contidas em sua apresentação.

c) Desinfetante - destinado a destruir, indiscriminada ou seletivamente, microrganismos, quando aplicado em objetos inanimados ou ambientes.

d) Detergente - destinado a dissolver gorduras e à higiene de recipientes e vasilhas e à aplicação de uso doméstico.

Existe um movimento mundial crescente no sentido de se incluir os atributos de produto natural e/ou orgânico a uma gama cada vez maior de cosméticos. Esse movimento se intensificou a partir de 2001, inspirado, entre outras coisas, pela virada do milênio como marco de resgate da essência do ser humano. No Brasil, ainda não existem dados específicos sobre esse mercado, mas algumas pesquisas estatísticas de outros países conseguem dar uma dimensão do quanto ele é significativo. Nos Estados Unidos, onde a indústria de cosméticos já suplantou a marca de faturamento de US\$ 20 bilhões por ano, cerca de 10% dessa cifra, ou seja, US\$ 2 bilhões, são provenientes das vendas de produtos com base natural (CORAZZA, 2006).

Segundo a revista *Cosmetics & Toiletries* (2007), o mercado de produtos cosméticos naturais e orgânicos é muito promissor. Ela apresenta dados do “The US Market for Natural Personal Care Products” informando que esses produtos deveriam alcançar a cifra de 5,8 bilhões de dólares no ano de 2008. Na Europa, esse mercado já ultrapassou a marca de 1 bilhão de euros, sendo que, na Alemanha, os produtos representam 4% do que é comercializado pela indústria cosmética, estimando-se que atinja 10% em 2012. Na França, onde esse mercado de cosméticos é mais dinâmico, em 2005, a venda dos cosméticos naturais cresceu 40%. Apesar da extensão do território brasileiro, o país ocupa ainda a 7ª. posição

em área destinada à produção orgânica. No entanto, acredita-se que, acompanhando a tendência mundial, este mercado esteja em franco crescimento.

Com relação a saneantes, o segmento de produtos de limpeza, há 6 anos consecutivos, vem registrando crescimento acima do PIB. Segundo dados da Associação Brasileira de Produtos de Limpeza e Afins (ABIPLA), o crescimento do faturamento do setor no Brasil, medido como percentual em relação ao ano anterior foi de 6,5% em 2008, 7,0% em 2009, 11% em 2010 e 6,7% em 2011 (valor estimado) atingindo um valor de R\$ 14,4 bilhões (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS DE LIMPEZA E AFINS - ABIPLA, 2012). Muitos estudos vêm apontando também que lançamentos constantes, novas tecnologias, ingredientes especiais, maior eficiência, embalagens inovadoras e melhor relação custo-benefício estão fazendo toda a diferença na escolha do consumidor e no faturamento das empresas (HOUSEHOLD & COSMÉTICOS, 2009).

Como já mencionado, os produtos orgânicos são uma opção interessante para empresas que buscam atender às aspirações de saúde, ecologia e responsabilidade social dos novos clientes. A seleção de um sistema conservante adequado para compor a fórmula de um produto preservando sua integridade ainda é um grande desafio. Mencione-se que as listas de ingredientes permitidos para cosméticos orgânicos, por exemplo, são bem restritas até o momento. No caso de saneantes novos conservantes estão sendo estudados visando a substituição do formaldeído, cuja utilização para este fim está proibida. Dessa forma, a busca por novos produtos se mostra bastante importante, o que motiva a realização de estudos nessa direção a partir do extrato pirolenhoso.

2.6 Conservantes

Os conservantes são substâncias químicas, também conhecidas como preservantes (tradução adaptada do inglês, *preservative*), usados em muitos cosméticos e saneantes para aumentar a vida útil dos produtos, impedindo o desenvolvimento de bactérias, fungos, leveduras e mofo que podem causar doenças ou, simplesmente, prejudicar o bom aspecto do produto final. Não é função do conservante compensar más práticas de fabricação. Mesmo que o fabricante possa oferecer um produto isento de contaminações, o próprio consumidor,

inadvertidamente, pode adicionar uma certa carga microbiana durante o seu uso, tornando-se necessário prover o produto de algum sistema eficiente de conservação.

Um produto livre de microorganismos que possam causar danos à saúde humana constitui uma exigência crescente, principalmente por parte dos consumidores e também dos órgãos responsáveis pela vigilância sanitária do País. Um creme ou xampus contaminado pode causar um dano à saúde do consumidor devido à população de microorganismos. O crescimento de microorganismos pode ainda provocar mudanças de cor, odor e consistência, resultando no abandono do produto pelo consumidor, reclamações de produto junto à empresa e nas consequentes perdas financeiras e de imagem da marca ou da empresa como um todo. Embora o seu uso seja controvertido, vários conservantes são aprovados e aplicados em uma infinidade de produtos cosméticos. Para se selecionar o melhor sistema conservante para cada fórmula, na sua melhor combinação de tipos de ativo e na concentração ideal, é preciso dominar o conhecimento do trinômio produto-conservantes-microorganismos. Como produto, é importante considerar sua composição química, embalagem e o processo de fabricação (COSMÉTICOS E PERFUMES, 2010; ANVISA, 2008a).

O primeiro aspecto a ser considerado na escolha do conservante é a regulamentação do uso de substâncias de ação conservante permitidas, uma vez que é de caráter eliminatório. No Brasil, atualmente as normas de BPFeC (Boas Práticas de Fabricação e Controle) são estabelecidas pela Portaria do Ministério da Saúde No 348 de 18 de agosto de 1997. A lista de conservantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes consta da Resolução RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) No 162 de 11 de setembro de 2001 (ANVISA, 2008c). Já a do setor de Saneantes consta da RDC nº35 de 03 de Junho de (ANVISA, 2008b).

Para se definir se a susceptibilidade do produto é maior à contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, avalia-se inicialmente a atividade do produto sob a água que, quanto maior a quantidade, mais susceptível será a bactérias. Em geral, cremes e loções exigem atividade tanto bacteriostática quanto fungistática, fazendo-se necessário utilizar misturas de conservantes de amplo espectro de atividade. As propriedades físico-químicas e organolépticas devem ser avaliadas para prever-se possíveis incompatibilidades químicas com os componentes da fórmula (e até de inativação do conservante), possíveis interferências na cor, no odor e também no

sabor, em caso de produtos para os lábios (COSMÉTICOS E PERFUMES, 2010; ANVISA, 2008a).

Na prática, todos os produtos cosméticos estão sujeitos à contaminação com microrganismos. O crescimento de fungos e bactérias nos produtos dependerá de uma série de fatores químicos e físicos, como disponibilidade de água, composição do produto que fornecerá nutrientes para os microrganismos e temperatura de estocagem (ORTH, 1984). A baixa qualidade de um cosmético pode ocorrer principalmente devido à contaminação microbiana resultante da falta de higiene na fabricação e da baixa estabilidade dos constituintes da formulação. Durante a fabricação é importante evitar que os microrganismos invadam o produto, o qual é um substrato com substâncias excelentes para o seu crescimento, provocando modificações visíveis ou não no produto final, tais como alteração de cor, odor, viscosidade, características sensoriais, degradação dos componentes da formulação, além de poder ocasionar reações tóxicas ao usuário, dependendo do tipo do microrganismo presente, da via de administração utilizada e do estado de saúde do usuário do produto (CARVALHO et al., 1989).

Uma formulação cosmética geralmente apresenta requisitos importantes para o crescimento microbiano, como água, vários minerais e vitaminas, além de ser um ambiente com oxigênio, pH e temperatura favoráveis (PARKER, 1984). Dessa forma, ela se torna alvo de contaminação em sua produção, para o desenvolvimento de microrganismos. Alguns microrganismos estão relacionados com prováveis fontes de contaminação: água (*Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Flavobacterium* e *Achromobacter*), ar (esporos de fungos, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Bacillus sp.*, leveduras e esporos bacterianos), matéria-prima (*Clostridium sp.*, *Salmonella*, coliformes, *Actinomyces*, bolores e leveduras) e pessoal operacional (coliformes, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*) (CORBETT, 1992; CHORILLI et al., 2007).

A eficácia do sistema conservante só pode ser garantida por meio de testes de desafio ou *Challenge Tests*, como são conhecidos, que consistem na inoculação do produto com microorganismos especificados pela CTFA (*The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*) e a constante monitorização da carga sobrevivente. Idealmente, estes testes devem ser realizados durante os testes de estabilidade das amostras na fábrica (COSMÉTICOS E PERFUMES, 2010; ANVISA, 2008a).

2.6.1 O conservante ideal

O conservante ideal não existe e é por isso que se usam combinações ou “blends” de produtos. Um bom conservante deve apresentar atividade de amplo espectro, ou seja, deve eliminar todos os tipos de microorganismos, que incluem fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em geral, substâncias químicas ativas contra bactérias não são ativas contra fungos e os ativos contra fungos não são efetivos contra bactérias. Por outro lado, os conservantes devem ser usados nas mais baixas concentrações possíveis, de acordo com as exigências, reduzindo as chances de irritação e outras preocupações de toxicidade. O conservante ideal para uso em cosméticos deve ser solúvel em água e insolúvel em óleo, pois os microorganismos crescem na fase aquosa e na interface água-óleo. Assim, para serem mais funcionais, os conservantes devem ser acrescentados na fase aquosa. A estabilidade é outra importante propriedade tanto para cosméticos quanto para saneantes. O conservante deve ser estável a qualquer temperatura e condições de pH que sejam utilizadas durante o processo de fabricação dos cosméticos, deve ser incolor e inodoro, bem como não deve reagir com outros ingredientes para formar cores ou odores, nem deve perder atividade na sua presença. O conservante ideal deve funcionar durante a fabricação e ao longo da vida útil dos cosméticos e saneantes, apresentar facilidade de análise usando métodos atuais bem conhecidos e deve ser de fácil controle, bem como não inflamável e não tóxico (COSMÉTICOS E PERFUMES, 2010; ANVISA, 2008a).

2.6.2. Regulamentações e aprovações¹

Embora existam algumas críticas ao uso de conservantes em cosméticos, alguns deles estão inclusos em uma lista aprovada por autoridades competentes, tendo sido testados repetidamente para assegurar sua segurança em aplicações cosméticas.

Os parabenos, por exemplo, não são perigosos, são autorizados para uso na indústria cosmética e atualmente são os conservantes que oferecem maior efetividade a mais baixas doses. A regulamentação da União Européia e do Brasil

¹ Os comentários desse item foram essencialmente baseados em COSMÉTICOS E PERFUMES, 2010.

permite o uso de no máximo 0,4% de cada parabeno e um máximo de 0,8% de parabeno total. Já o Japão permite no máximo 1% de parabeno total em todos os produtos cosméticos.

Os fenoxi-etanóis são confirmados pela Comissão de Cosmetologia da AFSSAPS (Agência Francesa de Segurança Sanitária dos Produtos de Saúde) como seguros em suas aplicações cosméticas. Na França, o fenoxi-etanol gerou controvérsia devido aos éteres de glicol, porém, todos os estudos disponíveis foram examinados e o caso foi arquivado.

De acordo com a Agência Internacional dos Estados Unidos de Pesquisa em Câncer (IARC), o formaldeído é classificado como CMR1 (*Carcinogenic, Mutagenic, Reproduction Toxic Substances Category 1º*) e esteve por muitos anos sob a fiscalização da vigilância epidemiológica, em particular, com o monitoramento de trabalhadores expostos a seus fumos. As autoridades de saúde estão revisando os resultados deste estudo para decidir se os regulamentos precisam ser modificados. A Agência de Substâncias Químicas Européia solicitou informações adicionais para confirmar a classificação da IARC (Agência Internacional para Pesquisa do Câncer). No caso de cosméticos, o formaldeído é o conservante menos usado, sendo encontrado, principalmente, em xampus sem enxágue. O triclosan é um antimicótico usado para propósitos terapêuticos, sendo um dos poucos antimicóticos ativos em pacientes imunodeprimidos. Também é usado como conservante em muitos produtos de consumo.

O problema quanto ao triclosan é a resistência, ou seja, quanto mais a pessoa se expõe a esta substância, mais alto é o risco de ela se tornar menos resistente ao organismo, tornando-o terapeuticamente inativo. Assim, de acordo com o SCCP (Comitê Científico da União Européia para Produtos de Consumo) é melhor limitar seu uso para evitar o desenvolvimento de resistência. Todavia, segundo a EMEA (Agência Européia para Avaliação de Produtos Medicinais) seu uso tópico não induziria à resistência.

Ainda com referência aos EUA, atualmente o FDA (*Food and Drug Administration*) proíbe ou impõe severas restrições ao uso de vários conservantes. O hexaclorofeno é um deles. Devido a seu efeito neurotóxico e a sua habilidade para penetrar na pele humana, o hexaclorofeno só pode ser utilizado quando um conservante alternativo não se mostrar efetivo. O nível de uso não pode exceder 0,1% e não pode ser usado em cosméticos que sejam aplicados em mucosa. As

combinações de mercúrio também são proibidas ou restritas, porque são prontamente absorvidas pela pele em aplicações tópicas e têm a tendência de acumularem-se no corpo. Podem causar reações alérgicas, irritação da pele ou manifestações neurotóxicas. Em cosméticos, seu uso é limitado na área dos olhos a uma concentração que não exceda 65ppm de mercúrio como metal (aproximadamente 0,01% acetato de fenilmercúrio), desde que nenhum outro conservante efetivo e seguro esteja disponível para uso. O bitionol também é proibido, devido à sensibilização de foto-contato. O halogenato salicilanilides também é proibido ou tem seu uso restrito, devido à sensibilização de foto-contato. Este ingrediente inclui dibromsalan, tribromsalan, metabromsalan e tetraclorosalicilanilide.

A União Européia pré-aprova os conservantes, trabalhando em uma Lista Positiva conhecida como Anexo VI da Lista de Produtos Cosméticos que Contém Conservantes (COMISSÃO EUROPÉIA, 2011). Atualmente existem 56 conservantes permitidos. Muitos outros países seguem o regulamento geral da União Européia e agora possuem “Listas Positivas” para conservantes permitidos. O Japão mudou os regulamentos cosméticos e publicou uma Lista Positiva, a qual é ainda mais restrita. O Canadá estabeleceu uma “Lista Quente” de ingredientes cosméticos que ou são proibidos ou são restritos. A adição ou mudanças estão sob o controle da Divisão de Cosméticos da Agência de Segurança de Produtos de Consumo, que faz parte do Ministério da Saúde do Canadá.

No Brasil, 60 conservantes estão aprovados para uso (Anexos A e B), sendo que as proibições e restrições estão a cargo do Ministério da Saúde. No caso de saneantes, o conservante formaldeído comumente utilizado nos produtos foi banido das formulações devido à sua reconhecida carcinogenicidade e atual classificação toxicológica pela IARC. Uma lista com as substâncias de ação conservante permitidas e suas respectivas concentrações foi fornecida na mesma resolução RDC nº35. Uma lista com os conservantes aprovados pela ANVISA é colocada nos Anexos A e B.

2.7 Exigências e desafios dos conservantes naturais para cosméticos e saneantes

A partir dos anos 90, houve uma conscientização global de que o novo século seria o da preservação dos recursos ambientais e da qualidade de vida, com o

consequente aumento, em escala geométrica, da complexidade dos produtos, dos mercados e da logística como um todo. O grande desafio das empresas passou a ser, portanto, viabilizar matérias-primas e processos, que minimizem os impactos ambientais, utilizem fontes naturais renováveis e possam ter, como vantagem competitiva, funcionalidades que melhorem a qualidade de vida do ser humano (PICCOLI, 2008; ROSSI, 2009).

As exigências do mercado consumidor induzem a indústria cosmética a formular produtos seguros cada vez menos agressivos e naturais. Durante a formulação para tais apelos, a dificuldade maior encontra-se em conservar o produto final (PACKER; LUZ, 2007).

Tendo em vista a procura dos consumidores por produtos cada vez mais seguros, a tendência mundial é a da minimização da concentração e do número de tipos de ativos, permanecendo no mercado os que contam com melhores e mais completos estudos toxicológicos, bem como com dados epidemiológicos satisfatórios. Isto obriga o formulador a aprofundar seus conhecimentos em química, para combinar sinergicamente um portfólio cada vez menor de ativos e reduzir a necessidade do uso de conservantes. Repensa-se, assim, o método tradicional de formulação em que os conservantes eram encarados como simples coadjuvantes para se criar um conceito mais avançado de produtos auto-conservantes ou livres de conservantes em que a conservação é inerente à própria fórmula. Esse conceito alinha-se às metas de redução de custos de desenvolvimento e otimização de fórmulas, uma prioridade que já se incorporou em todas as organizações (PINTO et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram utilizados dois tipos de extrato pirolenhoso:

- a) Obtido em escala industrial junto a um produtor de carvão vegetal;
- b) Obtido em escala de laboratório.

3.1.1 Extrato pirolenhoso obtido em escala industrial

Foi utilizado extrato pirolenhoso obtido da carbonização da madeira de eucalipto, coletado entre as temperaturas de 80 e 120° C, em fornos de alvenaria, numa carvoaria localizada na região de Atibaia, São Paulo². O produto havia sido armazenado durante 3 anos visando a separação de uma camada de residual superior de aspecto oleoso (óleo leve) e uma camada inferior decantada (alcatrão). A parte intermediária era considerada como o extrato pirolenhoso propriamente dito (ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE AGRICULTURA NATURAL - APAN, 2003).

3.1.2 Extrato pirolenhoso obtido em escala de laboratório

Foi utilizado extrato pirolenhoso obtido da carbonização laboratorial de cavacos de madeira de *Eucalyptus urograndis*, clone híbrido interespecífico, que concilia as características de crescimento rápido do *E. grandis*, espécie muito difundida para a produção de carvão vegetal nos estados de Minas Gerais e São Paulo, com as maiores densidade e variedade fenotípica do *E. urophylla*, espécie que assumiu posição estratégica no melhoramento genético em áreas com vocação para a silvicultura clonal (ASSIS, 2001; COUTO et al., 2008).

O produto foi obtido mediante a condensação dos gases da carbonização como descrito no item 3.2.1.2.

² Carvoaria São Manoel.

3.2 Método³

3.2.1 Obtenção dos extratos pirolenhosos

3.2.1.1 Extrato pirolenhoso de laboratório

Para obtenção do extrato pirolenhoso foi realizada carboninização de cavacos de madeira à temperatura de 400° C em forno-mulfa. Considerou-se o início da carbonização a 100° C, equivalente àquela sob a qual o material havia sido submetido à secagem em estufa, até peso constante. Para a condução do processo, considerou-se um tempo total de 2,5 horas de tratamento. Foram conduzidas três repetições de carbonizações. Após atingida a temperatura final, o aquecimento foi interrompido e o material deixado em resfriamento natural no interior do forno-mufla até 35 a 45° C. O forno-mufla aquecido era dotado de resistência elétrica e indicação e controle analógicos de temperatura. Um recipiente metálico (volume nominal de 500 cm³) foi colocado no interior da mesma, contendo amostras de madeira seca. A quantidade de madeira utilizada em cada pirólise foi fixada em função da máxima ocupação do volume do recipiente metálico. O forno-mufla estava conjugado a um sistema de coleta e separação dos gases condensáveis e não-condensáveis (figura 2 e figura 3).

3.2.1.2 Extrato pirolenhoso industrial

O extrato constou do líquido obtido pela condensação da fumaça da carbonização da madeira, na fase em que a mesma era expelida nos limites de 80 e 120°C medida a cerca de 10cm abaixo da boca de saída da chaminé, em fornos de alvernaria, na Carvoaria São Manoel, localizada na região de Atibaia, São Paulo. Essa era a prática da empresa, visando a obtenção de extrato pirolenhoso para fins de comercialização. A madeira utilizada foi *Eucalyptus* sp (provavelmente *E.saligna*) com idade entre 5 e 8 anos, umidade entre 20 e 25% cortada a 1,10m de comprimento e diâmetro médio de 20cm. O forno possuía volume para carga de 5

³ Os procedimentos foram conduzidos no LQCE – Laboratórios Integrados de Química, Celulose e Energia do Departamento de Ciências Florestais / ESALQ / USP.

metros cúbicos aparentes de madeira. A figura 4 apresenta referências do local da obtenção do extrato pirolenhoso industrial.

Figura 2 - Processo de pirólise e coleta dos gases. As setas indicam o sentido da entrada e saída da água do condensador, (A) Balão de coleta de gases condensáveis, (B) Balão de coleta dos gases não-condensáveis

Figura 3 - Equipamento utilizado na pirólise laboratorial

Figura 4 - Processo industrial de pirólise e coleta dos gases

3.2.2 Balanço de massa e cálculo de rendimentos em carvão e gases obtidos em escala de laboratório

Após resfriamento do forno-mufla, o carvão vegetal e o gás condensado (extrato pirolenhoso) foram pesados em balança semi-analítica, o que possibilitou o cálculo dos seus rendimentos gravimétricos.

O rendimento gravimétrico em carvão expressa a relação entre o peso do carvão e o peso da madeira, ambos na base seca, segundo a equação 1.

$$RGC = \frac{PCS}{PMS} \times 100 \quad (1)$$

onde RGC corresponde ao rendimento gravimétrico em carvão (%), PCS ao peso do carvão seco (g) e PMS a peso da madeira seca (g).

O rendimento gravimétrico em gases condensáveis expressa a relação entre o peso do líquido condensado e o peso da madeira, na base seca, segundo a equação 2.

$$RLP = \frac{PGC}{PMS} \times 100 \quad (2)$$

onde RLP corresponde ao rendimento gravimétrico em extrato pirolenhoso (%), PGC ao peso do gás condensado (g) e PMS ao peso da madeira seca (g).

O rendimento gravimétrico em gases não-condensáveis foi obtido pela subtração dos rendimentos em peso do carvão e do gás condensado, de um total de 100%, segundo a equação 3.

$$RGNC = 100 - (RGC + RLP) \quad (3)$$

onde RGNC corresponde ao rendimento gravimétrico em gases não-condensáveis (%), RGC ao rendimento gravimétrico em carvão (%) e RGGC ao rendimento gravimétrico em gases condensáveis (%).

Os dados de rendimentos gravimétricos em carvão e gases foram submetidos a análise estatística com o intuito de verificar se havia variações no sistema.

A realização da análise de variância foi condicionada à adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

3.2.3 Determinação do pH do extrato pirolenhoso obtido em escala industrial e de laboratório

O pH é o logaritmo negativo da concentração molar de íons de hidrogênio. Representa convencionalmente a acidez ou a alcalinidade de uma solução. A escala de pH vai de 1 (ácido) a 14 (alcalino), sendo que o valor 7 é considerado pH neutro.

O pH é determinado pela diferença de potencial entre dois eletrodos, o de referência e o de medida, imersos na amostra a ser analisada, sendo dependente da atividade dos íons de hidrogênio na solução. Nesse experimento foi utilizado um pHgâmetro da marca Tecnal.

Os dados de pH foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com o intuito de verificar se havia variações no sistema.

A realização da análise de variância foi condicionada à adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

3.2.4 Análise organolética do extrato pirolenhoso

Foram realizadas avaliações no extrato pirolenhoso, compreendendo sua estabilidade ao armazenamento em condições que pudessem ser analisadas possíveis mudanças em suas características organolépticas ao longo de tempo. Para tanto, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro, transparentes e

opacos (âmbar), devidamente fechados para garantia de boa vedação contra saída de gases ou vapor. Sob tais condições, as amostras foram submetidas a duas condições de armazenagem laboratorial (temperatura ambiente): (a) sem exposição à luz; (b) com exposição à luz ambiente. O armazenamento foi conduzido durante 4 semanas, com a avaliação de cor, odor e formação de fases por decantação. Os testes foram realizados tendo como referências as normas da ANVISA (2008a). Deve-se ressaltar, no entanto, que as avaliações não foram conduzidas na sua forma completa, no sentido de que pretendeu-se apenas obter um carácter preliminar orientativo do assunto com os resultados obtidos. Pesou para tal decisão, o fato da composição química dos extratos apresentar-se mais relevante em termos de qualificação dos produtos, sobretudo na questão da presença de produtos tóxicos.

3.2.5 Análises cromatográficas do extrato pirolenhoso obtido em escala industrial e de laboratório ⁴

Todos os produtos obtidos como extrato pirolenhoso sofreram caracterização de seus compostos por meio de análises em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (GC/MS) usando um TRACE GC Ultra, marca Thermo equipado com um DSQII. O método usou como referência inicial a metodologia proposta por Loo et al. (2007).

Foi utilizado coluna capilar de sílica (30 m x 0,30 mm i.d. x 0,25 µm). A temperatura inicial da coluna foi programada de 40 °C (3min) com um aumento de 15 °C/min até 270 °C (6min). Helium foi usado como o gás de arraste. A temperatura de injeção e do detector foram de 250 °C. A injeção de volume programada foi de 0 µl no modo *split*. Os dados foram processados utilizando o software Xcalibur.

Os extratos pirolenhosos produzidos foram comparados, com o intuito de se identificar possíveis discrepâncias qualitativas entre os compostos presentes.

As amostras dos extratos pirolenhosos da escala de laboratório (PLO) e escala industrial (PIO) foram comparadas, considerando a somatória dos picos dos compostos majoritários identificados no extrato da fração bioativa proveniente da

⁴ Os procedimentos foram conduzidos no LQCE – Laboratórios Integrados de Química, Celulose e Energia do Departamento de Ciências Florestais / ESALQ / USP.

bioautografia (item 4.8). A somatória dos percentuais destes picos observados para os extratos PLO e PIO foram comparados através da análise de variância (ANOVA). A realização da análise de variância foi condicionada à adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

3.2.6 Processo de destilação para determinação do teor de alcatrão

Em seguida à análise cromatográfica, foi realizado o processo de destilação para determinação do teor de alcatrão. O experimento consistiu-se na avaliação de um processo de destilação simples, onde um balão de destilação de 250 ml foi conectado a um conjunto condensador-coletor do destilado. O balão foi colocado sobre uma manta de aquecimento elétrico e um termômetro foi usado para controle da temperatura (figura 5).

Figura 5 - Processo de Destilação Simples. As setas indicam o sentido da entrada e saída da água do condensador, (A) e (B) Balão de entrada do extrato pirolenhoso e de coleta do destilado, respectivamente; (C) Termômetro; (D) Condensador; (E) Manta de aquecimento

Todos os experimentos foram realizados colocando-se 180g de extrato pirolenhoso no balão de destilação. O aquecimento se deu até a temperatura de 100°C com permanência de, em média, 1,5 horas, tempo que se mostrou suficiente para a finalização da fase líquida no balão. Todos os experimentos foram realizados à pressão atmosférica. A temperatura da água do condensador foi de 25°C.

3.2.7 Balanço de massa e cálculo de rendimentos em alcatrão e extrato pirolenhoso destilado obtido em escala industrial e laboratorial

Concluída a destilação, o alcatrão e o extrato pirolenhoso destilado foram pesados em balança semi-analítica, o que possibilitou o cálculo dos seus rendimentos gravimétricos.

O rendimento gravimétrico em alcatrão expressa a relação entre o peso do alcatrão e o peso do extrato pirolenhoso, segundo a equação 4.

$$RGA = \frac{PA}{PLP} \times 100 \quad (4)$$

onde RGA corresponde ao rendimento gravimétrico em alcatrão (%), PLP ao peso do extrato pirolenhoso (g) e PA ao peso do alcatrão (g).

O rendimento gravimétrico em extrato pirolenhoso destilado expressa a diferença percentual do teor de alcatrão em relação ao extrato, segundo a equação 5.

$$RGLD = 100 - RGA \quad (5)$$

onde RGLD corresponde ao rendimento gravimétrico do extrato pirolenhoso destilado (%).

Os dados de rendimentos gravimétricos em alcatrão e extrato destilado foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com o intuito de verificar se havia variações no sistema. A realização da análise de variância foi condicionada à

adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

3.2.8 Avaliação do potencial antifúngico dos extratos pirolenhosos⁵

Duas amostras representando extratos pirolenhosos de diferentes origens foram avaliados quanto à atividade antifúngica. Uma amostra de extrato proveniente da escala industrial (PIO) e outra laboratorial (PLO) foram avaliados. Uma solução de formol, um agente reconhecidamente antifúngico, com concentração de 37% (Merck art.1040031001) foi utilizada para comparação com os extratos avaliados.

A avaliação da capacidade antifúngica foi realizada sobre o fungo *Aspergillus niger* (ATCC 16404), utilizado normalmente em avaliações de cosméticos e saneantes. O inóculo do fungo foi preparado a partir de colônias crescentes em meio Batata Dextrose Agár de 7 a 21 dias a 28°C. Para isto, uma alça de Drigalski foi utilizada para raspar a superfície do meio onde as colônias estavam se desenvolvendo e imersa em 50 mL de solução aquosa estéril e 500 µL de dispersante Tween 20. Este procedimento foi realizado 3 vezes e, então a concentração de esporos na solução foi mensurada utilizando uma câmara de Neubauer, visando ajustar a contagem de esporos para 10⁶.

A técnica utilizada para avaliação do potencial antifúngico foi a diluição em meio (Vilela et al., 2009), utilizando-se diferentes concentrações dos extratos visando se obter a curva de inibição com a respectiva Concentração Inibitória Mínima (CIM). As doses utilizadas foram de 25, 50, 100, 150 e 200 µL para o PIO, de 20, 25, 30, 35 e 40 para o PLO e de 2,5, 5, 10, 15 e 17 para a solução de formol. Cada uma das doses foi adicionada a 2 mL de meio de cultura Batata Dextrose Agár (BDA, marca Himedia) fundente (45 -50°C) e contidos em uma placa de petri de 2 cm de diâmetro. O meio e o extrato foram homogeneizados e deixados resfriar sob condições assépticas. Como tratamentos testemunha foram preparadas placas com meio de cultura com os mesmos volumes utilizados de extratos e formol, entretanto utilizando somente água esterilizada.

⁵ Os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) / ESALQ / USP.

Após o resfriamento o fungo foi inoculado no meio de cultura contido nas placas utilizando-se um estilete de metal esterilizado, que foi imergido na solução de inóculo e que perfurou o meio de cultura na posição central da placa. Três placas para cada tratamento foram assim preparadas. As placas foram identificadas, vedadas com filme plástico e armazenadas em câmara com controle de temperatura a $28 \pm 0,3$ °C, na ausência de luz, por um período de 7 dias, após o qual foi realizada a mensuração do crescimento radial da colônia desenvolvida a partir do ponto de inoculação. O crescimento radial foi obtido através da média de duas medidas perpendiculares do diâmetro da colônia. Utilizou-se para estas medidas um paquímetro.

A percentagem de inibição foi calculada utilizando-se a equação 6.

$$PI = \frac{(\text{Controle} - \text{Tratamento})}{\text{Controle}} \times 100 \quad (6)$$

Como os tratamentos foram realizados em triplicatas a percentagem de inibição representativa do tratamento constituiu-se de suas médias.

3.2.9 Identificação e análise da composição química de frações antifúngicas do extrato pirolenhoso

Como a amostra do extrato pirolenhoso laboratorial apresentou uma Concentração Inibitória Mínima mais reduzida, ou seja, um potencial antifúngico maior, esse extrato foi utilizado para o fracionamento dirigido utilizando a técnica da bioautografia (Meepagala et al., 2002), visando tentar identificar os compostos envolvidos nesta bioatividade⁶.

Nesta técnica 50 µL do extrato foram aplicados sobre uma placa de cromatografia em camada delgada de 10 x 20 cm (Merck art. 10005553), que foi seco com ventilação forçada e a placa colocada para desenvolver em uma cuba contendo 50 mL da mistura de solvente tolueno e acetato de etila na proporção de 9,5:0,5. Duas placas foram assim preparadas. Uma placa foi então imersa

⁶ Os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) / ESALQ / USP.

rapidamente e uma solução de ácido sulfúrico 10% e metanol, seca e colocada em estufa a 120°C, por 5 min. e então visualizada em cabine de visualização de placas de cromatografia, sob luz ultravioleta de comprimento de 365 nm. Esse procedimento nessa placa teve como objetivo, observar a separação de componentes do extrato pirolenhoso proporcionada pela cromatografia. Uma segunda placa preparada do mesmo modo, foi seca intensamente com auxílio de ventilação forçada com o objetivo de remover o residual dos solventes de desenvolvimento. Após isso, a placa foi então submersa por 5 segundos em caldo de extrato de levedura e sacarose (YES) contendo esporos do fungo *Asperigillus niger*.

O caldo YES com esporos foi obtido de modo semelhante ao inóculo preparado para a avaliação do potencial antifúngico, entretanto substituindo-se a água pelo caldo YES.

A placa após a submersão foi deixada escoar o excesso de caldo e colocada sobre um suporte em um recipiente hermético contendo 1 L de solução de cloreto de sódio a 14%. A solução de cloreto de cálcio dentro do recipiente teve o objetivo de manter a umidade relativa da atmosfera interna do recipiente em equilíbrio a 90%, e assim proporcionar uma condição adequada ao desenvolvimento fúngico. O recipiente contendo a placa e a solução salina foi colocado em uma câmara com controle de temperatura a 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) sem fotoperíodo, por sete dias. A placa foi observada, quanto ao crescimento fúngico, no terceiro e no sétimo dias.

Com base na visualização da placa foi possível identificar a região onde o crescimento não ocorreu, denotando a presença de substância(s) com atividade antifúngica. A partir da distância desta região ao ponto de aplicação foi possível por analogia, identificar na placa, que foi revelada com ácido sulfúrico, a mesma região e, assim, observar a coloração identificativa da presença de alguma substância.

Com a identificação da região do desenvolvimento cromatográfico com atividade antifúngica, 4 outras placas cromatográficas foram preparadas com o extrato pirolenhoso laboratorial e desenvolvidas na cuba, do mesmo modo como o descrito anteriormente, entretanto estas placas não foram imersas após o desenvolvimento cromatográfico nem no ácido nem no caldo YES.

Após o desenvolvimento, cada placa foi bem seca com auxílio de ventilação e a sílica, referente a cada zona nas seis aplicações, foi raspada e reunida em um mesmo tubo teste para a extração dos compostos adsorvidos. O objetivo desta nova

placa foi de obter maior quantidade de compostos presentes em cada zona com potencial antifúngico.

No tubo contendo a sílica da zona de inibição fez-se a extração dos compostos. Para isso, 2 mL de metanol foi adicionado, agitou-se por 2 min. e separou-se o sobrenadante em centrífuga (15 min. à temperatura de 27°C e rotação de 3000 rpm). O extrato obtido foi considerado como uma fração do extrato pirolenhoso representando os compostos presentes na zona de inibição fúngica. O extrato foi filtrado em filtro de seringa de poros de 0,22µm e, uma alíquota de 1600 µL foi coletada, transferida para outro tubo teste, seca a 50°C e redissolvida para 200 µL de metanol grau cromatográfico. O mesmo procedimento descrito foi repetido com o solvente utilizado, para redissolução do material, o acetato de etila grau cromatográfico.

O extrato da zona de inibição obtido com metanol e acetato de etila foi analisado quanto a sua composição por cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massas visando a identificação dos compostos presentes⁷.

⁷ Os procedimentos foram conduzidos no LQCE – Laboratórios Integrados de Química, Celulose e Energia do Departamento de Ciências Florestais / ESALQ / USP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados do balanço de massa e cálculo de rendimentos em carvão e co-produtos obtidos em escala de laboratório (PLO).

Os resultados do balanço de massa são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Balanço de massa das carbonizações

Carbonizações	RGC (%)	RGNC (%)	RGGC (%)
PLO1a	45,1	33,8	21,1
PLO1b	45,9	30,8	23,3
PLO1c	47,4	36,3	16,4
Média	46,1	33,6	20,3
Desvio padrão	1,2	2,8	3,6
C.V.	2,5	8,2	17,5

(PLO) amostra laboratorial, (RGC) rendimento gravimétrico em carvão, (RGNC) rendimento gravimétrico em gases não-condensáveis, (RGGC) rendimento gravimétrico em gases condensáveis e C.V. coeficiente de variação.

A análise de variância foi realizada, levando-se em consideração o pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Com base nessa análise, verificou-se que para os rendimentos de carvão e gases condensáveis não houve variações no sistema (Apêndice A).

4.2 Determinação do pH do extrato pirolenhoso obtido em escala industrial e de laboratório

Os resultados de pH são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos de pH

	Amostra	pH
PLO	1a	2,10
	1b	2,29
	1c	2,24
PIO	2a	2,70
	2b	2,67
	2c	2,66

(PIO) extrato pirolenoso industrial; (PLO) extrato pirolenhoso laboratorial.

Análises comparativas dos dados foram realizadas por meio de ANOVA ($\alpha = 0,05$) seguido do teste de Tukey (Apêndice B). Observou-se que houve diferença significativa entre os pHs com relação ao extrato pirolenhoso obtido na escala de laboratório e na escala industrial. Ambos, PLO e PIO, numericamente apresentavam pH ácidos de 2,21 e 2,68 em média, respectivamente. Segundo a literatura (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2012), um dos métodos de inibição de atividade fúngica é baseado em redução de pH. Assim, essa diferença de pH pode estar influenciando os resultados comparativos da atividade antifúngica entre PLO e PIO.

4.3 Análise organolética do extrato pirolenhoso

Foram observadas alterações de cor nos dois extratos pirolenhosos (laboratorial e industrial) acondicionados em frasco de vidro transparente, nas condições de armazenagem (temperatura ambiente e exposição à luz). Essas alterações não foram percebidas nos extratos acondicionados em frasco âmbar.

Não foram observadas alterações nos aromas dos extratos nas duas condições e nas duas embalagens em questão.

Com relação à separação de fases, verificou-se que o extrato laboratorial sofreu alteração, formando duas fases: uma camada superior de aspecto aquoso e uma camada inferior decantada (alcatrão).

Nenhuma interação com as embalagens de vidro foram percebidas para os dois extratos pirolenhosos.

4.4 Resultados do balanço de massa e cálculo de rendimentos em alcatrão e extrato pirolenhoso destilado obtido em escala industrial (PIO) e laboratorial (PLO)

Os resultados do balanço de massa são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Balanço de massa das destilações

Destilação	RGA (%)	RGLPD (%)
PLO1a	14,09	85,91
PLO1b	13,54	86,46
PLO1c	15,38	84,62
PIO1a	0,58	99,42
PIO1b	0,21	99,79
PIO1c	0,86	99,14

(PIO) extrato pirolenhoso industrial; (PLO) amostra laboratorial, (RGA) rendimento gravimétrico em alcatrão e (RGLD) rendimento gravimétrico do extrato pirolenhoso destilado.

Análises comparativas dos dados foram realizadas por meio de ANOVA ($\alpha = 0,05$) seguido do teste de Tukey. Observou-se que houve diferença significativa entre os processos industrial e laboratorial com relação a rendimentos do alcatrão ou do destilado, com maior teor de alcatrão para o extrato laboratorial (Apêndice C).

4.5 Resultados das análises cromatográficas do extrato pirolenhoso

Em termos gerais, os componentes químicos identificados nos cromatogramas estão muito próximos aos que têm sido relatados na literatura. As análises demonstraram a presença de uma gama de compostos oxigenados, tais como: ácidos carboxílicos, ésteres, éteres e cetonas. Além disso, foram detectados o fenol, guaicol e derivados fenólicos. De forma, geral, a identificação dos constituintes químicos revelou substâncias de estruturas complexas derivadas da degradação química dos constituintes ligno-celulósicos da madeira, também concordantes com referências da literatura especializada (MARTINS et al., 2007; ESTEVES et al., 2008; RATANAPISIT et al., 2009). Segundo Ratanapisit et al. (2009), a presença dos componentes é função da temperatura em que se inicia a degradação da madeira, em geral, seguindo uma sequência que inclui as hemiceluloses, celulose e posteriormente a lignina.

A tabela 4 mostra a maioria dos componentes químicos encontrados no extrato pirolenhoso obtido na pirólise em escala de laboratório (PLO) e industrial (PIO).

Deve-se ressaltar que foram obtidos cromatogramas de todos os três pirolenhosos obtidos em escala de laboratório. A análise desses cromatogramas permitiu observar a ausência de diferenças nos picos dos compostos, considerando os 36 componentes mais representativos detectados. A figura 6 é um exemplo de cromatograma do extrato pirolenhoso à 400°C e em 2,5h, e a figura 7 é de um cromatograma do extrato pirolenhoso industrial.

Nas avaliações, os resultados obtidos se mostram compatíveis com as análises realizadas por Ratanapisit et al. (2009), onde os ácidos e fenóis são dominantes, comparados com outros compostos químicos presentes no extrato pirolenhoso.

Os resultados encontrados na comparação entre os dois tipos de extratos demonstram comportamento diferenciado para o obtido em escala industrial, comparado aos obtidos em laboratório. Os compostos n-hexano, butirolactone, 3-metilfenol (m-Cresol) e 3,4-dimetilfenol, presentes no extrato industrial, não foram encontrados no extrato obtido em laboratório. O oposto ocorreu para os compostos butanediol; 5,9-dodecadieno, 6-10 dimetil; 2-metil, 2-ciclopentanona; ciclopentanona; ciclopropil carbinol; 2-metoxi-3-metilfenol; 1,2-benzenediol (pirocatecol); vanillin lactoside; D-Allose; 4-propil-1,1-difenil; 4-hidroxi, 3,5 dimetoxi benzaldeído; 1,4-hidroxi 3,5-dimetoxifenil etanona e 4-hidroxi 3,5-dimetoxi benzoidrazina.

Figura 6 - Cromatograma produzido nas carbonizações do experimento obtido a 400°C e 2,5h na escala laboratorial. Os números sobre os picos correspondem aos componentes químicos listados na Tabela 4

Figura 7 - Cromatograma produzido nas carbonizações do experimento obtido na escala industrial.

Os números sobre os picos correspondem aos componentes químicos listados na Tabela 4

Tabela 4 - Compostos químicos presentes nos extrato pirolenhosos

Componente Químico	Grupo Experimentais					
	PLO1a	PLO1b	PLO1c	PIO1a	PIO1b	PIO1c
Metanol	1	1	1	1	1	1
Acetato de metila	2	2	2	2	2	2
n-Hexano	nd	nd	nd	3	3	3
Ácido acético	4	4	4	4	4	4
1-Hidroxi, 2-propanona (acetol)	5	5	5	5	5	5
Ácido propanóico	6	6	6	6	6	6
1-hidroxi 2-butanona	7	7	7	7	7	7
Butanediol	8	8	8	nd	nd	nd
3-Furaldeído	9	9	9	9	9	9
5,9-Dodecadien 2-1, 6-10 dimetil	10	10	10	nd	nd	nd
2-metil, 2-ciclopentanona	11	11	11	nd	nd	nd
1-2-furanil etanona	12	12	12	12	12	12
Ciclopentanona	13	13	13	nd	nd	nd
Butirolactone	nd	nd	nd	14	14	14
5-metil, 2-furaldeído (5 metil 2 furancarboxaldeído)	15	15	15	15	15	15
Fenol (ácido carbólico)	16	16	16	16	16	16
Corilon (2-hidroxi 3-metil 2-ciclopentan-1-ona)	17	17	17	17	17	17
3-metilfenol (m-Cresol)	nd	nd	nd	18	18	18
4-metilfenol (p-Cresol)	19	19	19	19	19	19
4-metoxifenol(mequinol)	20	20	20	20	20	20
Ciclopropil carbinol	21	21	21	nd	nd	nd
Maltol	22	22	22	22	22	22
3,4-dimetilfenol	nd	nd	nd	23	23	23
2-metoxi-3-metilfenol	24	24	24	nd	nd	nd
2-metoxi 4-metilfenol	25	25	25	25	25	25
1,2-benzenediol (pirocatecol)	26	26	26	nd	nd	nd
4-etil 2-metoxifenol (p-etilguaiaicol)	27	27	27	27	27	27
2,6-dimetoxifenol	28	28	28	28	28	28
Vanilin lactoside	29	29	29	nd	nd	nd
1,2,4,-trimetoxibenzeno	30	30	30	30	30	30
5-tert-butilpirogallol	31	31	31	31	31	31
D-Allose	32	32	32	nd	nd	nd
4-propil-1,1-difenil	33	33	33	nd	nd	nd
4-hidroxi, 3,5 dimetoxi benzaldeído	34	34	34	nd	nd	nd
1,4-hidroxi 3,5-dimetoxifenil etanona	35	35	35	nd	nd	nd
4-hidroxi 3,5-dimetoxi benzoidrazina	36	36	36	nd	nd	nd

(PIO) amostra da escala industrial, (PLO) amostra laboratorial, (nd) não detectado.

Constatou-se que a amostra de procedência industrial apresentava menor número de componentes, que geralmente estão vinculados ao alcatrão. Desse modo, considerou-se ser menor seu risco de toxicidade, comparado ao obtido em escala laboratorial. Deve-se destacar, no entanto, que o extrato com maior presença de componentes, geralmente vinculados ao alcatrão, pode apresentar maior potencial antifúngico, o que seria o caso do extrato pirolenhoso laboratorial.

Na tabela 5, pode-se ter uma noção do percentual de participação dos compostos.

Tabela 5 - Compostos químicos presentes nos extratos pirolenhosos obtidos da escala laboratorial (PLO) e da escala industrial (PIO) com seus percentuais de participação

N°	Componentes Químicos	Grupo Experimentais					
		PLO1a %Area	PLO1b %Area	PLO1c %Area	PIO1a %Area	PIO1b %Area	PIO1c %Area
1	Metanol	4,68	2,73	0,52	6,80	7,03	6,79
2	Acetato de metila	d	d	0,15	1,56	1,42	1,30
3	n-Hexano	nd	nd	nd	1,00	0,64	0,49
4	Ácido acético	27,68	32,78	33,31	55,42	53,55	54,32
5	1-Hidroxi, 2-propanona (acetol)	d	d	d	1,76	2,25	2,08
6	Ácido propanóico	1,03	1,24	1,29	0,64	0,90	0,81
7	1-hidroxi 2-butanona	0,83	0,91	1,10	1,50	1,22	1,20
8	Butanediol	0,93	1,41	0,41	nd	nd	nd
9	3-Furaldeído	3,94	6,89	9,85	3,19	3,28	3,05
10	5,9-Dodecadien 2-1, 6-10 dimetil	1,07	1,48	1,11	nd	nd	nd
11	2-metil, 2-ciclopentanona	d	d	d	nd	nd	nd
12	1-2-furanil etanona	d	d	d	d	0,81	0,69
13	Ciclopentanona	2,06	1,66	1,72	nd	nd	nd
14	Butirolactone	nd	nd	nd	1,40	1,21	1,42
15	5-metil, 2-furaldeído (5 metil 2 furancarboxaldeído)	1,66	2,45	2,61	1,19	1,37	0,68
16	Fenol (ácido carbólico)	0,82	1,37	1,23	1,72	1,38	2,08
17	Corilon(2-hidroxi 3-metil 2-ciclopentan-1-ona)	3,10	2,90	2,93	2,16	2,03	2,07
18	3-metilfenol (m-Cresol)	nd	nd	nd	0,84	0,51	0,93
19	4-metilfenol (p-Cresol)	1,16	1,37	1,21	0,90	2,05	1,50
20	4-metoxifenol(mequinol)	6,31	6,22	5,98	2,89	2,89	2,87
21	Ciclopropil carbinol	2,71	2,04	1,93	nd	nd	nd
22	Maltol	1,85	1,39	1,41	1,16	1,09	1,29
23	3,4-dimetilfenol	nd	nd	nd	0,62	0,99	0,88
24	2-metoxi-3-metilfenol	0,56	0,59	0,51	nd	nd	nd
25	2-metoxi 4-metilfenol	1,75	1,82	1,72	1,68	1,79	1,82
26	1,2-benzenediol (pirocatecol)	4,69	3,71	3,52	nd	nd	nd
27	4-etil 2-metoxifenol (p-etilguaiaicol)	1,89	1,96	2,73	0,89	0,99	0,97
28	2,6-dimetoxi-fenol	9,79	5,88	6,46	5,87	5,39	5,58
29	Vanilin Lactoside	1,56	1,34	1,04	nd	nd	nd
30	1,2,4,-trimetoxibenzeno	2,05	2,00	2,38	0,64	0,59	0,61
31	5-tert-butilpirogallol	4,02	2,96	4,75	0,63	0,57	0,60
32	D-Allose	2,87	2,89	d	nd	nd	nd
33	4-propil-1,1-difenil	1,16	0,88	0,90	nd	nd	nd
34	4-hidroxi, 3,5 dimetoxi benzaldeído	1,82	1,40	1,25	nd	nd	nd
35	1,4-hidroxi 3,5-dimetoxifenil etanona	1,06	0,80	0,69	nd	nd	nd
36	4-hidroxi 3,5-dimetoxi benzoidrazina	0,69	0,42	0,43	nd	nd	nd

(PIO) amostra da escala industrial, (PLO) amostra laboratorial; (nd) não detectado; (d) detectável, mas com percentuais muito baixos, apenas traços.

Análises comparativas considerando a média da soma de participação dos compostos majoritários presentes nas amostras (item 4.8) obtidos da escala de laboratório (PLO) e em escala industrial (PIO), apresentados na tabela 5, foram realizadas por meio de ANOVA ($\alpha = 0,05$) seguido do teste de Tukey. Observou-se que houve diferença significativa entre os extratos testados com relação a participação dos compostos fracionados, com maiores teores para o laboratorial, o que poderia estar potencializando a ação antifúngica do mesmo.

4.6 Análises da avaliação do potencial antifúngico dos extratos pirolenhoso

Os resultados são apresentados na figura 8 e na tabela 6.

Figura 8 – Curva de inibição do extrato pirolenhoso amostra da escala industrial (PIO) e amostra laboratorial (PLO)

Tabela 6 - Resultados obtidos da análise de inibição.

Tratamento	Dose (µL)	Análise de crescimento radial (mm)			Análise de inibição (%)			Média (mm)	Média (%)
		1	2	3	1	2	3		
PIO	25	20,3	21,8	19,2	30,0	24,8	33,8	20,4	29,5
	50	16,1	16,1	18,0	51,2	51,2	45,5	16,7	49,3
	100	12,2	10,2	13,1	39,0	49,0	34,5	11,8	40,8
	150	7,5	4,3	3,1	78,6	87,7	91,1	5,0	85,8
	200	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
PLO	20	5,0	6,1	6,3	76,4	71,2	70,2	5,8	72,6
	25	3,1	0,0	0,0	84,7	100,0	100,0	1,0	94,9
	30	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	35	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	40	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
FORMOL	2,5	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	5	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	10	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	15	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	17	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	20	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
AGUA	0	23,4	22,8	21,0	*	*	*	22,4	*
	15	22,0	21,1	21,0	*	*	*	21,4	*
	17	19,2	19,1	20,1	*	*	*	19,5	*
	25	20,2	20,0	20,3	*	*	*	20,2	*
	30	21,2	21,0	21,3	*	*	*	21,2	*
	35	20,1	20,3	20,5	*	*	*	20,3	*
	40	19,0	19,2	19,2	*	*	*	19,1	*
	50	19,2	19,2	20,1	*	*	*	19,5	*
	100	19,1	20,0	19,8	*	*	*	19,6	*
	150	20,0	20,3	19,7	*	*	*	20,0	*
	200	20,0	20,2	20,3	*	*	*	20,2	*

(*) Não ocorreu inibição

Por meio do teste realizado pode-se observar que os produtos PIO, PLO e Formol apresentaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 200, 30 e 2,5µL/2

mL, respectivamente. Assim, concluiu-se que o extrato pirolenoso laboratorial apresentou maior inibição que a amostra industrial, mas menor que a solução de formol.

4.7 Identificação e análise da composição química de frações antifúngicas de extrato pirolenhoso

Figura 9 – Placa de Bioautografia observada após 7 dias à esquerda e placa com revelação com solução metanólica de ácido sulfúrico a 10%, à direita

A avaliação antifúngica por bioautografia mostrou que a maioria das frações identificadas são bioativas (figura 9) e na análise cromatográfica associada à espectrometria de massa, GC/MS, identificou quais os compostos majoritários presentes na amostra estavam presentes na fração antifúngica.

Nessa análise qualitativa da composição química por CGMS, os extratos da zona de inibição obtidos com metanol e acetato de etila mostraram os mesmos componentes majoritários que foram: Corilon, Mequinol, 2-metoxi 4-metilfenol, 4-etil 2-metoxifenol, 2,6 – dimetoxifenol, 1,2,4-trimetoxibenzeno e 5-tert-butilpirogallol (tabela 7) (figuras 10 e 11).

Figura 10 - Cromatograma da amostra laboratorial utilizando-se Metanol. Os números sobre os picos correspondem aos componentes químicos listados na Tabela 7

Figura 11 - Cromatograma da amostra laboratorial utilizando-se Acetato de Etila. Os números sobre os picos correspondem aos componentes químicos listados na Tabela 7

Tabela 7 - Frações bioativas presentes nos extratos pirolenhosos

Compostos	PLO_Fracionada Metanol	PLO_Fracionada Acetato de Etila
Corilon (2-hidroxi 3-metil 2-ciclopentan-1-ona)	1	1
Mequinol(4-metoxifenol)	2	2
2-metoxi 4-metifenol	3	3
4-etil 2-metoxifenol (p-etil guaicol)	4	4
2,6-dimetoxifenol	5	5
1,2,4-trimetoxibenzeno	6	6
5-tert-butilpirogolol	7	7

(PLO) amostra laboratorial.

4.8 Potencial do extrato pirolenhoso para aplicação em produtos cosméticos e saneantes

O extrato pirolenhoso obtido em escala de laboratório foi considerado com maior potencial antifúngico, conforme análise descrita no item 4.6 e 4.7.

Para efeito comparativo, foi realizada uma análise qualitativa prévia da presença de componentes tóxicos, baseada em regulamentações pertinentes, como por exemplo, ANVISA (2008c). Alguns dos compostos identificados nos extratos são citados na literatura como potencialmente tóxicos e/ou cancerígenos como é o caso do mequinol, que deveriam ser isolados, na visão da aplicação em produtos cosméticos. Para aplicação em saneantes, a presença desse componente oferece ao extrato pirolenhos laboratorial um potencial para sua utilização, em substituição ao formol. Contudo, uma análise complementar específica quanto à toxicidade do produtos deveria ainda ser realizada.

Seguem, de forma resumida, algumas informações sobre os potenciais ativos encontrados nos extratos:

1) Corilon (2-hidroxi-3-metil 2-ciclopentan-1-ona) – Em termos de informações legais até a data de novembro 1999, a EPA (*Environmental Protection Agency*) tem aprovado um produto insecticida, no caso uma armadilha de barata, que usa esse

ingrediente ativo (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA, 2012). Essa substância não é considerada perigosa pela Regulamentação (EC) No. 1272/2008 e de acordo com a diretiva 67/548/EEC (SIGMA ALDRICH, 2012a).

2) Mequinol (4-metoxifenol) – Pessoas que manipularam essa substância desenvolveram despigmentação na pele (OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH - OSHA, 2012). Ela é utilizada como químico para síntese (MERCK, 2012). Em humanos, a exposição à 4-metoxifenol pode produzir queimadura na pele e olhos (OSHA, 2012). Essa substância aparece na lista juntamente com as substâncias que não podem ser utilizadas em Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. A lista aparece na resolução RDC nº48 onde fica proibido o seu uso em produtos cosméticos das categorias I e II do IARC e outras referências internacionais, classificadas como cancerígenas, mutagênicas ou tóxicas para a reprodução (ANVISA, 2008d).

3) 2-metoxi 4-metifenol – Conhecido pelo seu uso em fragrâncias. Causa irritação na pele, nos olhos e toxicidade aguda na área bucal (SIGMA ALDRICH, 2012b).

4) 4-etil 2-metoxifenol – Conhecido pelo seu uso na produção de aromas em vinhos (RAYNE et al., 2007). Causa irritação nos olhos, vias respiratórias e na pele (HGSPACE, 2012).

5) 2,6-dimetoxifenol – É responsável pelo aroma *smoky* proveniente de produtos a base de pirólise da lignina (CHEMICAL BOOK, 2012a). Substância irritante aos olhos, vias respiratórias e pele (SIGMA ALDRICH, 2012c).

6) 1,2,4-trimetoxibenzeno – É utilizado como inseticida, repelente de insetos para cahorros e gatos. Substância que pode causar irritação nas vias respiratórias, pele, olhos e no sistema digestório (CHEMICAL BOOK, 2012b).

7) 5-tert-butilpirogallol – Causa irritação nos olhos, vias respiratórias e na pele, podendo ocasionar câncer (CHEMICAL BOOK, 2012c).

Com relação à estabilidade do extrato pirolenhoso, estudos mais completos devem ser ainda efetuados, visto que os resultados das avaliações organolépticas aqui realizadas, mesmo que consideradas parciais, indicaram a necessidade de cuidados especiais para uma eventual aplicação num produto final (cosmético ou saneante) devido a instabilidade de cor, principalmente à luz, o odor característico e o pH ácido.

Por ser um produto relativamente novo e com produção industrial ainda tímida, não existem muitos estudos sobre o impacto ambiental gerado pela utilização do extrato pirolenhoso, sobretudo em relação à presença de alcatrão ou produtos dele derivados em sua composição, levando a questionamentos quanto à eventuais malefícios que possam trazer às plantas e mesmo ao homem. Pode-se mencionar, por exemplo, a eventual presença de compostos derivados do alcatrão que seriam cancerígenos. No entanto, especialistas apontam que grande parte do alcatrão pode ser retirado do extrato pirolenhoso, se for conduzida a destilação do composto (HÜEBLIN, 2001).

No presente trabalho, foi observada uma potencial aplicação do extrato pirolenhoso, principalmente como agente antifúngico e possível conservante. Na eventualidade da aplicação em produtos cosméticos e saneantes, devem ser aplicadas medidas para se evitar a presença de ingredientes avaliados como tóxicos/cancerígenos e possíveis problemas de instabilidade de cor e odor no produto final.

5 CONCLUSÕES

- As análises dos extratos pirolenhosos obtidos da madeira de eucalipto demonstraram a presença de uma gama de compostos oxigenados, tais como ácidos carboxílicos, ésteres, éteres e cetonas, além de fenol, guaicol e derivados fenólicos.

- Pode-se verificar que o extrato pirolenhoso obtido em escala industrial, em termos qualitativos, apresenta um menor número de componentes químicos ligados ao alcatrão.

- Quando os extratos pirolenhosos laboratorial e industrial são submetidos a processos de destilação simples, seus rendimentos de alcatrão apresentam diferenças significativas, com maior teor para o laboratorial.

- Os extratos pirolenhosos obtidos de escala laboratorial e industrial apresentam diferença significativa de pH, com menor valor para o laboratorial, podendo ser este um dos aspectos a justificar a diferença de atividade antifúngica entre eles.

- Na análise organoléptica das amostras laboratoriais e industriais foram observadas alterações na cor quando expostas a luz.

- Com relação à composição química do extrato pirolenhoso, deve-se ressaltar um comportamento diferenciado para o obtido em escala industrial, comparado ao obtido em laboratório. Os compostos n-hexano, butirolactone, 3-metilfenol (m-Cresol) e 3,4-dimetilfenol, presentes no extrato industrial, não foram encontrados no extrato obtido em escala laboratorial. O oposto ocorreu para os compostos butanediol; 5,9-dodecadieno, 6-10 dimetil; 2-metil, 2-ciclopentanona; ciclopentanona; ciclopropil carbinol; 2-metoxi-3-metilfenol; 1,2-benzenediol (pirocatecol); vanillin lactoside; D-Allose; 4-propil-1,1-difenil; 4-hidroxi, 3,5 dimetoxi benzaldeído; 1,4-hidroxi 3,5-dimetoxifenil etanona e 4-hidroxi 3,5-dimetoxi benzoidrazina.

- O produto que apresentou o melhor potencial antifúngico foi o extrato pirolenhoso obtido de escala laboratorial. A princípio, os compostos com um maior número de componentes ligados ao alcatrão foram considerados como sendo responsáveis pelo maior potencial de ação antifúngica.

- Pela análise da composição química de frações antifúngicas de extrato pirolenhoso, os potenciais ativos da amostra a serem considerados foram: corilon,

mequinol, 2-metoxi 4-metilfenol, 4-etil 2-metoxifenol, 2,6 – dimetoxifenol, 1,2,4-trimetoxibenzeno e 5-tert-butilpirogallol.

- Observou-se que houve diferença significativa entre os pirolenhosos industrial e laboratorial com relação a participação das frações antifúngicas dos compostos fracionados, com maior teor para o laboratorial.

- Em todos os extratos estudados, verificam-se componentes potencialmente tóxicos e suas presenças conferem restrições para suas utilizações em produtos cosméticos, sugerindo suas remoções, visando tal destinação.

- A alternativa de uso do extrato para aplicação em saneantes se mostra promissora, principalmente para o extrato pirolenhoso laboratorial.

REFERÊNCIAS

ADITIVOS E INGREDIENTES. Conservação de alimentos por aditivos químicos. **Revista Aditivos e Ingredientes**. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/125.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 25 ago. 2008a.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 35, de 3 de junho de 2008**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 14 out. 2008b.

_____. **Legislação em Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 26 out. 2008c.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 48, de 16 de março de 2006**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 14 out. 2008d.

_____. **Decreto nº 79.094 - Lei no 6.360: conceitos técnicos**. 5 de janeiro de 1977. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 24 mar. 2012.

ALVES, H.S. **Sequenciamento e análise do genoma cloroplastidial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*)**. 2005. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

ASSIS, J.B. de. Política florestal em Minas Gerais. In: MELLO, M.G. (Org.). **Biomassa, energia dos trópicos em Minas Gerais**. Belo Horizonte: LabMídia; FAFICH, 2001. p. 115-132.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS DE LIMPEZA E AFINS. **Boletim nº8, outubro de 2011 a janeiro de 2012**. Disponível em: <<http://www.abipla.org.br/novo/noticia/ft173.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTA PLANTADA. **Anuário Estatístico ABRAF 2010 - Ano base 2009**. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/>>. Acesso em: 16 jan. 2011.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE AGRICULTURA NATURAL. **Produção e padronização de extratos pirolenhosos da APAN**. São Paulo, 2003. 11p.

AUBIN, H.; ROY, C. Study on the corrosiveness of wood pyrolysis oils. **Fuel Science & Technology International**, Canadá, v. 8, p. 77–86, 1980.

BARCELLOS, D.C. **Forno container para produção de carvão vegetal: desempenho, perfil térmico e controle da poluição**. 2002. 72p. Tese (M.S. em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

BAUSIL. Disponível em: <<http://www.bausil.com.br/>>. Acesso em: 26 out. 2009.

BRAGA, J.L.P. **Estabilidade fenotípica de clone de *eucalyptus urograndis*, na fazenda Bom Jardim - Aparecida - SP.** 2008. 16p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BRITISH SOCIETY FOR THE HISTORY OF SCIENCE. **Archives of the british chemical industry 1750-1914:** a handlist. London, 1988. Não paginado. (BSHS. Monograph, 6).

BRITO, J.O. Princípios de produção e utilização de carvão vegetal de madeira. **Documentos Florestais**, Piracicaba, v. 9. p. 1-19, maio 1990.

_____. Carbonização da Madeira e Produtos Obtidos. **INFOTEC – Pró-Carvão**, Piracicaba, ano 1, n. 1, p. 1-2, 2000.

CAMPOS, A.D. **Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola.** Pelotas: Embrapa 2007. 8 p. (Circular Técnica, nº 65).

CARVALHO, V.L.G.; PACHIONE V.M. Controle microbiológico em cosméticos. **Aerosol Cosmet**, São Paulo, v. 36, p. 10-12, 1989.

CHEMICAL BOOK. **2,6 Dimethoxyphenol.** Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=2,6-dimethoxyphenol>. Acesso em: 14 mar. 2012a.

_____. **1,2,4-Trimethoxybenzene.** Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB4210933_EN.htm>. Acesso em: 14 mar. 2012b.

_____. **5-tert Butylpyrogallol.** Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2113562.htm>. Acesso em: 14 mar. 2012c.

CHORILLI, M.; BANANELLI, M.G.; JUSFAO, C.D.; BARBOSA, A.S.; MONTEIRO, M.; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade microbiológico de formulações cosméticas manipuladas indicadas para a área dos olhos, **Revista da Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos**, Colômbia, v. 17, n. 3, p. 33-43, 2007.

COMISSÃO EUROPÉIA. **DIRETIVA DE COSMÉTICOS 76/768 EEC.** Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?mode=dbl&lang=en&ihtmlang=en&lng1=en,pt&lng2=bg,cs,d a,de,el,en,es,et,fi,fr,hu,it,lt,lv,nl,pl,pt,ro,sk,sl,sv,&val=402442:cs&page=>>>. Acesso em: 16 jan. 2011.

CORAZZA, S. Especial naturais & orgânicos/evolução natural. **Revista Cosmética**, São Paulo, v. 13, n. 89, p. 76, 2006.

CORBETT R.J. Preservation of cosmetics and toiletries: microbiological overview. **Parfüm Kosmet**, Heidelberg, v. 73, n. 1, p. 22-27, 1992.

COSMÉTICOS E PERFUMES. Conservantes utilizados em cosméticos. **Revista Cosméticos e Perfumes**. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n%2044.pdf>. Acesso em: 13 maio 2010.

COSMETICS & TOILETRIES. Cosméticos Orgânicos e Naturais. **Revista Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.19, n. 4, p. 96, 2007.

COUTO, L.; MÜLLER, M.D. Florestas energéticas no Brasil. In: CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. **Biomassa para energia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2008. p. 93-110.

CRISTALE, J.; SILVA, F.S.; MARCHI, M.R.R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, São Paulo, v.33, n.4, p. 69-71, 2008.

DA COSTA, A.F.; DA SILVA, G.F.; ESCUDERO, M.C. Estudo comparativo entre produtos químicos preservantes e licores pirolenhosos na inibição de fungos emboloradores. **Brasil Florestal**, v.21, p. 23-29, 2003.

DE MELO, R.M.; SILVA, R. M.; DE BARROS, R.O.M.; MAZORCHE, R.M.; DE QUEIROZ, V.T.; POVOA, H.C.C. Estudo da atividade antimicrobiana do licor pirolenhoso em bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia*. **Revista Científica da FAMINAS**, Muriaé, v. 3, n. 1, supl. 1, p. 47, 2007.

DINIZ, J. **Conversão térmica de casca de arroz a baixa temperatura**: produção de bioóleo e resíduo silício-carbono adsorvente. 2005. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

ECOPIROL: versão 2.0, 02 de maio de 2009. Disponível em: <<http://ecopirol.com/glossario.htm>>. Acesso em: 26 out. 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticides**: Regulating Pesticides. Disponível em: <http://www.epa.gov/opppdpd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_004049.htm>. Acesso em: 14 mar. 2012.

ESTEVES, B.; GRAÇA, J.; PEREIRA, H. Extractive composition and summative chemical analysis of thermally treated eucalypt Wood. **Holzforschung**, Berlin, v.62, n.3, p.344-351, 2008.

FENGEL, D. E WEGENER, D. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. New York, USA: Walter de Gruyter and Co., Berlim, 1984, 613 p..

FOELKEL, E.. Obtenção de Alcatrão/Creosoto a partir da Madeira dos Eucaliptos. **Eucalyptus Online Book & Newsletter**. Disponível em:

<http://www.eucalyptus.com.br/newspt_mar10.html#sete>. Acesso em: 18 mar. 2012.

GLOBO RURAL. Regras de uso do ácido pirolenhoso-Reportagem. 31 de maio de 2009. Disponível em :< www.globo.com/globorural>. Acesso em: 13 jan. 2011.

HGSPACE. **MSDS – Material Safety Datasheet**. Disponível em: <http://hgspace.com/chemical-dictionary/msds/cas/a/2785-89-9.html>. Acesso em: 14 de março de 2012.

HOUSEHOLD & COSMÉTICOS. Notícias de Mercado. **Revista Household & Cosméticos**. 22 de outubro de 2009. Disponível em: <http://www.freedom.inf.br/notasDetalhe.asp?IdNota=2704>. Acesso em: 21 de outubro de 2009.

HÜEBLIN, H. J. **Modelo para a aplicação da metodologia Zeri. Sistema de aproveitamento integral da biomassa de árvores de reflorestamento**. 2001. 139p.Dissertação (Mestrado em Tecnologia) - Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná , Paraná, 2001.

LIMA, A.L.**Uso de EDTA e de feijão-de-porco micorrizado em solo contaminado por metais pesados e boro**. 2008. 80p .Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas – IAC. Campinas, 2008.

LOO, A.Y., JAIN, K., DARA, I. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyrolytic acid, *Rhizophora apiculata*. **Food Chemistry**. Malásia, v.107, n.3, p.1151-1160, 2008.

MARTINS, A.F.; DINIZ, J., STAHL, J.A.; CARDOSO, A.L. Caracterização dos produtos líquidos e do carvão de pirólise de serragem de eucalipto. **Química Nova**. São Paulo, v.30, n.4, p.873-878, 2007.

MEEPAGALA, K.M.; STURTZ, G.; WEDGE, D.E. Antifungal Constituents of the Essential Oil Fraction of *Artemisia dracunculus* L.Var.*dracunculus*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6989-6992, 2002.

MELLO, A.F.S.; AMORIM, L.; FONSECA, S.A. Uso de óleo de nim e licor pirolenhoso no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* “in-vitro”. In: XXV CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2002. Espírito Santo do Pinhal. **Summa Phytopathologica**, Espírito Santo do Pinhal, v.28, p.2-8, 2002.

MERCK. **FISPQ- Ficha de Segurança de Produtos Químicos**. Disponível em:<www.merck-chemicals.kr/.../ViewProductDocume>. Acesso em: 14 mar. 2012.

MINISTÉRIO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº64**, Publicado no Diário Oficial da União de 19/12/2008, Seção 1, p.21. 18 dez. 2008. Disponível em: <www.abef.com.br/uba/arquivos/instrucao_normativa_n_64.pdf>. Acesso em: 7 jan. 2011.

_____. **Instrução Normativa Nº 25**. Publicado no Diário Oficial da União de 28/07/2009, Seção 1 , p. 20, 23 jul. 2009.

OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Occupational Safety and Health Guideline for 4-methoxyphenol** .United States Department of Labor. Disponível em: <<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/4-methoxyphenol/recognition.html>>. Acesso em: 14 mar.2012.

ORTH D.S. Evaluation of preservatives in cosmetic products. In: KABARA JJ. **Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.403-421.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Paraná, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PARKER M.S. Design and assessment of preservative systems for cosmetics. In: KABARA JJ. **Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 1984, p.389-401.

PICCOLI, H.H. **Determinação do comportamento tintorial de corantes naturais em substrato de algodão**. 2008. 189 p.Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, 2008.

PIMENTA, A.S, BAYONA, J.M. RAMÓN, T.G.& CÁNOVAS, A.M.S. Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of liquid products from pyrolysis of Eucalyptus grandis Wood. **Environmental Contamination and Toxicology**, USA, v.38, n.2, p. 169-175, 2000.

PINTO,A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n. 1, p.45-61, 2002.

QUADROS C.L.Produção de Carvão Vegetal, In: MASSAMBANI, O., **Coletânea de Respostas Técnicas**, São Paulo: USP, 2005, p.582-607.

QUÍMICA E DERIVADOS. Perspectivas 2011 – Saneantes. **Revista Química e Derivados**. São Paulo, n.505, p.2-3. 2011. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/index.php?sessao=reportagem&id=856&codigo_revis=505>. Acesso em: 2 abr. 2012.

RATANAPISIT,J.;APIRAKSAKUL,S.;RERNGNARNG,A;CHUNGSIRIPORN,J.;BUNYAKARN,C. Preliminary evaluation od production and characterization of wood vinegar from rubberwood. **Songklanakarín J.Sci.Technol**. Tailândia, v.31, n.3, p. 343-349, 2009.

RAYNE, S.; EGGERS, N.J. Quantitative determination of 4-ethylphenol and 4-ethyl-2-methoxyphenol in wines by a stable isotope dilution assay. **Journal of Chromatography A**, v.1167, n. 2, p.195-201, 2007.

ROSSI, T. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade de São Paulo – ESALQ / USP. Piracicaba, São Paulo, p.21-22, 39-40, 2009. Acesso restrito devido a processo de patente.

SECRETARIA DE APOIO RURAL E COOPERATIVISMO. **Instrução Normativa Nº 10, de 28 de outubro de 2004**. Diário Oficial. Seção 1 . n.212, quinta-feira, 4 de novembro de 2004 1 7 ISSN 1677-7042.

SIGMA ALDRICH. **Material Safety Datasheet – MSDS - 3-Methyl-2-cyclopenten-1-one**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w343502?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 14 mar.2012a.

_____. **Material Safety Data Sheet – MSDS - 2-Dimethoxy 4-methylphenol**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>>. Acesso em: 26 mar. 2012b.

_____. **Material Safety Data Sheet – MSDS - 2,6-Dimethoxyphenol**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d135550?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 14 mar. 2012c.

SILVA, P.H.M.; BRITO, J.O.; SILVA JR., F.G. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 85-89, 2006.

SIPIILÄ, K., KUOPPALA, E., FAGERNÄS, L. & OASMAA, A. Characterisation of biomassbased flash pyrolysis oils. **Biomass and Bioenergy**, Finlândia, v. 14, n.2, p. 103–113, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Fatos e Números do Brasil Florestal**. 2008. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br>>. Acesso em: 16 jan.2011.

VILELA, G. R.; DE ALMEIDA, G.S. ; D'ARCEA, M.A.B.R. ; MORAES, M.H.D. ; BRITO, J.O.; DA SILVA, M.F.DAS G.F. ; SILVA, S.C.; PIEDADE, S.M.S.; CALORIDOMINGUES, M.A. ; DA GLORIA, E.M. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, vol. 45, p.108-111, 2009.

APÊNDICES

APÊNCIDE A – Análise estatística

Os dados de rendimentos gravimétricos em carvão e gases foram submetidos à análise estatística com o intuito de verificar se havia variações no sistema. A realização da análise de variância foi condicionada à adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

Obs	REPETICAO	RENDCARVAO	RENDPIROLENHOSO	RENDGASES
1	1	0.45086	0.33783	0.21131
2	1	0.45932	0.30755	0.23313
3	1	0.47388	0.36251	0.16360

Análise de Variância

Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

The UNIVARIATE Procedure Variable: RENDCARVAO

Moments			
N	3	Sum Weights	3
Mean	0.46135426	Sum Observations	1.38406278
Std Deviation	0.01164558	Variance	0.00013562
Skewness	0.761822	Kurtosis	.
Uncorrected SS	0.6388145	Corrected SS	0.00027124
Coeff Variation	2.52421671	Std Error Mean	0.00672358

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.461354	Std Deviation	0.01165
Median	0.459321	Variance	0.0001356
Mode	.	Range	0.02302
		Interquartile Range	0.02302

Tests for Location: Mu0=0				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	68.61736	Pr > t	0.0002
Sign	M	1.5	Pr >= M	0.2500
Signed Rank	S	3	Pr >= S	0.2500

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.977131	Pr < W	0.7101
Kolmogorov-Smirnov	D	0.235977	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.033532	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.215119	Pr > A-Sq	>0.2500

Análise de Variância

Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

The UNIVARIATE Procedure Variable: RENDPIROLENHOSO

Moments			
N	3	Sum Weights	3
Mean	0.33596745	Sum Observations	1.00790236
Std Deviation	0.02752767	Variance	0.00075777
Skewness	-0.3036903	Kurtosis	.
Uncorrected SS	0.34013793	Corrected SS	0.00151554
Coeff Variation	8.19355173	Std Error Mean	0.01589311

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.335967	Std Deviation	0.02753
Median	0.337834	Variance	0.0007578
Mode	.	Range	0.05496
		Interquartile Range	0.05496

Tests for Location: Mu0=0				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	21.13919	Pr > t	0.0022
Sign	M	1.5	Pr >= M	0.2500
Signed Rank	S	3	Pr >= S	0.2500

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.996553	Pr < W	0.8878
Kolmogorov-Smirnov	D	0.193694	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.028754	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.193333	Pr > A-Sq	>0.2500

Análise de Variância

Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

The UNIVARIATE Procedure Variable: RENDGASES

Moments			
N	3	Sum Weights	3
Mean	0.20267829	Sum Observations	0.60803487
Std Deviation	0.03555526	Variance	0.00126418
Skewness	-1.0277452	Kurtosis	.
Uncorrected SS	0.12576382	Corrected SS	0.00252835
Coeff Variation	17.5427074	Std Error Mean	0.02052784

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.202678	Std Deviation	0.03556
Median	0.211307	Variance	0.00126
Mode	.	Range	0.06952
		Interquartile Range	0.06952

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	9.873338	Pr > t	0.0101
Sign	M	1.5	Pr >= M	0.2500
Signed Rank	S	3	Pr >= S	0.2500

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.95583	Pr < W	0.5956
Kolmogorov-Smirnov	D	0.26254	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.038772	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.239259	Pr > A-Sq	>0.2500

APÊNCIDE B – Análise estatística (ANOVA) e teste de Tukey

Análises comparativas dos dados foram realizadas por meio de ANOVA ($\alpha = 0,05$) seguido do teste de Tukey para os dados de pH

A realização da análise de variância foi condicionada à adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

Obs	REPETICAO	PH
1	PLO	2.10
2	PLO	2.29
3	PLO	2.24
4	PIO	2.70
5	PIO	2.67
6	PIO	2.66

Análise de Variância

Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

The UNIVARIATE Procedure - Variable: PH

Moments			
N	6	Sum Weights	6
Mean	2.44333333	Sum Observations	14.66
Std Deviation	0.26341349	Variance	0.06938667
Skewness	-0.2258128	Kurtosis	-2.5656265
Uncorrected SS	36.1662	Corrected SS	0.34693333
Coeff Variation	10.7809068	Std Error Mean	0.10753811

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	2.443333	Std Deviation	0.26341
Median	2.475000	Variance	0.06939
Mode	.	Range	0.60000
		Interquartile Range	0.43000

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	22.72063	Pr > t	<.0001
Sign	M	3	Pr >= M	0.0313
Signed Rank	S	10.5	Pr >= S	0.0313

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.837841	Pr < W	0.1251
Kolmogorov-Smirnov	D	0.294614	Pr > D	0.0987
Cramer-von Mises	W-Sq	0.087909	Pr > W-Sq	0.1337
Anderson-Darling	A-Sq	0.510112	Pr > A-Sq	0.1180

Análise de homogeneidade da variância

The TRANSREG Procedure

Transformation Information for BoxCox(PH)				
Lambda		R-Square	Log Like	
-3.00		0.88	13.40822	
-2.75		0.89	13.56675	
-2.50		0.89	13.72474	
-2.25		0.90	13.88216	
-2.00		0.90	14.03897	
-1.75		0.90	14.19514	
-1.50		0.91	14.35063	
-1.25		0.91	14.50538	
-1.00		0.92	14.65936	
-0.75		0.92	14.81250	
-0.50		0.92	14.96474	
-0.25		0.93	15.11602	*
0.00		0.93	15.26626	*
0.25		0.93	15.41539	*
0.50		0.94	15.56333	*
0.75		0.94	15.70997	*
1.00	+	0.94	15.85522	*
1.25		0.94	15.99896	*
1.50		0.95	16.14108	*
1.75		0.95	16.28145	*
2.00		0.95	16.41993	*
2.25		0.95	16.55637	*
2.50		0.96	16.69061	*
2.75		0.96	16.82247	*
3.00		0.96	16.95177	<
< - Best Lambda * - Confidence Interval + - Convenient Lambda				

TRANSREG Univariate Algorithm Iteration History for BoxCox(PH)					
Iteration Number	Average Change	Maximum Change	R-Square	Criterion Change	Note
1	0.00000	0.00000	0.95936		Converged

Algorithm converged.

Análise da variância – Teste F

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
REPETICAO	2	PIO PLO

Number of observations	6
------------------------	---

Dependent Variable: PH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.32666667	0.32666667	64.47	0.0013
Error	4	0.02026667	0.00506667		
Corrected Total	5	0.34693333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PH Mean
0.941583	2.913255	0.071181	2.443333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REPETICAO	1	0.32666667	0.32666667	64.47	0.0013

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REPETICAO	1	0.32666667	0.32666667	64.47	0.0013

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for PH

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	0.005067
Critical Value of Studentized Range	3.92649
Minimum Significant Difference	0.1614

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	REPETICAO
A	2.67667	3	PIO
B	2.21000	3	PLO

APÊNCIDE C – Análise estatística (ANOVA) e teste de Tukey

Análises comparativas dos dados foram realizadas por meio de ANOVA ($\alpha = 0,05$) seguido do teste de Tukey para os resultados do balanço de massa e cálculo de rendimentos em alcatrão e extrato pirolenhoso destilado obtido em escala industrial (PIO) e laboratorial (PLO).

A realização da análise de variância foi condicionada à adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

Obs	REPETICAO	ALCATRAO	LPD
1	PLI	0.5818	99.42
2	PLI	0.2050	99.79
3	PLI	0.8644	99.14
4	PLO	14.0900	85.91
5	PLO	13.5400	86.46
6	PLO	15.3800	84.62

Análise de Variância

Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

The UNIVARIATE Procedure - Variable: ALCATRAO

Moments			
N	6	Sum Weights	6
Mean	7.44354604	Sum Observations	44.6612762
Std Deviation	7.57751433	Variance	57.4187234
Skewness	0.02273451	Kurtosis	-3.2486456
Uncorrected SS	619.531882	Corrected SS	287.093617
Coeff Variation	101.799791	Std Error Mean	3.09350727

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	7.443546	Std Deviation	7.57751
Median	7.202205	Variance	57.41872
Mode	.	Range	15.17498
		Interquartile Range	13.50815

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	2.406183	Pr > t 	0.0612
Sign	M	3	Pr >= M 	0.0313
Signed Rank	S	10.5	Pr >= S 	0.0313

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.749372	Pr < W	0.0196
Kolmogorov-Smirnov	D	0.30737	Pr > D	0.0753
Cramer-von Mises	W-Sq	0.126264	Pr > W-Sq	0.0377
Anderson-Darling	A-Sq	0.743396	Pr > A-Sq	0.0241

Análise de homogeneidade da variância
The TRANSREG Procedure

Transformation Information for BoxCox(ALCATRAO)				
Lambda		R-Square	Log Like	
-3.00		0.23	-39.2342	
-2.75		0.24	-35.8941	
-2.50		0.25	-32.5838	
-2.25		0.27	-29.3059	
-2.00		0.30	-26.0637	
-1.75		0.33	-22.8604	
-1.50		0.38	-19.6996	
-1.25		0.45	-16.5852	
-1.00		0.54	-13.5212	
-0.75		0.65	-10.5119	
-0.50		0.77	-7.5620	
-0.25		0.87	-4.6777	
0.00		0.94	-1.8762	
0.25		0.98	0.7643	
0.50		0.99	2.8771	*
0.75		0.99	3.4571	<
1.00	+	0.99	2.0750	*
1.25		0.99	-0.2289	
1.50		0.99	-2.7582	
1.75		0.98	-5.3322	
2.00		0.98	-7.9153	
2.25		0.97	-10.5005	
2.50		0.96	-13.0866	
2.75		0.96	-15.6733	
3.00		0.95	-18.2606	
< - Best Lambda * - Confidence Interval + - Convenient Lambda				

TRANSREG Univariate Algorithm Iteration History for BoxCox(ALCATRAO)					
Iteration Number	Average Change	Maximum Change	R-Square	Criterion Change	Note
1	0.00000	0.00000	0.99357		Converged

Algorithm converged.

Análise da variância – Teste F

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
REPETICA0	2	PLI PLO

Number of observations	6
------------------------	---

Dependent Variable: ALCATRAO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	285.0906722	285.0906722	569.34	<.0001
Error	4	2.0029448	0.5007362		
Corrected Total	5	287.0936169			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALCATRAO Mean
0.993023	9.506587	0.707627	7.443546

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REPETICA0	1	285.0906722	285.0906722	569.34	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REPETICA0	1	285.0906722	285.0906722	569.34	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for ALCATRAO

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	0.500736
Critical Value of Studentized Range	3.92649
Minimum Significant Difference	1.6042

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	REPETICAO
A	14.3367	3	PLO
B	0.5504	3	PLI

APÊNCIDE D – Análise estatística (ANOVA) e teste de Tukey

Análises comparativas dos dados foram realizadas por meio de ANOVA ($\alpha = 0,05$) seguido do teste de Tukey para as médias das participações nos extratos pirolenhosos obtidos da escala de laboratório (PLO) e em escala industrial (PIO)

A realização da análise de variância foi condicionada à adequação do pressuposto de normalidade da distribuição, que foi verificada mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos ao programa estatístico SAS, Statistical Analysis System, versão 9.0.

Obs	REPETICAO	PARTICIPACAO
1	PLO	22.51
2	PLO	25.74
3	PLO	27.72
4	PIO	13.08
5	PIO	12.46
6	PIO	12.70

Análise de Variância

Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

The UNIVARIATE Procedure - Variable: PARTICIPACAO

Moments			
N	6	Sum Weights	6
Mean	19.035	Sum Observations	114.21
Std Deviation	7.08924185	Variance	50.25735
Skewness	0.20953398	Kurtosis	-2.7598234
Uncorrected SS	2425.2741	Corrected SS	251.28675
Coeff Variation	37.2431933	Std Error Mean	2.89417087

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	19.03500	Std Deviation	7.08924
Median	17.79500	Variance	50.25735
Mode	.	Range	15.26000
		Interquartile Range	13.04000

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	6.577013	Pr > t	0.0012
Sign	M	3	Pr >= M	0.0313
Signed Rank	S	10.5	Pr >= S	0.0313

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.814279	Pr < W	0.0787
Kolmogorov-Smirnov	D	0.299547	Pr > D	0.0897
Cramer-von Mises	W-Sq	0.091252	Pr > W-Sq	0.1198
Anderson-Darling	A-Sq	0.547431	Pr > A-Sq	0.0921

Análise da variância – Teste F

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
REPETICAO	2	PIO PLO

Number of observations	6
------------------------	---

Class Level Information		
Class	Levels	Values
PROCESSO	2	PLI PLO

Number of observations	42
------------------------	----

Dependent Variable: PARTICIPACAO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	237.2588167	237.2588167	67.65	0.0012
Error	4	14.0279333	3.5069833		
Corrected Total	5	251.2867500			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PARTICIPACAO Mean
0.944176	9.838162	1.872694	19.03500

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REPETICAO	1	237.2588167	237.2588167	67.65	0.0012

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REPETICAO	1	237.2588167	237.2588167	67.65	0.0012

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for PARTICIPACAO

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	3.506983
Critical Value of Studentized Range	3.92649
Minimum Significant Difference	4.2453

Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	REPETICAO
A	25.323	3	PLO
B	12.747	3	PIO

ANEXOS

ANEXO A - LISTA DE SUBSTÂNCIAS DE AÇÃO CONSERVANTE PERMITIDAS

título: Resolução RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001

ementa: Estabelece a Lista de Substâncias de Ação Conservantes para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 12 de setembro de 2001

órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

alcance do ato: federal - Brasil

área de atuação: Cosméticos

relacionamento(s):

revoga:

☐ Erro! A referência de hyperlink não é válida.

Resolução RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001

Estabelece a Lista de Substâncias de Ação Conservantes para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, em reunião realizada em 5 de setembro de 2001,

considerando que a Vigilância Sanitária tem como missão precípua a prevenção de agravos à saúde, a ação reguladora de garantia de qualidade de produtos e serviços que inclui a aprovação de normas e suas atualizações, bem como a fiscalização de sua aplicação;

considerando a necessidade de atualizar as Listas de Substâncias constantes da Resolução 79/00, permitidas para uso em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e outros com abrangência neste contexto, com base na Lei 6.360/76 e seu Regulamento, Decreto 79.094/77 e na Resolução GMC nº 54/99 - Mecanismo de Periodicidade Para Atualização das Listas de Substâncias;

considerando a importância de compatibilizar os regulamentos nacionais com os instrumentos harmonizados no âmbito do Mercosul, especificamente a Resolução GMC nº 72/00 - Lista de Substâncias de Ação Conservante Para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes;

considerando que a legislação sanitária vigente se aplica a produtos nacionais, provenientes dos Estados Partes do Mercosul e de outros países;

adotou a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art.1º Aprovar a Lista de Conservantes Permitidos Para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, que consta do Anexo desta Resolução.

Art. 2º Revogar o Anexo II da Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000.

Art . 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

GONZALO VECINA NETO

ANEXO

LISTA DE SUBSTÂNCIAS DE AÇÃO CONSERVANTE PERMITIDAS PARA PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL, COSMÉTICOS E PERFUMES

1. CONSERVANTES : São substâncias adicionadas aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes com a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações causados por microorganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto.

2. As substâncias com o símbolo (+) também podem ser adicionadas à estes produtos em concentrações outras das listadas abaixo, com a finalidade aparente específica diferente à da conservação do produto, como por exemplo: desodorante, anticaspa, etc.

3. Existem outras substâncias usadas em formulações de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes que também possuem ação conservante nestes produtos, como por exemplo: muitos óleos essenciais e alguns álcoois. Estas substâncias não estão incluídas nesta lista.

4. Para fins desta lista:

`SAIS` significa: sais dos cátions de sódio, potássio, magnésio, amônio e etanolaminas; sais dos ânions: cloreto, brometo, sulfato e acetato.

`ESTERES` significa: ésteres de metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila e fenila.

5. ASSOCIAÇÕES:

É permitida a associação de substâncias conservantes obedecidos seus limites individuais.

Em casos especiais, quando houver necessidade de utilizar-se uma concentração que ultrapasse os valores individuais estipulados na lista, a empresa deverá apresentar documentação técnico-científica justificando o seu uso.

. Lista de Substâncias de Ação Conservante Permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

Nº ORD	Substância (NOME INCI)	MÁXIMA CONCENTRAÇÃO AUTORIZADA	LIMITAÇÕES	CONDIÇÕES DE USO E ADVERTÊNCIAS
1	Ácido benzóico, seus sais e ésteres (+) (BENZOIC ACID, salts e esters)	0,5% (expresso como ácido)	.	.
2	Ácido propiônico e seus sais (+) (PROPIONIC ACID e salts)	2,0% (expresso como ácido)	.	.
3	Ácido salicílico e seus sais (+) (SALICYLIC ACID e salts)	0,5% (expresso como ácido)	Proibido em crianças com menos de 3 anos de idade, exceto para shampoos.	Não usar em crianças com menos de 3 anos de idade.
4	Ácido sórbico e seus sais (+) (SORBIC ACID e salts)	0,6% (expresso como ácido)	.	.
5	Formaldeído e paraformaldeído (+) (FORMALDEHYDE e PARAFORMALDEHYDE)	0,1% (em produtos de higiene oral) 0,2% (outros produtos não destinados à higiene oral). (expresso como formaldeído livre)	Proibido em aerossóis	Contém formaldeído (somente para concentrações superiores a 0,05% no produto final)
6	Bifenil-2-ol (o-fenilfenol) e seus sais (+) (O-PHENYLPHENOL e salts)	0,2% (expresso como fenol)	.	.
7	Piritionato de zinco (+) (ZINC PYRITHIONE)	0,5%	Somente em produtos de breve contato com a pele e cabelo. Proibido em produtos de higiene oral.	.
8	Sulfitos e Bisulfitos inorgânicos (+) (AMMONIUM)	0,2% (expresso como SO ₂ livre)	.	.

	SULFITE e BISULFITE, etc.)			
9	Iodato de sódio (SODIUM IODATE)	0,1%	Somente para produtos que se enxagüe	
10	1,1,1-Tricloro-2-metilpropanol-2- (clorobutanol) (CHLOROBUTANOL)	0,5%	Proibido em aerossóis	Contém clorobutanol
11	Ácido 4-hidroxibenzóico, seus sais e ésteres(+) (PARABEN salts e esters)	0,4%(expresso como ácido) individual para 1 éster 0,8%(expresso como ácido) para misturas dos sais ou ésteres.		
12	Ácido dehidroacético e seus sais (DEHYDROACETIC ACID e salts)	0,6%(expresso como ácido)	Proibido em aerossóis	
13	Ácido fórmico e seu sal sódico(+) (FORMIC ACID e sodium salt)	0,5%(expresso como ácido)		
14	3,3'-Dibromo-4,4' hexametileno-dioxidibenzamidina e seus sais (incluindo isotionato) (dibromohexamidina) (DIBROMIHEXAMIDINE e salts)	0,1%		
15	Tiosalicilato de etilmercúrio sódico (Tiomersal) (Timerosal) (THIMEROSAL)	0,007%(de Hg).Se misturado com outros compostos mercuriais o total de Hg não pode ser maior que 0,007% no produto final.	Somente em produtos para a área dos olhos.	Contém timerosal
16	Fenilmercúrio e seus sais (incluindo borato) (PHENYLMERCURIC e salts)	0,007%(de Hg).Se misturado com outros compostos mercuriais o total de Hg não pode ser maior que 0,007% no produto final.	Somente em produtos para a área dos olhos.	Contém compostos fenilmercuriais
17	Ácido undecanóico-10-eno, (undecilênico), seus sais(+), ésteres, aminas e sulfosuccinato (UNDECILENIC ACID e SALTS)	0,2% (expresso como ácido)		
18	Amino-5-bis(etil-2-hexil)-1,3	0,1%		

	metil-5-perhidropirimidina (+) (HEXETIDINE)			
19	5-Bromo-5-nitro-1,3 dioxano (5-BROMO-5-NITRO-1,3-DIOXANE)	0,1%	Somente para produtos que se enxague. Evitar formação de nitrosaminas.	
20	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol) (+) (2-BROMO-2-NITROPROPANE-1,3-DIOL)	0,1%	Evitar formação de nitrosaminas.	
21	3,4,4`- Triclorocarbanilida(+) (TRICHLOCARBAN)	0,2%	Critério de pureza: 3,3`,4,4`-Tetraclo-roazobenzeno < 1ppm 3,3`,4,4`-Tetraclo-roazoxibenzeno < 1ppm	
22	p-cloro-metacresol (+) (p-CHLORO-m-CRESOL)	0,2%	Proibido em produtos que entram em contato com mucosas.	
23	p-cloro-metaxileno (+) (CHLOROXYLENOL)	0,5%	.	.
24	Imidazolidinil uréia(+) (IMIDAZOLIDINYL UREA)	0,6%	.	.
25	Cloridrato de polihexametileno biguanida(+) (POLYAMINOPROPYL BIGUANIDE)	0,3%	.	.
26	2-Fenoxietanol (+) (PHENOXYETHANOL)	1,0%	.	.
27	Cloreto de 1-(3-cloroalil)-3,5,7-triazo-1-azoniadamantano (QUATERNIUM 15)	0,2%	.	.
28	1-(4-clorofenoxi)-1-(1-imidazolil)-3,3-dimetil-2-butanona (+) (CLIMBAZOLE)	0,5%	.	.
29	1,3-Dimetilol-5,5-dimetilhidantoína (+) (DMDM HYDANTOINE)	0,6%	.	.
30	Álcool benzílico (+) (BENZYL ALCOHOL)	1,0%	.	.
31	1-Hidroxi-4-metil-6(2,4,4-trimetilpentil)2-piridona e seus sais de monoetanolamina (+)	1,0% 0,5%	Para produtos que se enxágüe. Para outros	

	(Octopirox) (PIROCTONE OLAMINE)		produtos	
32	1,2-Dibromo-2,4-dicianobutano (METHYL DIBROMOGLUTARONITRILE)	0,1%	Não usar em produtos para bronzear em concentração maior que 0,025%	
33	4-Isopropil-m-cresol (O-CYMEN-5-OL)	0,1%	.	.
34	Mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona e 2-metil-4-isotiazolina-3-ona com cloreto de magnésio e nitrato de magnésio (3:1) (METHYLISOTHIAZOLINONE + METHYL CHLORO ISOTHIAZOLINONE)	0,0015%	.	.
35	2-Benzil-4-Clorofenol (CHLOROPHENE)	0,2%	.	.
36	2-Cloroacetamida (CHLORACETAMIDE)	0,3%	.	Contém cloroacetamida
37	Bis-(p-clorofenildiguanida)-1,6-hexano (+): acetato, gluconato e cloridrato (CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE, DIHYDROCHLORIDE, DIACETATE)	0,3% (expresso como clorohexidina)	.	.
38	1-Fenoxi-2-propanol (PHENOXYPROPANOL)	1,0%	Somente para produtos que se enxágüe	
39	4,4-Dimetil-1,3-oxazolidina (DIMETHYL OXAZOLIDINE)	0,1%	pH do produto final não deve ser < 6	
40	N-(hidroximetil)-N-(dihidroximetil-1,3-dioxo-2,5-imidazolidinil-4)-N`-(hidroximetil)urea (+) (DIAZOLIDINYL UREA)	0,5%	.	.
41	Glutaraldeído (GLUTARAL)	0,1%	Proibido em aerossóis.	Contém glutaraldeído (somente para concentrações superiores a 0,05% no produto final)
42	5-Etil-3,7-dioxo-1-	0,3%	Proibido em.	

	azobiciclo(3.3.0)octano (7-ETHYLBICYCLO OXAZOLIDINE)		produtos para higiene oral e que entram em contato com mucosa.	
43	3-Hidroxi-4-isopropil tolueno (timol) (THYMOL)	0,1%	.	.
44	Farnesol (+) (FARNESOL)	0,6%	.	.
45	Monometilol dimetil hidantoína (MDM HYDANTOIN)	0,5%	Somente para produtos que se enxágüe.	.
46	6,6-dibromo-4,4-dicloro-2,2-metilenodifenol (+) (BROMOCHLOROPHENE)	0,1%	.	.
47	Álcool 2,4-Diclorobenzílico (+) (DICHLOROBENZYL ALCOHOL)	0,15%	.	.
48	Tricloro-3,4,4'-hidróxi-2'-difenileter (+) (TRICLOSAN)	0,3%	.	.
49	Hexametilenotetramina (+) (METHENAMINE)	0,15%	.	.
50	Brometo e Cloreto de Alquil(C12-C22) Trimetilamônio (+) (BEHENTRIMONIUM, CETRIMONIUM, LAUTRIMONIUM, MYRTRIMONIUM, STERTRIMONIUM: BROMIDE e CHLORIDE)	0,1%	.	.
51	1,6-Di-(4-amidinofenoxy)-n-hexano e seus sais (incluindo isotionato e p-hidroxibenzoato) (+) (HEXAMIDINE e salts)	0,1%	.	.
52	3-(p-clorofenoxy)-propano-1,2-diol (CHLORPHENESIN)	0,3%	.	.
53	Hidroximetil aminoacetato de sódio (SODIUM HYDROXYMETHYL GLYCINATE)	0,5%	.	.
54	Cloreto de prata depositado em dióxido de titânio (TITANIUM DIOXIDE + SILVER CHLORIDE)	0,004% (calculado como Cloreto de prata)	20% AgCl (p/p) em TiO2. Proibido em produtos para crianças abaixo de 3 anos de idade, em produtos para	.

			higiene oral e em produtos para a área dos olhos e lábios.	
55	Brometo de dodecil-dimetil-fenoxietilamônio (DOMIPHEN BROMIDE)	0,3%	.	.
56	Cloreto de alquil piridínio (ALKYLPYRIDINIUM CHLORIDE)	0,3% 0,2% em produtos para crianças e em produtos que entram em contato com mucosas.	.	.
57	Cloreto, Brometo e Sacarinato (C8-C18) de Alquil dimetilbenzilamônio (+) (BENZALKONIUM BROMIDE, CHLORIDE, SACCHARINATE)	0,1% (Calculado como cloreto de benzalcônio)	.	Evite contato com os olhos
58	Benzilhemiformal (BENZYLHEMIFORMAL)	0,15%	Somente para produtos que se enxágüe.	
59	Carbamato de 3-Iodo-2-propinilbutil (IODOPROPINYL BUTYLCARBAMATE)	0,05%	1.Não usar em produtos para higiene bucal e em produtos para os lábios. 2.Se a concentração nos produtos que permanecem em contato prolongado com a pele for superior à 0,02% deverá ser mencionado no texto: Contém Iodo	Contém iodo
60	Cloreto de Diisobutil Fenoxietoxietil -dimetil -benzilamônio (BENZETHONIUM CHLORIDE)	0,1%	Somente para produtos que se enxágüe.	

LISTA DE SUBSTÂNCIAS DE AÇÃO CONSERVANTE PERMITIDAS PARA PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL, COSMÉTICOS E PERFUMES ATÉ : 31/12/2001

Nº ORD	SUBSTÂNCIA (NOME INCI)	MÁXIMA CONCENTRAÇÃO AUTORIZADA	LIMITAÇÕES	CONDIÇÕES DE USO E ADVERTÊNCIAS
24a	Cloreto de diisobutil-cresoxietil-dimetilbenzil amônio (METHYLBENZETHONIUM CHLORIDE)	0,2% 0,1% em produtos infantis	Proibido em produtos que entram em contato com mucosas	.
25a	Cloreto de N-(lauril-colaminoformilmetil) Piridínio (LAPYRIUM CHLORIDE)	0,2%	Proibido em produtos que entram em contato com mucosas e em produtos infantis.	.
26a	6-Clorotimol (CHLOROTHYMOL)	0,1%	Proibido em produtos infantis.	.
27a	3,5-Dibromo-3-trifluor-metil-salicilanilida (FLUOROSALAN)	2%	Somente para sabonetes	.
28a	2,4-dicloro-3,5-xilenol (DICHLOORO-m-XYLENOL)	0,1%	Proibido em produtos infantis	.
29a	2-Feniletanol (PHENETYL ALCOHOL)	0,5%	p	.
31a	1-Hidroximetil-3,5-dimetilpirazol (DIMETHYL HYDROXYMETHYL PYRAZOLE)	0,1%	.	.
35a	Isotimol e carvacrol (ISOPROPYL CRESOLS)	0,1%	.	.

ANEXO B - RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 35, DE 3 DE JUNHO DE 2008

Dispõe sobre conservantes permitidos para produtos saneantes.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 29 de maio de 2008, e

considerando que a Vigilância Sanitária tem como missão precípua a prevenção de agravos à saúde, a ação reguladora de garantia de qualidade de produtos e serviços que inclui a aprovação de normas e suas atualizações, bem como a fiscalização de sua aplicação;

considerando a necessidade de implementar ações que venham contribuir para a melhoria da qualidade, oferecendo produtos com menor risco toxicológico e de assegurar o nível de proteção à saúde da população;

considerando a necessidade de estabelecer lista de conservantes e respectivas concentrações para utilização na formulação de produtos saneantes;

considerando a necessidade de banir o conservante Formaldeído das formulações de produtos saneantes, devido a sua reconhecida carcinogenicidade e atual classificação toxicológica pela IARC (International Agency for Research on Cancer);

considerando que o art. 5º da Resolução RDC nº. 184 de 22 de outubro de 2001 proíbe o uso de substâncias carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas nas formulações de produtos saneantes;

adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art.1º Aprovar a lista de conservantes permitidos para produtos saneantes,

que consta do Anexo desta Resolução.

Art. 2º A concentração máxima permitida para os respectivos conservantes, constante no Anexo desta Resolução deve ser obedecida.

Art. 3º É permitida a associação de substâncias conservantes, obedecidos seus limites individuais.

Art. 4º Fica proibido o uso do Formaldeído em produtos saneantes, assim como concentrações dos demais conservantes superiores às permitidas no anexo desta Resolução e devidas atualizações.

Art. 5º Conceder o prazo de 360 (trezentos e sessenta) dias para que os produtos anteriormente notificados e/ou registrados ajustem-se aos dispositivos desta Resolução, observado o disposto no art. 13 da Lei nº. 6.360/76.

Parágrafo único. A empresa que não optar pelo descrito no caput deste artigo terá automaticamente a notificação e/ou registro do produto cancelado, com fulcro no art. 6º da Lei nº. 6.360/76.

Art. 6º. Todas as alterações, inclusões e/ou exclusões no conteúdo da presente lista serão publicadas em Diário Oficial da União.

Art. 7º - As situações em desacordo com o disposto nesta Resolução constituem infração sanitária, sujeitando o infrator às penalidades previstas na Lei no 6.437, de 20 de agosto de 1977, no Decreto-Lei nº. 2.848, de 7 de dezembro de 1940, demais regulamentos cabíveis e devidas atualizações.

Art. 8º Esta norma revoga as demais disposições em contrário.

Art. 9º Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

ANEXO C

LISTA DE SUBSTÂNCIAS DE AÇÃO CONSERVANTE PERMITIDAS PARA FORMULAÇÕES DE PRODUTOS SANEANTES

Nº	NOME QUÍMICO	NÚMERO CAS	CONCENTRAÇÃO MÁX. PERMITIDA (% p/p)
01	BENZOATO DE SÓDIO	532-32-1	1,00
02	BROMO-2 NITRO-2 PROPANODIOL	52-51-7	0,10
03	CLOROTALONIL	1897-45-6	0,05
04	MISTURA MIT/ CMIT1:3 - METIL ISOTIAZOLINONA / METILCLORO ISOTIAZOLINONA	2682-20-4 26172-55-4	0,0015
05	1,2-BENZO-ISOTIAZOLINONA (BIT)	2634-33-5	0,05
06	METIL ISOTIAZOLINONA (MIT)	2682-20-4	0,01
07	OCTIL-ISOTIAZOLINONA	26530-20-1	0,0005
08	METIL BROMO GLUTARALNITRILA	35691-65-7	0,10
09	PARA-CLORO META-CRESOL	59-50-7	0,20
10	2,4 DICLORO BENZIL ALCOOL	1777-82-8	0,15
11	ORTOFENIL FENOL	90-43-7	0,20
12	2-BENZIL 4-CLOROFENOL	120-32-1	0,20
13	1-FENOXI -2-PROPANOL	770-35-4	0,50
14	4,4-DIMETIL-1,3-OXAZOLIDINA	51200-87-4	0,10
15	7-ETIL BICICLO OXAZOLIDINA	7747-35-5	0,30
16	CLOROXILENOL	88-44-0	0,50
17	PIRITIONATO DE ZINCO	13463-41-7	0,50
18	CLORETO DE DIDECILDIMETIL AMÔNIO	7173-51-5	0,10
19	CLORETO DE ALQUIL DIMETIL BENZIL AMONIO / CLORETO DE	39403-41-3 68424-85-1	0,10

	BENZALCONIO (C12 - C16)	63449-42-3 68424-95-3	
		70294-44-9 8001-54-5	
20	DITIOMETILBENZAMIDA	2527-58-4	0,10
21	DIAZOLIDINIL UREIA	78491-02-8	0,50
22	IMIDAZOLIDINIL UREIA	39236-46-9	0,60
23	HIDROXIMETILGLICINATO DE SÓDIO	70161-44-3	0,50
24	MDM HIDANTOÍNA	116-25-6	0,50
25	DMDM HIDANTOÍNA	6440-58-0	0,60
26	QUARTENIUM -15 / CLORETO DE 1- (3-CLOROALIL) -3,5,7-TRIAZO- 1-AZONIADAMANTANO	4080-31-3	0,20
27	2-FENOXIETANOL	122-99-6	1,00
28	3,4,4' TRICLOROCARBANILIDA	101-20-2	0,20
29	POLIHexametileno biguanida	32289-58-0	0,30
30	PIRITIONATO DE SÓDIO	3811-73-2	0,064
31	ÁCIDO SÓRBICO / SORBATO DE POTÁSSIO	110-44-1	0,60
32	ÁLCOOL BENZÍLICO	100-51-6	1,00