UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da eficácia e segurança do extrato de folhas de *Rubus
rosaefolius* Sm. visando a aplicação como conservante em produtos
cosméticos

Elissa Arantes Ostrosky

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da eficácia e segurança do extrato de folhas de *Rubus
rosaefolius* Sm. visando a aplicação como conservante em produtos
cosméticos

Elissa Arantes Ostrosky

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

São Paulo

2009

Elissa Arantes Ostrosky

Avaliação da eficácia e segurança do extrato de folhas de *Rubus
rosaefolius* Sm. visando a aplicação como conservante em produtos
cosméticos

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor
1º examinador

Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco
2º examinador

Profa. Dra. Patricia Santos Lopes
3º examinador

Prof. Dr. Paulo R. H. Moreno
4º examinador

São Paulo, 15 de julho de 2009

DEDICATÓRIA

À força divina que nos renova a cada dia!

Aos amores da minha vida: Tarcísio e Mariana

A toda minha família, em especial minha mãe Neusa, meu pai, Tata, Lolô, Eva, Siane, Amanda e meus cunhados, minha vó Vica pelo seu exemplo de força e humildade durante toda sua vida e ao João Pedro, que apesar de nos deixar muito cedo, encheu meu coração de amor e muita saudade.

Ao meu sogro e sogra, Pedro Paulo, Adriano e Maria Eugênia

À minha orientadora e amiga Telma

AGRADECIMENTOS

Telma Mary Kaneko, amiga e orientadora, que contribuiu diretamente para a realização desse trabalho.

À empresa de produtos cosméticos Natura, UNIEMP e FAPESP pelo auxílio financeiro para realização dessa pesquisa.

A CAPES pelo auxílio financeiro através de concessão de bolsa.

À amiga que contribuiu diretamente para minha formação e realização dessa tese: Patricia Santos Lopes.

À profa Valéria Robles Velasco pela sua presença constante, desde os primeiros momentos da minha vida acadêmica.

À profa Mônica Beatriz Mathor que me deu exemplos diários de dedicação e amor à pesquisa, que me ensinou a cultivar células de pele humana e contribuiu para realização desse trabalho.

Ao professor Paulo Moreno que contribuiu para a obtenção dos extratos da planta e enriqueceu minha formação com seus conhecimentos.

À profa Terezinha Andreoli Pinto pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À profa Vladi Olga Consiglieri pelo carinho e amizade.

À amiga Elda Cecílio pelo carinho e ensinamentos.

Ao José Sobrinho, pelo apoio e amizade em todos os momentos.

À Elisabete de Souza Paiva pela colaboração, amizade e gentileza.

Aos amigos Miriam, Pepê, Christiana, Ana Carla e Alê que sempre me apoiaram e torceram pela concretização desse trabalho.

Aos amigos Marcos Enoque, Kaori, Suzana, Carlos, Fernanda, Miriam, Satiko, Gabi, Tiago, Dani, Cris, Claudinéia, Délia, Vânia, Cibele, que de alguma maneira ajudaram a concretizar esse trabalho.

Aos amigos e professores da FMU, em especial Patrícia Staine, Sheila, Jack, Luciana, Osvaldo, Marisa Porta, Ednéia, Gláucia.

A todos os funcionários do departamento de Farmácia e amigos que contribuíram e torceram pela finalização dessa etapa.

“Os ideais que iluminaram o meu caminho são a bondade, a beleza
e a verdade”

Albert Einstein

RESUMO

OSTROSKY, E.A. **Avaliação da eficácia e segurança do extrato de folhas de *R. rosaefolius* Sm. visando a aplicação como conservante em produtos cosméticos.** 2009. 174 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os produtos cosméticos e farmacêuticos contendo componentes de origem natural têm aumentado significativamente nos últimos anos. Com o objetivo de utilizar esses componentes como conservante em formulações cosméticas, determinou-se a atividade antimicrobiana do extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. e suas frações. Aquele de melhor desempenho foi avaliado quanto à toxicidade *in vitro* e seu comportamento em formulações cosméticas (creme, gel e xampu), relacionado à estabilidade, eficácia do sistema conservante e compatibilidade epidérmica. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição e a concentração de 0,2% (p/v) do extrato bruto apresentou melhor desempenho. O teste de toxicidade do extrato bruto foi realizado por meio do método colorimétrico *Cell Titer 96®*, MTS, em cultura de queratinócitos humanos, constatando-se índice de citotoxicidade (IC50) de 1,0 mg/mL. As formulações cosméticas contendo o extrato foram analisadas quanto à estabilidade e as de melhor desempenho foram submetidas ao teste de eficácia do sistema conservante, de acordo com os procedimentos descritos na CTFA. O sistema conservante mostrou-se efetivo frente à *Escherichia coli* IAL 2393 (ATCC 10536), a *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1874 (ATCC 9027), ao *Staphylococcus aureus* IAL 1875 (ATCC 6548), a *Burkholderia cepacia* IAL 1834 ATCC (17759) e a *Candida albicans* IAL 1611 (ATCC 10231). Avaliou-se a compatibilidade epidérmica das formulações em equivalentes dermo-epidérmicos, sistema tridimensional cultivados na superfície ar-líquido. Os resultados mostraram que houve diferenças na compatibilidade epidérmica dependendo das características dos componentes das formulações. Concluiu-se que o extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. a 0,2% (p/v) pode ser utilizado como candidato a conservante em formulações cosméticas, sendo estável e apresentar compatibilidade epidérmica.

Palavras chave: *R. rosaefolius* Sm. Conservante natural. Produto cosmético. Cultura celular. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

OSTROSKY, E.A. **Effectiveness and safety evaluation of *R. rosaefolius* Sm. leaves regarding to the preservative use in cosmetic products.** 2009. 174 f. Thesis (Doctoral) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Cosmetic and pharmaceutical products containing natural components have significantly increased in the last few years. Aiming at using these components as preservative in cosmetic formulations, the antimicrobial activity of the raw extract of the *R. rosaefolius* Sm. leaves and its fractions was determined. The *in vitro* toxicity and the behavior in cosmetic formulations (gel, emulsion and shampoo), regarding the stability, effectiveness of the preservative system, and epidermal compatibility, were evaluated in the extract which had the best preservative action. The antimicrobial activity was determined by the micro dilution method, and the 0.2% concentration (w/v) of the raw extract had the best performance. The toxicity of the extract was analyzed by *Cell Titer 96*[®] colorimetric, MTS method in human keratinocytes culture, and the index of cytotoxicity (IC 50) found was 1.0 mg/mL. The cosmetic formulations with the raw extract were analyzed regarding the stability and the best formulations were submitted to the preservative system's efficacy test, according to CTFA procedures. The preservative system was effective against *Escherichia coli* IAL 2393 (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1874 (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* IAL 1875 (ATCC 6548), *Burkholderia cepacia* IAL 1834 ATCC (17759), and *Candida albicans* IAL 1611 (ATCC 10231). The epidermal compatibility of the formulations was verified by skin (dermo-epidermal) equivalent, three-dimensional system, cultivated on the air-liquid surface. The results showed there were differences in the epidermal compatibility depending on the characteristics of formulations' ingredients. In conclusion, the raw extract from the *R. rosaefolius* Sm leaves 0.2% (w/v) can be used as preservative candidate in the cosmetic formulations analyzed due to stability and because it presents epidermal compatibility.

Keywords: *R. rosaefolius* Sm. Natural preservative. Cosmetic product. Cell culture. Antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *R. rosaefolius* Sm.

Figura 2. Colônias de queratinócitos humanos produzidas por diferentes clones

Figura 3. Diagrama do processo geral de cultivo de *pele substituta*

Figura 4. Representação esquemática de pele reconstruída *in vitro*. Cortes histológicos de pele humana e pele reconstruída em 7 dias de exposição ao ar

Figura 5. Corte transversal de limbo

Figura 6. Corte transversal de limbo. Tricoma glandular e tector unicelular

Figura 7. Corte paradérmico de limbo, com estômatos anomocíticos

Figura 8. Estômato com câmara subestomática

Figura 9. Corte transversal do pecíolo

Figura 10. Tricoma glandular pedicelado

Figura 11. Corte transversal de caule

Figura 12. Corte transversal de caule com peridermes

Figura 13. Corte transversal de raiz pentarca, em desenvolvimento secundário

Figura 14. Recuperação de *S.aureus* 10^2 UFC/mL frente à mistura de solventes (metanol, etanol, dimetilsulfóxido)

Figura 15. Recuperação de *E.coli* 10^2 UFC/mL frente à mistura de solventes (metanol, etanol, dimetilsulfóxido)

Figura 16. Recuperação de *P.aeruginosa* 10^2 UFC/mL frente à mistura de solventes (metanol, etanol, dimetilsulfóxido)

Figura 17. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *S.aureus* 10^6 UFC/mL

Figura 18. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *E. coli* 10^6 UFC/mL

Figura 19. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *P.aeruginosa* 10^6 UFC/mL.

Figura 20. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *C.albicans* 10^4 UFC/mL

Figura 21. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *A.niger* 10^4 UFC/mL

Figura 22. Aspecto do crescimento da cultura de queratinócitos em relação ao número de células semeadas, por coloração com Rodamina B

Figura 23. Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de *R. rosaefolius* nas concentrações 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL, em células de queratinócitos humanos, coradas com Rodamina B, nos tempos de contato de 6, 12 e 24 horas, em triplicata

Figura 24. Curva de viabilidade celular (%) das culturas de queratinócitos em contato com a solução Phenonip® (controle positivo) por 24 e 48 horas, utilizando como indicador da viabilidade celular MTS

Figura 25. Curva de viabilidade celular (%) das culturas de queratinócitos em contato com o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm. e solventes metanol e polietilenoglicol 400 (1:1), nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas para os extratos e 24 e 48 horas para os solventes, utilizando como indicador da viabilidade celular MTS

Figura 26. Variação (%) do valor de pH do Creme A

Figura 27. Variação (%) do valor de pH do Creme B

Figura 28. Variação (%) de viscosidade aparente do Creme A

Figura 29. Variação (%) de viscosidade aparente do Creme B

Figura 30. Variação (%) do valor de pH do Gel A

Figura 31. Variação (%) do valor de pH do Gel B

Figura 32. Variação (%) de viscosidade aparente do Gel A

Figura 33. Variação (%) de viscosidade aparente do Gel B

Figura 34. Variação (%) do valor de pH do Xampu A

Figura 35. Variação (%) do valor de pH do Xampu B

Figura 36. Variação (%) de viscosidade aparente do Xampu A

Figura 37. Variação (%) de viscosidade aparente do Xampu B

Figura 38. Fotos das formulações cosméticas no início do teste de estabilidade

Figura 39. Fotos das formulações cosméticas submetidas ao teste de estabilidade por 30 dias

Figura 40. Fotos das formulações cosméticas submetidas ao teste de estabilidade por 60 dias

Figura 41. Fotos dos tempos 0, 24 e 48 horas. Contato dos controles e amostras teste das formulações gel, creme e xampu, contendo o extrato de *R. rosaefolius*, no sistema dermo-epidérmico

Figura 42. Foto de corte transversal de um fragmento dermo-epidérmico utilizado como controle do experimento. Coloração HE, aumento de 100x

Figura 43. Fotos dos cortes transversais dos fragmentos dermo-epidérmicos em contato com o gel controle e o gel contendo o extrato, por 24 e 48 horas. Coloração HE, aumento 100x

Figura 44. Fotos dos cortes transversais dos fragmentos dermo-epidérmicos em contato com o creme controle e o creme contendo o extrato, por 24 e 48 horas. Coloração HE, aumento 100x

Figura 45. Fotos dos cortes transversais dos fragmentos dermo-epidérmicos em contato com o xampu controle e o xampu contendo o extrato, por 24 e 48 horas. Coloração HE, aumento 100x

Figura 46. Curva padrão de pirogalol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do CREME A (creme não-iônico)

Tabela 2. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do CREME B (creme aniônico)

Tabela 3. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do GEL A (gel não-iônico)

Tabela 4. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do GEL B (gel aniônico)

Tabela 5. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do XAMPU A (xampu transparente)

Tabela 6. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do XAMPU B (xampu perolado)

Tabela 7. Avaliação física e físico-química das amostras do Creme A e Creme B no estudo de estabilidade normal

Tabela 8. Avaliação física e físico-química das amostras do Gel A e Gel B no estudo de estabilidade normal

Tabela 9. Avaliação física e físico-química das amostras do Xampu A e Xampu B no estudo de estabilidade normal

Tabela 10. Recuperação dos microrganismos das formulações cosméticas avaliadas na condição de neutralização estudada para inativação do sistema conservante

Tabela 11. Carga de sobreviventes de *Escherichia coli* IAL 2393 (ATCC 10536) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Tabela 12. Carga de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1874 (ATCC 9027) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Tabela 13. Carga de sobreviventes de *Staphylococcus aureus* IAL 1875 (ATCC 6538) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Tabela 14. Carga de sobreviventes de *Burkholderia cepacia* IAL 1834 (ATCC 17.759) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Tabela 15. Carga de sobreviventes de *Candida albicans* IAL 1611 (ATCC 10231) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Tabela 16. Carga de sobreviventes de *Aspergillus niger* IAL 2122 (ATCC 16404) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1. Técnicas de avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais	23
3.1.1. Métodos de difusão em ágar	24
3.1.2. Métodos de diluição em caldo	29
3.1.3. Fatores interferentes nos métodos de difusão em ágar e diluição em caldo	32
3.2. Espécies nativas do gênero <i>Rubus</i>	36
3.3. Estudo de citotoxicidade	40
3.4. Desenvolvimento e estabilidade de formulações cosméticas	47
3.5. Utilização de conservantes de origem vegetal em produtos cosméticos	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1. Caracterização botânica de <i>R. rosaefolius</i> Sm.	57
4.2. Obtenção do extrato bruto e das frações a partir das folhas da planta	58
4.3. Determinação da atividade antimicrobiana de <i>R. rosaefolius</i> Sm.	59

4.3.1. Validação do método por meio da recuperação dos microrganismos na mistura de solventes utilizados	59
4.3.2. Microrganismos testados.....	60
4.3.3. Meios de cultura utilizados	60
4.3.4. Preparação e avaliação da viabilidade do inóculo.....	60
4.3.5. Preparação das soluções padrões dos antibióticos.....	61
4.3.6. Ensaio da concentração mínima inibitória (MIC)	61
4.4. Teste de toxicidade <i>in vitro</i> do extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm.....	62
4.4.1. Preparação das células	63
4.4.2. Cálculo da quantidade inicial de células a serem utilizadas para o teste de viabilidade celular	64
4.4.3. Avaliação da interferência dos solventes no teste de viabilidade celular	65
4.4.4. Avaliação da viabilidade celular.....	65
4.5. Estudo de estabilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm.	67
4.5.1. Formulações estudadas e técnicas de preparo	67
4.5.2. Avaliação da estabilidade física e físico-química de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm.....	74
4.5.2.1. Testes preliminares de estabilidade física	74
4.5.2.2. Estudo de Estabilidade	75

4.5.2.2.1. Avaliação inicial	75
4.5.2.2.2. Condições de armazenamento do estudo de estabilidade ..	75
4.5.2.2.3. Parâmetros avaliados no estudo de estabilidade	76
4.5.2.2.4. Critérios para aprovação das formulações cosméticas	78
4.6. Avaliação da eficácia do sistema conservante das formulações cosméticas.....	78
4.6.1. Microrganismos desafiante	78
4.6.2. Preparação e padronização das suspensões microbianas.....	79
4.6.3. Preparo de meios de cultura e diluentes utilizados	80
4.6.4. Validação do método através de neutralização do sistema conservante	80
4.6.5. Teste de eficácia do sistema conservante das formulações cosméticas.....	81
4.6.6. Critérios de aceitação	82
4.7. Avaliação da compatibilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm. sobre equivalentes dermo-epidérmicos – sistema ar-líquido	83
4.7.1. Preparo das bases dérmicas como suporte das culturas	84
4.7.2. Cultura de queratinócitos.....	85
4.7.3. Culturas secundárias de queratinócitos sobre bases dérmicas – cultivo na interface ar-líquido	86

4.7.4. Contato das formulações contendo extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm. com equivalentes dermo-epidérmicos – sistema ar-líquido.....	87
4.7.5. Estudos histológicos – microscopia ótica dos fragmentos dermo-epidérmicos	87
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1. Descrição macroscópica da planta.....	89
5.2. Descrição microscópica da planta.....	89
5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações do extrato de <i>R. rosaefolius</i> Sm.	96
5.3.1. Recuperação dos microrganismos na mistura de solventes utilizados	96
5.3.2. Estudo da atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações do extrato de <i>R. rosaefolius</i> Sm.	98
5.4. Teste de toxicidade <i>in vitro</i> do extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm....	103
5.5. Estudo de estabilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm.	111
5.5.1. Testes de estabilidade preliminar	111
5.6.2. Teste de estabilidade.....	112
5.6. Avaliação da eficácia do sistema conservante das formulações cosméticas.....	129

5.7. Avaliação da compatibilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de <i>R. rosaefolius</i> Sm. sobre equivalentes dermo-epidérmicos – sistema ar-líquido	138
5.7.1. Estudos histológicos – microscopia ótica dos fragmentos dermo-epidérmicos	140
6. CONCLUSÃO.....	145
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹	147
APÊNDICE	171
ANEXO	174

INTRODUÇÃO

Produtos não estéreis são aqueles nos quais se admite conceitualmente a presença limitada de carga microbiana. Em produtos cosméticos, farmacêuticos tópicos e orais, a atenção no controle de qualidade assegura que a carga microbiana no produto não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do consumidor. Dentre vários fatores essenciais para que se atinjam níveis adequados de qualidade microbiana no produto final, o emprego de um conservante ideal é essencial e requer consideração cuidadosa quanto ao tipo do produto, seu uso, características de formulação e provável desafio microbiano. A seleção definitiva do agente conservante deve ser um compromisso entre eficácia antimicrobiana e compatibilidade com o produto, sendo essa seleção uma tarefa bastante difícil para a indústria de produtos farmacêuticos e cosméticos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “conservantes são substâncias adicionadas aos produtos não estéreis com a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações causados por microrganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto” (BRASIL, 2001).

Os conservantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana efetiva, devem ser seletivamente tóxicos e eficazes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bolores e leveduras. Entretanto, devido a características intrínsecas, a grande maioria dos conservantes de origem sintética pode apresentar reações ao usuário, tais como, irritação local, dermatite de contato, hipersensibilidade e outras. (LEE et al., 2007; TORO et al., 1996).

O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, o que é de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade.

Desta forma tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos.

O mercado de produtos cosméticos e farmacêuticos com componentes de origem vegetal ou mineral tem crescido muito nos últimos anos. De acordo com Farnsworth et al. (1989), a correlação entre o uso de uma planta na medicina tradicional e a presença de princípios farmacologicamente ativos com alguma ação terapêutica é altamente positiva. Estima-se que 74% dos medicamentos convencionais tenham sido descobertos com base no seu uso tradicional. Por este motivo, a procura por compostos bioativos em produtos naturais tem causado grande repercussão internacional (O'NEILL; LEWIS, 1993).

Rubus rosaefolius Sm. é conhecido popularmente como morango silvestre ou amora-do-mato, pertence à família Rosaceae, representada por maçãs, pêras, ameixas, morangos e framboesas (JORGE; MARKMAN, 1993). A espécie nasce espontaneamente nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (HOOKER, 1967), principalmente em regiões serranas, sendo espécie de clareiras ou borda de mata (MANTOVANI, 1981). O fato de existir na flora da mata Atlântica, aliada à sua resistência a fatores ambientais inóspitos, bem como o fato da espécie florescer e frutificar, portanto se reproduzir durante todo o ano, justifica a eleição de órgãos vegetativos como fonte para experimentos.

A incorporação de extratos vegetais em bases cosméticas requer estudo criterioso e deve-se considerar a compatibilidade do sistema, cuidando-se do armazenamento do extrato, da escolha dos solventes utilizados na sua dispersão, da temperatura de incorporação na formulação e do material de acondicionamento ou embalagem final. Deve-se garantir a estabilidade da formulação durante todo o período do prazo de validade, mantendo suas características dentro das especificações previamente estabelecidas (BABY et al., 2005; BANOVA, 2002).

Visando a segurança ao consumidor frente aos produtos cosméticos com componentes naturais, novas substâncias ativas de origem vegetal devem ser avaliadas extensivamente, quanto a sua toxicidade. Atualmente, os testes de toxicidade em animais são contestados pelos pesquisadores, levando ao desenvolvimento de novas metodologias que utilizam linhagens especializadas de células, resultando em ensaios confiáveis e esclarecedores (LOPES, 2003).

Adicionalmente, a busca cada vez maior de cosméticos eficazes e seguros tem sido constante. Com esse enfoque, a substituição de conservantes sintéticos pelos de origem natural vem de encontro a essa diretriz. Atendendo às expectativas do mercado de produtos cosméticos que busca formulações com menor potencial de toxicidade, diminuindo a incidência de irritação e alergia, propõe-se o uso de um conservante de origem vegetal, o extrato de *R. rosaefolius* Smith.

2. OBJETIVOS

Com o objetivo de aplicação de produto natural como conservante em formulações cosméticas, determinou-se a atividade antimicrobiana do extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. e suas frações.

Aquele de melhor desempenho foi avaliado quanto à toxicidade *in vitro* e seu comportamento em formulações cosméticas, relacionado à estabilidade, eficácia conservante e compatibilidade epidérmica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Técnicas de avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos (OSTROSKY et al., 2008).

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

Atualmente existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (COLLINS, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Eloff (1998), descreveu um método sensível de microdiluição para determinar a CMI ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas.

As variações referentes à determinação da CMI de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais.

Os diferentes métodos comumente utilizados na pesquisa de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais, bem como seus fatores interferentes, são descritos a seguir.

3.1.1. Métodos de difusão em ágar

O método de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (BARRY; THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos (BARRY; THORNSBERRY, 1991; THORNSBERRY, 1991).

A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991). De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior, ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm (COLLINS, 1995).

No método há a necessidade de controle positivo, empregando-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (SPRINGFIELD et al., 2003).

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27 °C por 48 a 72 horas (CHANDRASEKARAM; VENKATESALU, 2004; KARAMAN et al., 2003; MOODY; ADEBIYI; ADENIYI, 2004). Como variação do método, (RABANAL et al., 2002) incubaram as placas de Petri por 14 horas à temperatura de 37 °C para bactérias e 28 a 30 °C para fungos. Rahua et al. (2000), mantiveram a incubação a 29 °C para facilitar a difusão, e em seguida a 35 °C por 24 horas.

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana pelo método de difusão são por meios de difusão em disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro, e perfuração em ágar (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

- Teste de difusão em disco

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

O teste de difusão em disco (KARAMAN et al., 2003; RABANAL et al., 2002) consiste na aplicação de 10 µL da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro, de 6mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas variando de 31,25 a 500 µg/mL. Como variação do método, (CARVALHO et al., 2002; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004) aplicaram 20 µL de extrato hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. e extratos metanólico e aquoso de *Syzygium jambolanum* DC., respectivamente, nos discos de papel, com concentrações de 500 a 1000 µg/mL. Shrimali et al. (2001), em sua pesquisa, aplicaram 50 e 100 µL dos extratos alcoólicos de *Ailanthus excelsa* Roxb. em papel de filtro de 10 mm de diâmetro para verificar a atividade antibacteriana.

Springfield et al. (2003), testaram diferentes extratos obtidos de 2 espécies do gênero *Carpobrotus* aplicando 50 µL das soluções em discos de papel de filtro de 9mm. Penna et al. (2001), verificaram a atividade antimicrobiana de 03 extratos de diferentes plantas da flora argentina pelo método de difusão em ágar. Discos de papel de 5,5 mm foram impregnados com 0,25 mg do extrato dissolvido em 10 µL do solvente correspondente.

Jeevan Ran, Bhakshu e Venkata Raju (2004), utilizaram ampicilina (30 µL) e tetraciclina (30 µL) como controle positivo e etanol e água como controle negativo na avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais da Índia usadas no tratamento de doenças de pele.

Rabanal et al. (2002), utilizaram disco impregnado com dimetilsulfóxido (DMSO) para o controle negativo, cloranfenicol (30 µg) como controle positivo para bactérias e anfotericina B (100 µg) para fungos. Springfield et al. (2003), usaram ciprofloxacina (40 µL) para controle positivo de bactérias e anfotericina B (25 µL) para fungos.

Shunying et al. (2005), determinaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Chrysanthemum indicum* L. utilizando o método de difusão em disco. Uma suspensão de microrganismo em teste foi colocada sobre as placas contendo meio de cultura. Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 15 µL da amostra diluída (200 mg/mL) e colocados nas placas. As placas foram incubadas a 4 °C por 2 horas seguidas por incubação a 37 °C por 24 horas; posteriormente, as zonas de inibição foram medidas.

Tadeg et al. (2005), conduziram um estudo onde extratos hidroalcoólicos de 08 espécies de plantas medicinais, usadas no tratamento de desordens de pele, foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana em relação a bactérias e fungos conhecidos por causarem diferentes tipos de infecções cutâneas. A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método de difusão em ágar; e os testes foram conduzidos com concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL no caso de

extratos brutos das espécies vegetais e 25 e 5 mg/mL no caso das frações. Metanol, clorofórmio e água destilada foram utilizados como controle negativo, gentamicina e cetoconazol como controle positivo. As frações clorofórmio e éter de petróleo de *Lippia adoensis* Hochst. foram mais ativas contra bactérias e *Olinia rachetiana* contra fungos.

Tshinbangu et al. (2002), também utilizaram o método de difusão em disco para medir a atividade antimicrobiana e inibidora de enzimas de plantas medicinais africanas. Amostras de 50 µL de solução do extrato foram colocadas em discos de papel de filtro estéreis. Foi adicionado o meio de cultura adequado. Após a incubação, as zonas de inibição foram determinadas.

Singh et al. (2004), impregnaram 10 µL de corantes naturais em um pequeno disco de papel (5,0 mm de diâmetro). Após 24 horas de incubação a 37 °C, as zonas de inibição foram medidas.

Voravunthikunchai et al. (2004), determinaram o MIC de extratos etanólicos e aquosos de plantas medicinais que produziam zonas de inibição utilizando método de difusão em ágar. Amicacina, ampicilina, gentamicina, kanamicina e tetraciclina como amostras de referência, e 1 µL de cada cultura de bactérias foi colocado em MHA (Mueller Hinton Agar) juntamente com os extratos de plantas medicinais. Após incubação por 18h a 35°C, determinou-se a mínima concentração capaz de produzir a completa supressão das colônias.

Os discos são colocados sobre o ágar nas placas de Petri, previamente inoculados com 100 µL de suspensão contendo 10^8 UFC (Unidade Formadora de Colônia)/mL bactérias, 10^6 UFC/mL leveduras e 10^4 esporos/mL de fungos (CHATTOPADHYAY et al., 2002; KARAMAN et al., 2003). A disposição dos discos deve ser tal que sua distância até a parede da placa seja maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição (BARRY; THORNSBERRY, 1991). O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4 e a profundidade recomendada é de aproximadamente 4 mm (BARRY; THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995).

- Cilindros de aço inoxidável

Esta técnica de aplicação envolve cilindros de aço inoxidável no meio de cultura solidificado já inoculado e a adição da solução em estudo nos cilindros. Coelho de Souza et al. (2004), aplicaram 200 µL dos extratos de plantas medicinais comumente utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. Como controle positivo para bactérias foi aplicado cloranfenicol (40 µg/mL, 200 µL), e para fungos, nistatina (30 mg/mL, 200 µL). Dois controles negativos, 200 µL de metanol e 200 µL de água, foram utilizados.

- Perfuração em ágar

Para técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível a aplicação das substâncias a serem analisadas. Moody, Adebisi e Adeniyi (2004), preencheram os poços com 60 µL dos extratos de *Aloe vera* e *Ageratum conyzoides* para verificar a atividade antimicrobiana de sopas medicinais utilizadas na Nigéria. Como controle positivo foram aplicados estreptomicina (100, 25 e 6,25 µg/mL) para bactérias e tioconazol (100, 25 e 6,25 µg/mL) para fungos. O controle negativo constituiu de metanol:água 50% (v/v), que foi usado para dissolver os extratos secos para as diferentes concentrações testadas.

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

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

Rahua et al. (2000), testaram a atividade antimicrobiana de plantas finlandesas contendo flavonóides e outras substâncias fenólicas como uma alternativa natural para conservantes alimentícios. O método de perfuração em ágar foi utilizado fazendo-se seis orifícios eqüidistantes e preenchendo-os com 500 µL de amostras em metanol.

Okoli e Iroegbu (2004), testaram os extratos de *Anthocleista djalensis* A. Chev., *Nauclea latifolia* Sm. e *Uvaria afzalli* para verificar a atividade contra bactérias isoladas de casos de uretite e/ou doença sexualmente transmitida. A técnica descrita por Okeke et al. (2001) foi utilizada, porém alterando-se o controle positivo para ciprofloxacina (8 µg/mL).

3.1.2. Métodos de diluição em caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; COLLINS, 1995).

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

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

Duas metodologias podem ser empregadas, macro e microdiluição.

- Macrodiluição

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

- Microdiluição

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

Zgoda e Porter (2001), utilizaram extratos orgânicos das plantas *Lemna minor* L. e *Ilex cornuta* Lindl. & Paxton para desenvolver uma técnica de microdiluição para a pesquisa de novos compostos com atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. Para cada microplaca foi usado um controle negativo (água, meio de cultura e 2,5% DMSO), controle de crescimento (água, meio de cultura, 2,5% DMSO e inóculo), controle positivo (água, meio de cultura, inóculo, 2,5% DMSO e antibiótico). A inoculação sugerida foi 95 µL de água estéril, 5 µL de extrato dissolvido em DMSO, 80 µL do meio apropriado e 20 µL de inóculo. Em teste prévio observou-se que concentrações maiores que 2,5% DMSO nos poços inibia o crescimento de *Cryptococcus albidus*, e por essa razão, tal concentração foi utilizada para todos os microrganismos. As leituras foram feitas a 750 nm num espectrofotômetro leitor de microplacas, após a agitação dos poços com uma pipeta multicanal para ressuspender as células aderidas no fundo.

Simié et al. (2004), estudaram a atividade antifúngica de alguns óleos essenciais de Lauraceae determinando a CMI em microplacas de 96 poços. Os óleos essenciais investigados foram dissolvidos em MS (Malt Agar) inoculado com fungos. As microplacas foram incubadas a 28°C por 72 horas. As menores concentrações sem crescimento aparente foram definidas como as concentrações que inibem completamente o crescimento de fungos.

Karaman et al. (2003), utilizaram a técnica para verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Juniperus oxycedrus* L. dissolvido em DMSO 10%, concentração de solvente que não inibe o crescimento dos microrganismos. A técnica descrita por Zogda e Porter (2001) foi adaptada, dispensando-se 95 µL de caldo nutriente e 5 µL de inóculo em cada poço. No primeiro foi então adicionado 100 µL de extrato de *J. oxycedrus* preparado inicialmente na concentração de 500 µg/mL. Fez-se então uma diluição seriada nos 6 poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração, resultando na diluição de até 7,8 µg/mL. No último poço não se adicionou o inóculo e o extrato, a fim de se ter um controle negativo. O crescimento microbiano foi determinado por leitura no espectrofotômetro a 600 nm.

Khan e Katiyar (2000), testaram a atividade antifúngica do extrato de alho (*Allium sativum* L.) em microplacas, aplicando 270 µL de meio por poço; 30 µL do extrato foram adicionados nos primeiros poços e a partir deles foram feitas as diluições seriadas. Em seguida, foi colocado o inóculo de 10⁴ UFC em cada poço. Controles foram submetidos às mesmas condições laboratoriais. A leitura foi feita após 48-72 horas em leitor de ELISA a 492 nm.

Dupont et al. (2005), determinaram a atividade antimicrobiana de 05 plantas nativas da Austrália em microplacas, para utilização na indústria de alimentos, podendo promover maior segurança durante o prazo de validade dos mesmos.

Rahman et al. (2005), avaliaram a atividade antimicrobiana de *Barringtonia acutangula* Blume contra bactérias e fungos, utilizando a técnica de microdiluição.

Utilizaram solução indicadora (resazurina 750 µg/mL) e a atividade foi avaliada observando a mudança de coloração (rosa para azul).

A atividade antimicrobiana também foi avaliada por microdiluição por Suffredini et al. (2004), pretendendo desvendar propriedades farmacológicas de plantas nativas da floresta Amazônica e da mata Atlântica, no Brasil. Os resultados foram determinados visualmente de acordo com a turbidez provocada nos poços da microplaca.

Na pesquisa de alcanos bioativos de *Rubus apetalus* Poir., tradicionalmente usado como antidiarréico, Hamill et al. (2003), utilizaram o método de microdiluição em caldo para determinação visual da CMI.

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

3.1.3. Fatores interferentes nos métodos de difusão em ágar e diluição em caldo

Diversos são os fatores que afetam a susceptibilidade do método de difusão e de diluição, havendo a necessidade de conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa da execução teste (COLLINS, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; THORNSBERRY, 1991).

Os aspectos importantes a serem considerados são:

- Meios de cultura

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

Entre os meios de cultura utilizados para teste de susceptibilidade de bactérias, o Müller-Hinton é bastante citado em diversos trabalhos publicados (CARVALHO et al., 2002; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; CHATTOPADHYAY et al., 2002; HAMILL et al., 2003; SAHM; WASHINGTON II, 1991), os meios de caseína soja (TSA e TSB) (BARRY; THONRSBERRY, 1991; RABANAL et al., 2002; SAHM; WASHINGTON II, 1991) e o meio líquido Luria-Bertani (ZGODA; PORTER, 2001) para bactérias. Para pesquisa de fungos são utilizados os meios ágar Sabourand dextrose (SDA) e caldo Sabourand dextrose (SDB) (COELHO DE SOUZA et al., 2004; HAMILL et al., 2003; KARAMAN et al., 2003; KHAN; KATIYAR, 2000; MEHMOOD et al., 1999; RABANAL et al., 2002;), Agar Batata dextrose (PDA) (KARAMAN et al., 2003), Bacto Yeast Morphology Agar (RABANAL et al., 2002) e caldo de levedura (ZGODA; PORTER, 2001).

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

Barry e Thornsberry (1991); Collins (1995), afirmaram que há substâncias no meio de cultura que influenciam a susceptibilidade do teste, a timidina antagoniza a atividade de sulfonamidas e trimetoprimas, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais agentes. Se o meio contiver altas concentrações de timidina, pode-se adicionar sangue de cavalo lisado ou timidina fosforilada para remover a timidina livre. O cátion monovalente Na^+ aumenta a atividade de bacitracina, ácido fusídico e novobiocina contra *Staphylococcus spp*, e da penicilina contra *Proteus spp*. Cátions bivalentes tais como Mg^{2+} e Ca^{2+}

reduzem a atividade de aminoglicosídeos e polimixinas contra *Pseudomonas spp.* e da tetraciclina contra uma série de organismos.

- pH

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

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

Barry e Thornsberry (1991), afirmaram que a atmosfera com concentração de CO₂ elevada, deve ser evitada, já que altera o pH da superfície, sendo então capaz de afetar a atividade antimicrobiana de alguns agentes.

Pinto, Kaneko e Ohara (2003), citaram estudos onde o aumento da acidez do meio diminui a atividade antibacteriana de substâncias básicas como a estreptomicina, e por outro lado, provoca o aumento da atividade de substâncias ácidas como a penicilina.

Rabanal et al. (2002), utilizaram pH 7,0 para avaliar a atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Hypericum* das Ilhas Canárias.

Li-Chang et al. (2005), avaliaram o efeito do pH (5-9) na atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis inoculado com o microrganismo teste e incubado a 37°C por 9 horas. O extrato exerceu um efeito bactericida em *S. aureus*, após 1,5 e 3 horas de cultivo em pH 5 e 6, respectivamente.

-Disponibilidade de oxigênio

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

- Inóculo

A susceptibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A padronização desse se faz, portanto, necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. No teste de suscetibilidade de metilicina contra *Staphylococcus*, esse padrão deve ser de 10^6 UFC / inóculo. Para os testes de diluição em caldo, o padrão é de 10^5 UFC/ inóculo no início do período de incubação (COLLINS, 1995; SAHM; WASHINGTON II, 1991).

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

Rabanal et al. (2002), para o teste de microdiluição, utilizaram inóculo de 5 μL , equivalente a 10^5 células por μL em cada poço.

- Condições de Incubação

A incubação dos microrganismos deve ser feita a 35-37 °C para o crescimento de bactérias e 25-27 °C para fungos. No método de diluição, as condições de crescimento dos microrganismos nos tubos devem ser semelhantes, propiciando-se a mesma temperatura e agitação. No método de difusão as placas devem ser incubadas com o cuidado de se manter a temperatura homogênea na estufa (CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; COLLINS, 1995; KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

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

3.2. Espécies nativas do gênero *Rubus*

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2003). Assim, a flora brasileira é rica e apresenta grande potencial para fornecer substâncias de interesse farmacêutico e cosmético.

A localização geográfica e o clima do Brasil contribuem para a diversidade de plantas medicinais. Entre as famílias de plantas que são fontes para a medicina popular, a Rosaceae é muito utilizada para o tratamento de várias patologias, sendo que o gênero *Rubus* pode ser uma fonte importante de princípios ativos (NOGUEIRA et al., 1998).

Existem cerca de 200 espécies de *Rubus* relatadas (FONTQUER, 1993). No Brasil, são nativas três espécies deste gênero, *R. rosaefolius*, *urticaefolius* e *brasiliensis* (KISSMANN; GROT, 1995).

Silva e Siqueira (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Rubus urticifolius* Poir. obtido por maceração e realizaram a medida do halo de inibição frente a determinadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando que a parte da planta com maior atividade antimicrobiana foi o fruto.

Extratos da fração etanólica e obtidos por infusão de *Rubus brasiliensis* Mart. apresentaram efeito ansiolítico em ratos e camundongos (NOGUEIRA et al., 1998). A fração hexânica induziu efeito anticonvulsivante e hipnótico em ratos, sendo que o receptor benzodiazepínico-GABA_A pode ter uma importante função no efeito dessa fração (NOGUEIRA; VASSILIEFF, 2000).

R. rosaefolius Sm. é um arbusto escandente de panículas de flores brancas e frutos vermelhos, ocos por dentro. Os ramos têm tricomas glandulares, são anucleados, têm folhas compostas, os frutos são comestíveis e antidiarréicos. A espécie possui raiz subterrânea que atinge grandes profundidades e emite novos ramos subterrâneos, sendo de difícil extirpação após o plantio. Algumas plantas desse gênero contêm proteínas, sais minerais, taninos e vitamina C (JORGE; MARKMAN, 1993). Ainda podem ser observados constituintes químicos como ácidos livres, açúcares, substâncias pépticas, ácido fólico, acético, capróico e benzóico, assim como cumarinas, e as sementes são ricas em ácido linoléico (SILVA; SIQUEIRA, 2000).

Figura 1. *R. rosaefolius* Sm. Disponível em <http://www.botany.hawaii.edu/Faculty/Carr/ros.htm>. Acesso em 14 abril 2007

No estudo fitoquímico de *R. rosaefolius* foram feitos testes para identificar heterosídeos antraquinônicos, saponinas, taninos, heterosídeos flavonoídicos, heterosídeos cianogênicos, cumarinas, açúcares redutores e não redutores, heterosídeos cardiotônicos e alcalóides e também o índice de espuma. As cromatografias realizadas indicam a presença de várias substâncias nos grupos pesquisados. Os testes foram realizados em folha (limbo foliar e pecíolo), caule e raiz, indicando a presença de taninos, antraquinonas, saponinas, flavonóides e alcalóides nos três órgãos vegetais estudados (MAURO et al., 2002).

Kanegusuku et al. (2007) realizaram a análise fitoquímica das partes aéreas de *R. rosaefolius* e identificaram triterpenos pentacíclicos, o ácido tormêntico e o ácido 28-O-metoxitormêntico e 3 esteróides, estigmasterol, sitosterol e campesterol. Demonstraram que os extratos hidroalcoólicos e frações diclorometano, acetato de etila e a substância isolada apresentaram significativa atividade antinociceptiva *in vivo*, sendo efetivos na nonicepção de origem

inflamatória e 6 vezes mais potente quando comparado com medicamentos usados clinicamente.

Algumas plantas da família Rosaceae, à qual pertence o *R. rosaefolius* Sm., apresentam grandes quantidades de taninos. Os taninos têm participação na atividade antioxidante de espécies de Rosaceae, havendo correlação direta entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico total de plantas, vegetais e frutos (SUN et al., 2002; ZHENG; WANG, 2001).

Os fenóis, seus análogos poliméricos e oligoméricos (taninos) têm recebido atenção por suas funções regulatórias em plantas e por seus efeitos benéficos na saúde de animais e humanos (ALONSO-AMELOT et al., 2007).

Oszmianski et al. (2007), estudaram a atividade antioxidante de taninos analisando os polifenóis por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), encontrando grandes concentrações em algumas espécies.

Os taninos são compostos polifenólicos que constituem dois grupos, os hidrolisáveis e os condensados e têm possibilidade de formar complexos com macromoléculas, como as proteínas. Assim, utilizam-se plantas com estes compostos em produtos cosméticos, pois por via tópica, ligam-se às camadas mais externas do tecido cutâneo, impermeabilizam e exercem efeito vasoconstritor sobre os capilares superficiais, limitando a perda de fluidos e impedindo agressões exteriores, ao mesmo tempo em que diminuem o diâmetro dos poros das glândulas sebáceas. Possuem também ação antibacteriana e antifúngica (CUNHA et al., 2004).

Na medicina popular, esta espécie é utilizada como tônica e revigorante, bem como cicatrizante de feridas externas, na forma de infusão ou decocto e cataplasma, respectivamente (UPHOF, 1959). Na literatura, há relatos também do uso do decocto da raiz como diurético e antiinflamatório. Grandi (1989), registrou o uso do decocto ou infusão como depurativo, útil nas afecções renais. Poucos

estudos de cunho fitoquímico e farmacológico de *R. rosaefolius* Sm. foram publicados. Resultados preliminares demonstraram marcante atividade antimicrobiana em extratos e tinturas hidroalcoólicas e aquosos, tornando-os elegíveis como conservantes naturais de produtos cosméticos, como xampu, emulsão e gel (MAURO et al., 2002).

3.3. Estudo de citotoxicidade

Cultura de tecidos foi primeiramente descoberta no início do século XX, como um método para estudar o comportamento de células animais livres de variações sistêmicas, que podem envolver o animal durante a homeostasia normal e sobre o estresse de um experimento. Cultura de células refere-se às culturas derivadas de células dispersas retiradas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma espécie ou linhagem celular, por desagregação enzimática, química ou mecânica.

Culturas histotípicas implicam que as células são novamente associadas para recriar uma estrutura de tecido tridimensional, por perfusão e crescimento sobre monocamada, reagregação em suspensão ou infiltração de uma matriz tridimensional como gel de colágeno. Organotípicas utilizam o mesmo procedimento, mas recombina células de diferentes linhagens, como queratinócitos com cultura de fibroblastos (FRESHNEY, 2005).

As colônias formadas por células da epiderme humana são heterogêneas em sua capacidade de crescimento. Barrandon e Green (1987), classificaram os tipos de colônias, de acordo com o potencial de crescimento, em holoclones, meroclones e paraclones (**Figura 2**). Os holoclones têm alta capacidade reprodutiva, e sobre condições padrões, menos de 5% das colônias formadas por essas células são abortivas e diferenciadas. Paraclones contém células com curto período de replicação, e os meroclones são formados por uma mistura de células

com diferentes potenciais de crescimento, sendo considerados como estágio de transição entre holoclones e paraclones.

Figura 2. Colônias de queratinócitos humanos produzidas por diferentes clones (BARRANDON; GREEN, 1987)

A cultura celular de queratinócitos tem sido muito utilizada para testes de permeabilidade e irritação com produtos químicos. Modelos de cultura celular derivados de queratinócitos oferecem uma alternativa *in vitro* para diversos tipos de estudos. Eun e Jung (1994), empregaram cultura de queratinócitos humanos para avaliar o potencial de irritação de 05 xampus disponíveis no comércio. Os testes de MTT (brometo difenil tetrazólio) e LDH (liberação de desidrogenase láctica) foram utilizados para verificar a toxicidade celular. A cultura em monocamada de queratinócitos parece ser ideal para avaliar a irritação cutânea, pois são as células que entram em contato com as substâncias irritantes, durante a absorção percutânea. Os autores ainda sugerem que os dados obtidos através do método de cultura celular devem ser interpretados com cautela, quando comparados com os testes *in vivo*.

Para determinar a segurança de extratos vegetais, extensivos estudos toxicológicos *in vitro* e ensaios com animais devem ser realizados antes do desenvolvimento de novos fármacos (AJAIYEOBA et al., 2006).

Phillips (1995), explorou a técnica de cultura celular para testar a toxicidade de plantas, cujos produtos podem ter efeitos benéficos e tóxicos. Extratos vegetais foram avaliados em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO) e hepatócitos, utilizando o teste MTT. Outro estudo, realizado por Lin et al. (1996), utilizou epiderme de ratos albinos recém-nascidos para caracterizar o mecanismo de citotoxicidade do gás mostarda, causador de edema cutâneo. A cultura celular foi exposta ao agente irritante, sendo mantidas também culturas controle.

Estudos extensivos mostraram que a permeabilidade do modelo de queratinócitos de rato corresponde razoavelmente bem à pele humana. Neste estudo, culturas organotípicas com 3 semanas de idade e membrana epidérmica de cadáver humano foram utilizadas em estudos de permeabilidade. A avaliação foi feita através de coeficiente de permeabilidade e observação da presença de bolhas de ar e integridade das amostras (SUHONEN et al., 2003).

Monteiro-Riviere et al. (2004), utilizando queratinócitos humanos adultos, avaliaram a co-administração da substância P com um determinado combustível sobre a toxicidade ao epitélio dos pulmões. Foi utilizada cultura HEK (*human epidermal keratinocyte*) mantida em atmosfera úmida a 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico a 37°C.

Os queratinócitos humanos podem ser obtidos tanto da pele quanto da gengiva para obtenção de culturas utilizadas em estudos de citotoxicidade. No estudo realizado por Min et al. (2004), as amostras de queratinócitos orais foram retiradas de pacientes saudáveis durante cirurgia e posteriormente tratadas com CMF-HBSS (solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio) e digeridas com tripsina para separação do epitélio da mucosa e isolamento das células do tecido. Foram então obtidas culturas celulares NHOK (*normal human oral*

keratinocytes), e mantidas em condições semelhantes às demonstradas anteriormente.

Um estudo realizado por Pappinen et al. (2005), teve como objetivo caracterizar as culturas celulares organotípicas de queratinócitos de rato como um modelo tridimensional para avaliação de irritação dérmica. Um bom modelo *in vitro* deve simular adequadamente a pele como barreira e suas funções metabólicas. Neste estudo, utilizou-se cultura celular de ratos recém nascidos, crescendo em meio essencial mínimo (MEM) composto por soro fetal bovino (FBS) 10%, L-glutamina 4 mM, penicilina 50 U/mL, sulfato de estreptomicina 50 µg/mL e mantida a 37 °C e 5% de gás carbônico. Os queratinócitos foram semeados em suporte de colágeno e cresceram em MEM para a realização de testes de irritação. Predizer a irritação cutânea de novas substâncias é necessário antes que os seres humanos sejam expostos ao agente.

A cultura celular de queratinócitos humanos é muito importante nos estudos de toxicidade de substâncias químicas, sendo utilizada para caracterizar irritação local ou até mesmo problemas mais graves, como efeitos do agente em estudo sobre a expressão de proteínas. Witzmann et al. (2005), apresentaram um estudo que avaliou o efeito da exposição a um determinado combustível através da utilização de queratinócitos de humanos recém-nascidos, preservados por congelamento. A cultura das células foi realizada com meio de cultura de queratinócitos livre de soro (KGM-2) e mantida em atmosfera úmida a 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico a 37°C. Após a exposição ao agente químico, foi feita análise por eletroforese.

A cultura celular de queratinócitos da epiderme de ratos pode ser utilizada para estudos relacionados à terapia gênica. É uma cultura celular adequada por apresentar células diferenciadas com estrato córneo, e por realizar a expressão dos genes introduzidos, ao contrário de tecidos mortos. Neste estudo, foi utilizada uma linhagem de células derivadas da epiderme de ratos recém-nascidos,

cultivada em meio essencial mínimo (MEM) para transfecção com plasmídeo (PAASONEN et al., 2006).

A derme, estrutura colágena com configuração natural para o crescimento de queratinócitos *in vivo*, foi considerada por vários pesquisadores como camada de suporte para o cultivo de queratinócitos. De forma a melhorar seu crescimento e possibilitar o uso como um equivalente dermo-epidérmico, foi instituído o cultivo na interface ar-líquido, situação esta mais próxima a do ser vivo (RÉGNIER; DARMON, 1989).

Equivalentes dermo-epidérmicos elaborados de diversas formas, têm sido empregados como modelos de pele humana *in vitro* para o estudo da fisiologia das células da pele em geral e sua interação, da fisiologia da barreira córnea, em estudos das patologias cutâneas, em modelos experimentais de rejeição a transplantes e seus mecanismos imunológicos, para avaliação dos efeitos de fármacos e produtos cosméticos sobre a pele, substituindo os experimentos em animais (HERSON, 1999; REGNIER et al., 1993).

A tecnologia de produção de tecidos da pele emprega matrizes sintéticas biodegradáveis, fornecendo uma terapia avançada no tratamento de ferimentos cutâneos agudos e crônicos. Através do *design* e da incorporação de agentes terapêuticos específicos na *pele substituta*, a cura dos ferimentos pode ser encontrada (DAI et al., 2005).

A engenharia de enxertos cutâneos obtidos de cultura de células da pele e biopolímeros permitem utilizar menor quantidade de tecido do doador que nos procedimentos convencionais. Queratinócitos e fibroblastos autólogos isolados de pele podem ser combinados com substratos de colágeno para gerar o cultivo de uma *pele substituta*. Esses benefícios podem ser estendidos para ferimentos crônicos e cirurgias reconstrutivas (BOYCE, 2004). Na **Figura 3** observa-se o processo geral para obtenção de uma *pele substituta*, onde queratinócitos e fibroblastos são isolados a partir de uma biopsia de pele. Melanócitos e células

endoteliais microvasculares da derme também podem ser isolados e inoculados em cultura seletiva. Após obtenção de uma grande população de células cutâneas, as mesmas são inoculadas em substrato de colágeno e glicosaminoglicana (GAG). Em seguida, a cultura em interface ar-líquido promove diferenciação epidérmica e morfogênese como na pele humana análoga, podendo ser transplantada e utilizada como enxerto cutâneo.

Figura 3. Diagrama do processo geral de cultivo de *pele substituta* (adaptado de BOYCE, 2004)

Em busca de uma *pele substituta* ideal, várias pesquisas foram feitas durante o desenvolvimento de um enxerto cutâneo. Uma tentativa foi desenvolver uma pele equivalente composta de uma matriz de colágeno com fibroblastos viáveis e uma camada de equivalente dérmico coberta com queratinócitos viáveis.

O sucesso da pesquisa depende da viabilidade dos fibroblastos e da aderência dos queratinócitos na superfície do enxerto equivalente cutâneo (EHRICH, 2004).

Kamolz et al. (2005), desenvolveram um sistema de cultura de queratinócitos em um equivalente dérmico adequado para cobrir ferimentos na pele. A matriz dérmica foi elaborada com um gel de fibrina colante e fibroblastos de pele humana. A cultura primária de queratinócitos foi obtida de pele de doadores adultos ou de pacientes com queimaduras e cultivados no gel. Esse sistema pode ser um importante passo no revestimento da pele de pacientes gravemente queimados, devido ao curto período de cultura, o uso de um gel disponível comercialmente e a manipulação versátil dos componentes da cultura celular.

Sun, Haycock e MacNeil (2006), desenvolveram um sistema tridimensional de cultivo de células, utilizando gel de fibrina que permite monocultura e cultura de diferentes tipos celulares, como fibroblastos e queratinócitos da pele humana.

Benavides et al. (2004), avaliaram o potencial de irritação e fotoirritação de novos tensoativos, utilizando métodos *in vitro* como alternativa para os testes em animais. Células imortalizadas de linhagem 3T3 de fibroblastos murino e de queratinócitos humanos foram modelos empregados e a citotoxicidade medida por ensaio de vermelho neutro e resazurina.

Viox-Chagnoleau et al. (2006), avaliaram os efeitos da radiação ultravioleta UVA e UVB em queratinócitos e fibroblastos, utilizando pele humana reconstruída *in vitro*. O equivalente dérmico foi obtido de uma mistura de colágeno tipo I e fibroblastos humanos, conforme esquematizado na **Figura 4**. Vitamina C foi adicionada durante o período de cultura, otimizando a formação da junção derme-epiderme, aumentando a quantidade de fibroblastos e contribuindo para a formação de epiderme plenamente diferenciada em 7 dias de imersão. Formulações fotoprotetoras foram aplicadas antes da exposição à radiação e o seu efeito protetor contra os danos causados pela radiação UV foi avaliado em

vários intervalos de tempo. Uma análise comparativa entre as situações *in vivo* e *in vitro* mostrou que os efeitos da dose UVB são similares em ambos os sistemas.

Figura 4. Representação esquemática de pele reconstruída *in vitro*. Cortes histológicos de pele humana e pele reconstruída em 7 dias de exposição ao ar (adaptado de VIOX-CHAGNOLEAU et al., 2006)

3.4. Desenvolvimento e estabilidade de formulações cosméticas

Diversos fatores podem interferir no desenvolvimento de produtos cosméticos, tais como composição qualitativa e quantitativa, características físicas e químicas, estudos de eficácia e de segurança das matérias-primas e substâncias ativas; avaliação das possíveis incompatibilidades na formulação; estabelecimento das especificações técnicas do produto final (SCHUELLER; PERRY, 2002; SIMMONS, 2000). Após a escolha das formulações é importante realizar testes de estabilidade em diversas condições de temperatura, luminosidade e umidade (BRASIL, 2004).

A incorporação de extratos vegetais em bases cosméticas requer estudo criterioso e deve-se considerar a compatibilidade do sistema, cuidando-se do armazenamento do extrato, da escolha dos solventes utilizados na sua dispersão, da temperatura de incorporação na formulação e do material de acondicionamento ou embalagem final. Deve-se garantir a estabilidade da formulação durante todo o período do prazo de validade, mantendo suas características dentro das especificações previamente estabelecidas (BABY et al., 2005; BANOVA, 2002).

As bases cosméticas utilizadas nesta pesquisa envolveram as formas cosméticas: emulsão (creme), gel e xampu.

As emulsões cosméticas são constituídas por duas ou mais fases, aquosa e oleosa, onde uma se dispersa em outra por meio de um tensoativo adicionado à formulação e que se interpõe entre as fases. Os componentes da formulação se distribuem, de acordo com sua solubilidade, sendo comumente utilizados água deionizada ou destilada, óleos, gorduras, tensoativos (não-iônicos são os mais empregados), espessantes, umectantes, estabilizantes (antioxidantes, corretivos de pH e conservantes), perfume, corante e substâncias ativas. Quanto à fluidez e a área anatômica aplicada, podemos classificar as emulsões como leite, loção e creme. Podem, também, ser classificadas segundo a função (relacionada aos componentes); aspecto físico; tipo de sistema óleo em água (O/A), água em óleo (A/O), emulsão múltipla (O/A/O e A/O/A) e proporção de fase oleosa e aquosa. O sistema clássico de preparo de emulsões envolve o aquecimento das fases a 70-75 °C, mistura sob agitação e resfriamento adicional (LEONARDI, 2004; SIMONS, 2000). Atualmente, há disponíveis no mercado tensoativos poliméricos, que permitem a formação de emulsões a frio, facilitando o preparo.

A forma cosmética gel é constituída de um sistema semi-sólido, formado por uma rede de macromoléculas com fase líquida (oleosa ou aquosa) em seu interior, e que forma uma dispersão de partículas de dimensão coloidal, conferindo aspecto viscoso. Dentre as substâncias utilizadas como geleificantes neste tipo de formulação podem-se citar derivados de celulose (hidroxietil, metil e

carboximetilcelulose) e do ácido acrílico, silicatos coloidais de alumínio/magnésio (bentonita e Veegum[®]), alginatos e polivinilpirrolidona. A forma gel pode ser utilizada em formulações para o rosto, cavidade oral, cabelo e corpo. Pode-se formular géis aquosos e oleosos, sendo os aquosos os mais utilizados em produtos cosméticos, pois contém em sua formulação apenas a fase aquosa, sendo indicado para peles sensíveis e oleosas, como gel pós-sol e pós-barba e máscara *peel-off*. (DRAELOS, 1999; LEONARDI, 2004).

O xampu é um produto cosmético que possui como função principal limpar o couro cabeludo e os cabelos do sebo, microrganismos, resíduos ambientais e de produtos. A limpeza deve ser seletiva e preservar certa quantidade de sebo que recobre os fios e o couro cabeludo, lubrificando-os. Como benefício adicional, o xampu pode propiciar o condicionamento dos fios, envolvendo as propriedades de maciez, brilho, volume e facilidade de pentear o cabelo molhado e seco, dentre outras (WILKINSON; MOORE, 1990).

Dentre os tensoativos empregados, tem-se os aniônicos como os mais empregados no preparo dos xampus (principalmente de uso adulto), que atuam como agente de limpeza e formadores da espuma, sobreengordurantes, doadores de viscosidade, estabilizantes da espuma, conservantes, corretivos do pH, perfume, corantes, agentes perolizantes ou opalescentes. Podem se apresentar na forma líquida transparente, perolada ou opalescente, creme, pó e aerossol (LEONARDI, 2004; SIMMONS, 2000).

Na seqüência do desenvolvimento de um produto cosmético é importante a avaliação das características do produto de forma rápida e que possa prever informações sobre seu comportamento durante o prazo de validade, que são fornecidas pelas diversas etapas do estudo de estabilidade (BRASIL, 2004; SCHUELLER; PERRY, 2002).

A estabilidade pode ser definida como a capacidade de um produto contendo ou não substâncias ativas, de manter suas propriedades físicas,

químicas, microbiológicas, toxicológicas e bioativas, dentro dos limites especificados previamente durante todo seu prazo de validade, pois esses produtos quando comercializados passam por um sistema de estocagem e distribuição e podem ser submetidos ao calor prolongado e a umidade. Um produto é considerado estável quando não altera suas características, além do previsto pelas especificações técnicas, durante o período de prazo de validade. Considerando o foco do produto cosmético, a avaliação das características organolépticas é considerada relevante e interfere na decisão de compra e adesão do consumidor (BRASIL, 2004; MORETTO, 1999).

3.5. Utilização de conservantes de origem vegetal em produtos cosméticos

A indústria cosmética tem dois grandes desafios, como a eliminação de testes em animais e o desenvolvimento de produtos cosméticos sem conservantes. Recentemente, uma forte pressão socioeconômica focou interesse na pesquisa e desenvolvimento de produtos livres de conservantes e também conservação baseada em extratos naturais. Os testes *in vitro* devem ser utilizados para confirmar a segurança de agentes biocidas, visto que os conservantes naturais são uma mistura complexa de muitos agentes químicos desconhecidos (TORO et al., 1996).

A segurança microbiológica de produtos farmacêuticos e cosméticos é de especial interesse para as indústrias, pois a contaminação microbiana pode ocasionar a degradação do produto ou, em caso de patógenos, constituir um risco à saúde do consumidor (BLOOMFIELD, 1990).

A ciência da conservação de produtos farmacêuticos e cosméticos é relativamente nova, sendo que inicialmente foi obtida com agentes germicidas, apesar dos riscos envolvidos. O objetivo primário do sistema conservante, quando incorporado à formulação, é eliminar microrganismos que alteram a estabilidade

do produto ou que podem ocasionar infecções, e em paralelo, o conservante não deve apresentar característica tóxica ou irritante ao usuário. Assim, a seleção do agente antimicrobiano ideal torna-se uma tarefa bastante difícil para a indústria farmacêutica e cosmética (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, bem como a concentração máxima de uso autorizada, limitações, condições de uso e advertências está descrita na Resolução RDC n° 162 de 11 de setembro de 2001 (BRASIL, 2001).

O conservante ideal deve ser estável, compatível com outras matérias-primas, ativo contra microrganismos em baixas concentrações e em ampla faixa de pH, além de ser não tóxico, não irritante e não sensibilizante. Poucas substâncias reúnem todas essas características, sendo que a maioria pode causar algum tipo de alergia quando presente em produtos cosméticos (SASSEVILLE, 2004).

Flores et al. (1997), isolaram várias espécies de *Bacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* de 42 produtos cosméticos. Alguns microrganismos isolados foram resistentes à mistura de conservantes avaliados, como parabenos, Germal® e fenoxietanol. Todos os microrganismos foram resistentes ao metilparabeno isolado, o que pode justificar o fato da indústria cosmética utilizar combinações de diferentes conservantes em altas concentrações para obtenção de formulações mais protegidas de contaminação microbiana.

A contaminação microbiana é ainda uma das maiores causas de devolução de produtos, principalmente em países tropicais em desenvolvimento (OKEKE; LAMIKANRA, 2001).

Métodos oficiais para avaliar a efetividade do sistema conservante são descritos em várias farmacopéias. O teste de eficácia conservante consiste em introduzir no produto analisado, bactérias Gram-negativas, Gram-positivas,

leveduras e bolores, em quantidades suficientes para obter informações cinéticas de perda da viabilidade celular. Adicionalmente, são considerados no teste, os microrganismos potencialmente contaminantes do produto durante o uso e aqueles detectados no ambiente de produção (ZANI et al., 1997).

Campana et al. (2006), avaliaram a contaminação microbiana de vários produtos cosméticos em três diferentes estágios de uso. Além disso, verificaram a eficácia de conservantes freqüentemente utilizados em formulações cosméticas através de três testes, CTFA (*Cosmetics, Toiletries, and Fragrance Association*), FUI (*Official Italian Pharmacopeia*) e RCT (*Rapid Challenge Test*).

O FDA (*The Food and Drug Administration*) exige que a fabricação de produtos cosméticos forneça produtos seguros, que não podem conter níveis inaceitáveis de microrganismos durante a sua compra e utilização. Embora o FDA não possui um teste de eficácia conservante reconhecido em produtos cosméticos, vários testes para determinar a eficácia de conservação de substâncias estão disponíveis (FARRINGTON et al., 1994).

A estabilidade microbiológica de produtos cosméticos é garantida através de conservantes químicos, substâncias com possíveis efeitos como irritação ou alergia cutânea, bastante descritos.

O produto cosmético ideal deve ser efetivo e desprovido de potencial irritante ou sensibilizante. No entanto, há muitos ingredientes cosméticos que causam reações adversas, como os conservantes e fragrâncias. Ésteres de ácido p-hidroxibenzóico (parabenos) são conservantes muito freqüentemente utilizados, podendo causar irritação cutânea quando incorporados em produtos cosméticos. Lee et al. (2007), investigaram os efeitos secundários de conservantes em produtos cosméticos, por avaliação de irritação cutânea objetiva e subjetiva. O potencial de irritação de várias combinações de conservantes foi comparado em 4 diferentes formulações, utilizando 15 voluntários por 21 dias consecutivos.

Parabenos são comumente utilizados em cosméticos, e não são irritantes quando comparados com outros conservantes, como formaldeído e isotiazolinonas.

Ésteres de parabenos são conservantes não tóxicos e não irritantes e são efetivos contra bactérias Gram-positivas e fungos, porém não tem ação contra várias bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas*. Parabenos são largamente utilizados em produtos tópicos, sendo conhecidos por causar alergia de contato em altas concentrações e em uma baixa frequência. Embora novos parabenos estejam disponíveis, é improvável que eles possam reduzir as reações adversas, pois os consumidores tendem a mostrar uma reatividade cruzada para todos parabenos. Afortunadamente, os parabenos quando comparados com o uso total, possuem notável recorde de segurança. Embora parabenos possam ser ocasionalmente sensibilizantes quando aplicados em pele com eczemas, produtos cosméticos contendo parabenos raramente causam problemas clínicos quando aplicados em pele normal (SASSEVILLE, 2004; TORO et al., 1996).

Diversos produtos cosméticos, contendo parabenos, são aplicados na superfície da pele, cabelos e mucosas, sem restrição de quantidade e área de aplicação, sendo que em longo prazo e com o uso freqüente podem ficar retidos no tecido, aumentando o risco potencial ao consumidor. Hussein et al. (2007), avaliaram a passagem de parabenos, presentes em uma loção cosmética, em fragmentos de pele obtidos por intervenção cirúrgica, através de células de Franz. Constataram que parabenos em formulações cosméticas podem ser absorvidos pela pele intacta e se acumularem no estrato córneo, diminuindo a capacidade de proliferação de queratinócitos, causando toxicidade sistêmica. No estudo, as moléculas menos liberadas no fluido receptor são as mais lipofílicas (butilparabeno).

Sivasegaran et al. (2007), utilizaram cultura bovina *in vitro* para avaliar a irritação ocular causada por parabenos e verificaram que o tratamento com butilparabeno 0,2% foi o mais irritante no teste.

Imidazolidinil uréia (Germall[®] 115) possui baixa toxicidade e não é irritante. Possui ampla atividade antimicrobiana, principalmente quando utilizado em combinação com parabenos. Quaternário 15 é ativo contra bactérias e menos ativo contra leveduras e bolores, pode ser tolerado na concentração de 0,02-0,3% quando presente em produtos cosméticos. Formaldeído como conservante é utilizado quase exclusivamente em produtos de enxágüe como os xampus, dessa maneira é raramente a causa de sensibilização no consumidor.

Kathon[®] CG é o conservante de escolha em produtos de enxágüe devido sua larga aplicação e facilidade de manipular. É incorporado em produtos condicionadores e em alguns produtos cosméticos *leave-on* sob restrição de concentração, embora induziu sensibilização em cobaias, este conservante raramente produz sensibilização quando usado em xampus. Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona causaram várias reações adversas quando investigados (TORO et al., 1996).

Após as fragrâncias, os conservantes são a causa mais comum de reações por produtos cosméticos. Estudos específicos apontaram os conservantes com potencial sensibilizante, diretamente responsáveis por reações adversas (ORTIZ; YIANNIAS, 2004). Portanto, é importante buscar alternativas para modificar o sistema conservante, como, por exemplo, utilizando métodos físicos de conservação, através da propriedade osmótica de hidrogéis, que absorvem a água necessária para a sobrevivência de microrganismos (LINTNER; GENET, 1998).

Recentemente, há uma tendência em conservação de produtos cosméticos, para evitar o uso de agentes químicos, conduzindo os pesquisadores a buscarem alternativas antimicrobianas naturais (SEO et al., 2002).

Praticamente ocorreu mundialmente o surgimento de fitoterápicos e ingredientes ativos isolados de plantas medicinais para a prevenção e tratamento de várias doenças. As plantas sustentam a indústria farmacêutica como uma das mais importantes fontes de compostos, sendo que mais de 40% de drogas

utilizadas são derivadas de fontes naturais, sendo a substância natural ou a versão sintetizada (JASSIM; NAJI, 2003).

Hammer et al. (1999), confirmaram que muitos óleos essenciais e extratos vegetais possuem atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro*. No entanto, para a utilização com a finalidade de conservação de medicamentos e alimentos, a segurança e toxicidade devem ser avaliadas.

Maccioni et al. (2002), testaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais isolados ou em combinação com metil-p-hidroxibenzoato, um conservante normalmente utilizado em formulações cosméticas. A confirmação da eficácia do sistema conservante foi através do teste desafio, que consiste em simular uma contaminação da amostra com quantidade apropriada de microrganismos. As suspensões padrões preparadas representam espécies microbianas normalmente encontradas em produtos cosméticos e materiais de acondicionamento, introduzidas durante o uso pelo consumidor ou comumente associadas com infecções. As propriedades de sinergismo entre os óleos essenciais estudados, principalmente contra bactérias Gram positivas, são capazes de reduzir a quantidade de conservante químico em formulações cosméticas. O fato de bactérias Gram positivas serem mais sensíveis ao sistema conservante testado em todas as formulações (creme, gel), pode ser devido à estrutura menos complexa e a composição dessas células, mais permeáveis aos componentes com ação antimicrobiana. A capacidade de *Candida albicans* produzir esporos pode explicar sua resistência ao sistema conservante testado.

Nostro et al. (2004), verificaram a eficácia do óleo essencial de *Calamintha officinalis* como conservante natural em creme e xampu. O teste desafio foi executado de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Européia, e os resultados demonstraram que o óleo essencial estudado na concentração de 2,0% (v/v) reduz satisfatoriamente a carga inicial inoculada, de acordo com o critério A (redução de 03 ciclos log do inóculo com 07 dias de desafio sem aumento até 28 dias) e B (redução de 03 ciclos log do inóculo com 14 dias de desafio sem

aumento até 28 dias) do compêndio oficial, para as formulações creme e xampu respectivamente, comprovando a influência da formulação na eficácia antimicrobiana do óleo essencial de *Calamintha officinalis*. Embora a formulação xampu tenha uma atividade antimicrobiana intrínseca, devido à presença de tensoativos, a afinidade do óleo essencial com a micela pode ter diminuído sua disponibilidade e neutralizado parcialmente sua atividade antimicrobiana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização botânica de *R. rosaefolius* Sm.

A caracterização botânica macroscópica e microscópica de *R. rosaefolius* Sm, foi realizada através da análise de cortes transversais de caule, folíolo (limbo e pecíolo), raiz e paradérmicos de limbo.

O material estudado foi coletado no Horto Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas Oswaldo Cruz, procedente de mudas obtidas na Serra da Cantareira, em São Paulo, S.P. Exsicata do material foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica (Secretaria de Agricultura, São Paulo), sob o número SP 259063.

O material foi submetido à fixação com F.A.A. (formaldeído 37% (v/v): ácido acético glacial: etanol: 2:1:1) e armazenado em etanol 70% (v/v) (OLIVEIRA; AKISUE, 1991).

Cortes transversais de raiz, caule e folíolo (limbo e pecíolo) e paradérmicos de limbo foliar, foram feitos a mão livre, clarificados em solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v), corados com Azul de Alcian e Fucsina Básica (9:1, solução aquosa a 1% p/v) e montados em lâminas semi-permanentes com glicerina 50% (v/v).

Para este estudo, empregou-se microscópio óptico binocular Coleman, modelo XSZ – 107 BN. O material foi fotografado com a utilização de um fotomicroscópio Karl Zeiss Jena, Jenamed 2 Histology. Desenhos foram feitos em câmara clara Coleman, acoplada ao microscópio mencionado acima.

4.2. Obtenção do extrato bruto e das frações a partir das folhas da planta

O extrato bruto da planta e as frações foram obtidos conforme fluxograma abaixo:

Fluxograma 1. Representação esquemática da obtenção do extrato bruto e das frações a partir das folhas de *R. rosaefolius* Sm.

As folhas foram previamente dessecadas em estufa com temperatura controlada e circulação de ar, divididas e pulverizadas em moinho de facas (TE 625 Tipo Cróton Tecnal).

Para a obtenção do extrato bruto, pesaram-se as folhas pulverizadas (aproximadamente 60 g) e extraiu-se com etanol 92% em extrator automático (ASE 300 Dionex) a 70 °C com um ciclo de extração de 15 minutos. Em seguida, levado ao Rotor-evaporador (Rotavapor Buchi R-114), com a condição de pressão reduzida e temperatura inferior a 50 °C, para retirar o solvente. Após essa etapa o extrato foi colocado em banho de água (Waterbath B-480) para retirar a água residual.

Para a obtenção das frações, colocaram-se 50 mL do extrato hidroalcólico e 200 mL de água destilada no funil de separação de 1000 mL. Iniciou-se a extração com o solvente mais apolar na seguinte ordem: hexano, clorofórmio,

acetato de etila e butanol (Synth). Repetiu-se o processo de extração por 3 vezes consecutivas com 50 mL de cada solvente. Cada fração foi levada ao rotor-evaporador (à pressão reduzida e temperatura inferior a 50 °C) para retirar o solvente e posteriormente ao liofilizador (Micro Modulyo com bomba de vácuo BOC EDWARDS modelo E2MS), para retirar a água residual.

4.3. Determinação da atividade antimicrobiana de *R. rosaefolius* Sm.

4.3.1. Validação do método por meio da recuperação dos microrganismos na mistura de solventes utilizados

Para recuperação dos microrganismos na mistura de solventes (U.S. Pharmacopoeia, 2008), utilizou-se microplacas com 96 orifícios (poços) divididos em 12 colunas com 08 poços cada.

Nas duas primeiras colunas foram adicionados 200 µL de meio de cultura TSB (caldo caseína soja, Difco) inoculado com o microrganismo teste (controle de crescimento). As colunas restantes foram destinadas ao ensaio de recuperação, e em cada coluna foram adicionados 20 µL da mistura de solventes analisada e 180 µL de meio TSB (caldo caseína soja) inoculado.

Após incubação de 24 horas a 35-37 °C (estufa Nova Ética 410/NDR) foi realizada a leitura das microplacas a 630 nm por espectrofotometria com detector de Elisa (Leitor de Microplacas LM-LGC, LGC Biotecnologia).

Para cada microrganismo em teste, foram realizadas no mínimo 03 réplicas com 03 repetições consecutivas.

4.3.2. Microrganismos testados

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)

Escherichia coli (ATCC 10536)

Candida albicans (ATCC 10231)

Aspergillus niger (ATCC 16404)

As cepas microbianas liofilizadas foram adquiridas da Seção de Coleção de Culturas do Instituto Fiocruz. As cepas liofilizadas foram ressuspensas em solução salina 0,85% (p/v) estéril, em seguida, ativadas transferindo a suspensão para caldo nutritivo, com incubação adequada. A partir de cada cepa foram realizados no máximo 05 repiques, renovados mensalmente.

4.3.3. Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura (Difco) utilizados foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, caldo e ágar de caseína soja (TSB e TSA) e ágar e caldo de Sabouraud dextrose a 4% (SDA e SDB).

4.3.4. Preparação e avaliação da viabilidade do inóculo

A partir de culturas estoques, as bactérias foram repicadas em estrias na superfície de meio de cultura ágar caseína soja inclinado e incubadas a 35-37 °C por 24 horas. Os fungos foram repicados em meio de ágar Sabouraud dextrose 4%, incubados a 20-25 °C por 48 horas para levedura e por sete dias para bolor.

A massa celular resultante do crescimento foi recolhida em 9 mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril e a suspensão obtida foi padronizada através de diluições decimais seriadas.

A partir da suspensão padronizada de cada microrganismo, foram efetuadas as diluições necessárias com solução salina estéril e caldo nutritivo para se obter soluções com concentração de 10^4 a 10^6 UFC/mL do microrganismo em teste. Efetuou-se o plaqueamento da diluição microbiana para confirmação da viabilidade do inóculo, que se mostrou efetivo por 5-7 dias, possibilitando 03 repetições consecutivas com a mesma suspensão microbiana.

4.3.5. Preparação das soluções padrões dos antibióticos

Foram obtidas soluções aquosas de padrões secundários de cloranfenicol, amicacina e nistatina (controles positivo) na concentração de 1,0 mg/mL. A cada experimento as soluções foram desafiadas frente aos microrganismos testados e o resultado foi considerado o controle positivo de atividade antimicrobiana.

4.3.6. Ensaio da concentração mínima inibitória (MIC)

O procedimento para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) pela técnica de diluição em meio líquido utilizando microplacas é uma adaptação do procedimento que utiliza tubos, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 μ L (ELOFF, 1998). A microplaca utilizada possui 96 orifícios (poços) divididos em 12 colunas com 8 poços cada. As quatro primeiras colunas foram utilizadas como controles do teste (controle do meio de cultura, controle do solvente, controle do crescimento e controle positivo).

Na primeira coluna foram adicionados 200 µL de meio de cultura TSB ou SDB, na segunda coluna, 180-190 µL de meio e 10-20 µL de solvente (DMSO: metanol 50:50) (controle do solvente), na terceira coluna foram adicionados 200 µL de meio de cultura inoculado com o microrganismo teste (controle de crescimento) e na quarta coluna foram adicionados 10 µL da solução de antibiótico correspondente e 190 µL de meio de cultura inoculado com o microrganismo em estudo (controle positivo de atividade antimicrobiana).

As colunas restantes foram destinadas ao ensaio propriamente dito, sendo uma coluna destinada ao controle do extrato (com meio de cultura sem inóculo) e as outras colunas para cada amostra testada. Em cada coluna adicionou-se 10-20 µL da amostra e 180-190 µL de meio TSB ou SDB inoculado, de acordo com o microrganismo teste.

Após incubação de 24 horas a 35 °C para bactérias ou 48 horas a 25 °C para fungos, foi realizada a leitura das microplacas por espectrofotometria com detector de Elisa a 630 nm.

Para cada microrganismo em teste, foram realizadas no mínimo 03 réplicas com 03 repetições consecutivas.

4.4. Teste de toxicidade *in vitro* do extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm.

Os ensaios foram realizados sob condições assépticas, em ambiente controlado, utilizando materiais e reagentes esterilizados, no laboratório do Centro de Tecnologia das Radiações – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR –IPEN- CNEN/SP).

4.4.1. Preparação das células

Fibroblastos

As células CCL 92 (Swiss Albino Embryo Fibroblast Mouse lote 4136021, ATCC) foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina-estreptomicina (50 UI/mL, 50 µg/mL) e glutamina (4 mM) (Gibco BRL). Foram incubadas a 37 °C, em atmosfera de 97% de umidade relativa e 5% de CO₂ (Fischer Scientific), até atingirem a subconfluência, depois foram irradiadas com radiação gama 60 Gy (6000 rads) para a utilização como camada de sustentação para os queratinócitos ("feeder layer").

Queratinócitos

Queratinócitos foram obtidos de culturas primárias de biópsias de cirurgia de redução mamária cedidas pelo banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEP/FCF/USP/ n° 229).

Queratinócitos de epiderme humana foram cultivados a partir de biópsias de pele de aproximadamente 2,0 cm². As peles foram cortadas em pequenos fragmentos e tripsinizadas [(tripsina 0,05% (p/v); EDTA 0,02% (p/v) e glicose 0,01% (p/v)] sob agitação branda a 37 °C por 3 horas, separando as células liberadas a cada meia hora. As células foram colocadas em cultura a 37 °C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO₂, sobre uma camada de fibroblastos irradiados, correspondendo a "P0", isto é, passagem zero (cultura primária). Ao atingirem a subconfluência, estas células foram tripsinizadas e congeladas ou utilizadas para os testes. Para o congelamento, estas células foram colocadas em solução criopreservante [dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v), soro fetal bovino 30% (v/v) e meio KGM (Keratinocyte Growth Medium) sem EGF (epidermal growth

factor; Sigma) 60% (v/v)] em tubos resistentes a baixas temperaturas e estes acondicionados em recipiente apropriado (contendo álcool isopropílico PA; Vetec) em freezer -80°C por 24 horas, sendo depois armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

As células em suspensão foram semeadas (aproximadamente $6,0 \times 10^3$ células/cm²) em uma camada de sustentação de fibroblastos CCL 92, e cultivadas em KGM a 37°C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO₂. O KGM é constituído por Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e Ham's F12 (nutrient mixture; Gibco) (proporção de 2:1), contendo 10% de soro fetal bovino, glutamina (4 mM), penicilina-estreptomicina (50 UI mL⁻¹), adenina (0,18 mM), insulina (5 µg mL⁻¹), hidrocortisona (0,4 µg mL⁻¹), toxina colérica (0,1 nM), triiodotironina (20 pM) e EGF (10 ng/mL) (Sigma). Esse é o meio de cultura rotineiramente utilizado na reconstituição *in vitro* de epiderme e mucosa.

Culturas subconfluentes foram tripsinizadas e passadas em densidades variadas segundo as necessidades de cada experimento. Esta propagação pode ser efetuada por diversas vezes consecutivas, sendo denominadas de passagens ou repiques.

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

Foram semeados em triplicata, em poços de placas de 96 poços, queratinócitos em quantidades crescentes variando de 2.500 a 50.000 células (sem a camada de sustentação) e incubados por um período de 72 horas a 37°C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO₂. Esse período corresponde ao tempo total de ensaio de viabilidade celular.

Após o período de incubação, as células foram coradas com o corante não vital Rodamina B ($C_{28}H_{31}C_1N_2O_3$), que é incorporado tanto nas células vivas quanto nas mortas. As células foram coradas por 20 minutos com solução a 2% (p/v) em formaldeído 4% (v/v), sendo posteriormente lavadas com água corrente até a eliminação total do excesso de corante (MATHOR, 1994).

4.4.3. Avaliação da interferência dos solventes no teste de viabilidade celular

Foram semeados em triplicata, em poços de placas de 96 poços, queratinócitos em quantidades estabelecidas de acordo com o resultado do **item 4.4.2.** (sem a camada de sustentação) e incubados por um período de 24 horas a 37 °C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio KGM contendo quantidades crescentes da mistura de solventes testada, metanol e polietilenoglicol 400 (Synth) e então a placa foi novamente incubada por 48 horas, nas mesmas condições.

Após o período de incubação, as células foram coradas com solução de Rodamina B conforme descrito no **item 4.4.2.**

4.4.4. Avaliação da viabilidade celular

Preparou-se solução estoque do extrato das folhas de *R. rosaefolius* Sm. na concentração 200 mg/mL, solubilizando-se o extrato bruto em metanol e polietilenoglicol 400 (PEG 400), na proporção de 1:1. Foram feitas diluições da solução estoque em meio KGM de forma a obter as seguintes concentrações: 0,5 mg/mL; 0,75 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,5 mg/mL e 2,0 mg/mL.

Preparou-se solução estoque do conservante sintético Phenonip[®] (mistura de parabenos e fenoxietanol, PharmaSpecial) na concentração de 20 mg/mL em meio KGM, a seguir foram feitas diluições de forma a obter as concentrações: 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 2,0 mg/mL; 5,0 mg/mL e 10 mg/mL. Assim,

obteve-se a curva padrão de controle positivo do ensaio de viabilidade celular, seguindo o mesmo procedimento descrito para as amostras do extrato.

Com o intuito de se quantificar a proliferação das células, aplicou-se o método colorimétrico intitulado “*CellTiter 96™ AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*”, ensaio aquoso não radioativo de proliferação celular (PROMEGA CORPORATION, 2001). Esse método baseia-se no seguinte princípio, o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) é biorreduzido pelas enzimas desidrogenases, encontradas nas células ativas de queratinócitos, a um produto (formazana) que é solúvel no meio de cultura celular e que absorve fortemente a 490 nm. Desta forma, a absorbância da formazana pode ser medida diretamente nos poços da placa de 96 poços, sem nenhum processo adicional. A quantidade de formazana medida pela absorbância da solução a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células vivas, em cultura (PROMEGA CORPORATION, 2001). Empregou-se também a coloração com Rodamina B ($C_{28}H_{31}C_{11}N_2O_3$), para visualização das células de queratinócitos.

Para preparação da solução de MTS/PMS em KGM, soluções de MTS e PMS (tampão específico) foram descongeladas em banho termostaticado, a 37 °C, por 10 minutos. Para se obter solução suficiente para uma placa de 96 poços, transferiram-se 2,0 mL de solução MTS para um tubo de fundo cônico contendo 10,5 mL de meio de cultura celular (KGM). Em seguida, adicionaram-se 100 µL de solução PMS e agitou-se a solução vigorosamente.

Para o teste de viabilidade celular, os experimentos foram preparados semeando-se uma alíquota correspondente a aproximadamente 25.000 queratinócitos obtidos a partir de uma cultura primária, em placas de 96 poços com meio KGM. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa de atmosfera controlada a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, por 24 horas. Decorrido este período, adicionaram-se as amostras resultantes das diluições da

solução estoque do extrato descritas anteriormente, aos poços das placas, que foram divididos em triplicatas. Finalmente, incubaram-se as placas em estufa de atmosfera controlada, observando-se o comportamento das células periodicamente, por 6, 12, 24 e 48 horas. Após a retirada da última amostra (48 horas de contato), o meio foi retirado e adicionaram-se alíquotas de 120 µL da solução MTS/PMS em KGM em todos os poços de uma das placas, a qual foi imediatamente acondicionada em estufa de atmosfera controlada a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, por 2 horas. Decorrido este período inicial, foram realizadas medidas de absorbância, a 490 nm, em espectrofotômetro de placa de ELISA acoplado a impressora. A outra placa, submetida ao mesmo procedimento, foi corada com solução 2% (p/v) de Rodamina B em formaldeído 4% (v/v) por 20 minutos, sendo posteriormente lavada com água corrente até a eliminação total do excesso de corante.

4.5. Estudo de estabilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm.

As formulações cosméticas avaliadas (creme A, creme B, gel A, gel B, xampu A, xampu B) quanto à estabilidade física e físico-química, no estudo de estabilidade, estão descritas nas **Tabelas 1 a 6**.

4.5.1. Formulações estudadas e técnicas de preparo

As matérias-primas (Clariant SA, Noveon, Croda do Brasil Ltda, Dow Corning, Givaudan) empregadas na fabricação das formulações cosméticas estão descritas de acordo com a nomenclatura adotada por Brandão (2000). Preparam-se aproximadamente 700 g de cada formulação, para realizar o teste em duplicata.

Tabela 1. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do CREME A (creme não-iônico)

COMPONENTES	% (p/p)	Função
Cera auto-emulsionante não-ônica (Polawax [®]) fase oleosa	10,0	Emulsificante e espessante
Óleo mineral fase oleosa	2,0	Emoliente
Acetato de cetila e álcool de lanolina acetilado (Crodalan [®] LA) fase oleosa	1,0	Emoliente
Ciclometicona (DC [®] 245)	3,0	Facilita o espalhamento, lubrificação, sem toque pegajoso
Metilglicose etoxilada (20 OE) (Glucan [®] E20) fase aquosa	2,0	Emoliente
Propilenoglicol fase aquosa	5,0	Umectante superficial da pele
Essência Cosmetic [®] 35 (Givaudan)	q.s.	Aromatizante
Extrato de <i>R. rosaefolius</i>	0,2	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0	Veículo

Técnica de preparo

O procedimento para o preparo do **Creme A** envolveu o aquecimento em bico de bunsen das fases aquosa e oleosa separadamente, até a temperatura de 70-75 °C. Quando essas atingiram este valor, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, de forma lenta e constante e com auxílio da agitação mecânica (*Mixer* da Wallita). Após a obtenção da emulsão, agitou-se até seu resfriamento a 40 °C e acrescentaram-se ciclometicona, a essência e o extrato de *R. rosaefolius*, previamente diluído em q.s. de etanol absoluto. O valor de pH da formulação foi corrigido para 6,0 -6,5 com solução de hidróxido de sódio 20% (p/v) (LEONARDI, 2004; MAIA, 2002).

Tabela 2. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do CREME B (creme aniônico)

COMPONENTES	% (p/p)	Função
Hostacerin [®] SAF (óleo mineral, palmitato de isopropila, fosfato de trilaureth-4, rapeseed oil sorbitol éster e copolímero de acriloldimetiltaurato de amônio/vinilpirrolidona)	4,0	Base hidratante para preparo de emulsões aniônicas à frio
Essência Cosmetic [®] 35 (Givaudan)	q.s.	Aromatizante
Extrato de <i>R. rosaefolius</i>	0,2	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0	Veículo

Técnica de preparo

Homogeneizou-se, com auxílio da espátula de plástico, o Hostacerin[®] SAF e q.s. de água destilada. Adicionaram-se a essência e o extrato de *R. rosaefolius* previamente diluído em q.s. etanol absoluto, completou-se o volume final com água destilada, homogeneizando-se o sistema. O valor de pH da formulação foi corrigido para 6,0 -6,5 com solução de hidróxido de sódio 20% (p/v).

Tabela 3. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do GEL A (gel não-iônico)

COMPONENTES	% (p/p)	Função
Hidroxietilcelulose (Natrosol [®])	2,0	Geleificante, espessante.
Álcool cetílico etoxilado (e) propoxilado (Procetyl [®] AWS)	3,0	Dispersante da essência
Propilenoglicol	6,0	Umectante
Essência Cosmetic [®] 35 (Givaudan)	q.s.	Aromatizante
Extrato de <i>R. rosaefolius</i>	0,2	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0	Veículo

Técnica de preparo

Hidratou-se a hidroxietilcelulose com q.s. de água destilada na temperatura de 50 °C e agitou-se com espátula de plástico flexível até a formação do gel. Adicionou-se o propilenoglicol, a essência (previamente dispersa no Procetyl[®] AWS) e o extrato de *R. rosaefolius*, completando-se a massa do gel com q. s. p. de água destilada. O valor de pH da formulação estava entre 6,0 e 6,5 (LEONARDI, 2004; MAIA, 2002).

Tabela 4. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do GEL B (gel aniônico)

COMPONENTES	% (p/p)	Função
Polímero carboxivinílico (Carbopol® Ultrez10)	0,8	Geleificante, espessante
Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Procetyl® AWS)	3,0	Dispersante da essência
Propilenoglicol	5,0	Umectante
Cocoato de glicerila etoxilado (7 OE) (Cetiol® HE)	0,8	Emoliente
Hidróxido de sódio (solução 20% p/v)	q.s. pH 6,0-6,5	Alcalinizante do Carbopol®
Essência Cosmetic® 35 (Givaudan)	q.s.	Aromatizante
Extrato de <i>R. rosaefolius</i>	0,2	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0	Veículo

Técnica de preparo

O polímero carboxivinílico foi disperso em q.s. de água destilada e permaneceu em repouso por 3 horas a fim de completar a hidratação. Após esse período, foi adicionado o propilenoglicol homogeneizando-se com auxílio de espátula de plástico flexível. A essência e o Cetiol® HE foram previamente dispersos em Procetyl® AWS e adicionados à mistura, e posteriormente o extrato de *R. rosaefolius*, homogeneizando-se o sistema. A formulação foi pesada, completou-se a massa com água destilada e corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5, com auxílio do hidróxido de sódio e agitação manual descrita anteriormente (LEONARDI, 2004).

Tabela 5. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do XAMPU A (xampu transparente)

COMPONENTES	% (p/p)	Função
Lauril éter sulfato de sódio (Alkapon [®] CN)	20,0	Tensoativo aniônico, agente formador de espuma e de limpeza
Lauril sulfato de trietanolamina (Alkapon [®] T)	5,0	Tensoativo aniônico suave, formador de espuma e agente de limpeza
Dietanolamida de ácidos graxos de coco (Comperlan [®] KD)	3,0	Espessante, sobreengordurante e estabilizante de espuma
Essência Cosmetic [®] 017 (Givaudan [®])	0,4	Aromatizante
Corante verde (solução aquosa de Pigmento Green n ^o 7-pigmento a base de óxido de cromo Giba [®] a 0,1% p/v)	3,0	Corretivo da cor
Ácido cítrico (solução 10% p/v)	pH 6,0 -6,5	Corretivo do valor de pH
Cloreto de sódio (sol. 26% p/v)	7,5	Espessante
Extrato de <i>R. rosaefolius</i>	0,2	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0	Veículo

Técnica de preparo

Pesaram-se os componentes lauril éter sulfato de sódio, lauril sulfato de trietanolamina e dietanolamida de ácidos graxos e homogeneizou-se com auxílio de espátula de plástico flexível. Adicionaram-se 50 g de água destilada com agitação suave. Acrescentaram-se o corante, a essência e o extrato de *R. rosaefolius*, completou-se a massa com água destilada e misturou-se suavemente.

Corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5 com ácido cítrico, adicionou-se a solução de cloreto de sódio até obter a viscosidade adequada (observada visualmente e característica de um xampu) e homogeneizou-se o sistema (LEONARDI, 2004).

Tabela 6. Descrição qualitativa, quantitativa e estudo crítico dos componentes do XAMPU B (xampu perolado)

COMPONENTES	% (p/p)	Função
Lauril sulfosuccinato dissódico (e) lauril sulfato de sódio (Genapol [®] SSB)	10,0	<i>Blend</i> de tensoativos aniônicos com alto poder detergente e espumante
Lauril sulfato de sódio (Genapol [®] LSS)	5,0	Tensoativo aniônico com alto poder detergente, espumante e umectante
Diestearatoglicol (Genapol [®] EGL)	1,5	Agente perolizante à frio
Cocoamidopropilbetaína (Dehyton [®] KB)	8,0	Tensoativo anfótero com alto poder de condicionamento e baixa irritabilidade
Fosfato 3- oleílico (Hostaphat [®] 0-300)	0,5	Emulsionante, promove condicionamento
Corante verde (solução aquosa de <i>Pigmento Green n^o 7</i> -pigmento a base de óxido de cromo Ciba [®] a 0,1% p/v)	3,0	Corretivo da cor
Hidróxido de sódio (20% p/v)	pH 6,0-6,5	Corretivo do valor de pH
Cloreto de sódio (26% p/v)	6,7	Espessante
Essência Cosmetic [®] 017	0,4	Aromatizante
Extrato de <i>R. rosaefolius</i>	0,2	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0	Veículo

Técnica de preparo

Pesou-se o lauril sulfossuccinato dissódico, o lauril sulfato de sódio (Genapol[®] SSB), o lauril sulfato de sódio (Genapol[®] LSS), o distearato glicol (Genapol[®] EGL), a cocoamidopropil betaína (Dehyton[®] KB) e o fosfato 3- oleílico (Hostaphat[®] 0-300) e homogenizou-se suavemente com auxílio de espátula de plástico flexível. Foram incorporados à formulação, q.s. de água destilada, o corante verde, a essência e o extrato de *R. rosaefolius*, completou-se o volume com água destilada e misturou-se suavemente com a mesma agitação. Corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5 com hidróxido de sódio e adicionou-se a solução de cloreto de sódio, até alcançar viscosidade adequada (observada visualmente e característica de um xampu) e homogeneizou-se o sistema (LEONARDI, 2004).

4.5.2. Avaliação da estabilidade física e físico-química de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm.

Acondicionaram-se aproximadamente 15 g de cada formulação em pote de vidro transparente com boca larga, com capacidade nominal de 17 g e procedeu-se aos testes preliminares e ao estudo de estabilidade das amostras das formulações cosméticas (BRASIL, 2004; LEONARDI; CAMPOS, 2001; MAIA, 2002).

4.5.2.1. Testes preliminares de estabilidade física

A. Centrifugação: cerca de 10 g do **Creme A** e do **creme B** foram submetidos a ciclos de 1000, 3000 e 4000 rpm em centrífuga (Centrifugador Excelsa Baby, Fanem Ltda), durante 15 minutos para cada velocidade. O procedimento foi realizado a temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C). Após cada ciclo foram investigados sinais de instabilidade física.

B. Estresse térmico: as amostras (**Creme A e B**) foram colocadas em banho de água termostatizado, entre 40 e 80 °C. Realizou-se a elevação da temperatura de 10 em 10 °C, mantendo as amostras por 30 minutos em cada temperatura. As amostras foram avaliadas ao término do teste (80 °C), após as mesmas retornarem à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C).

4.5.2.2. Estudo de Estabilidade

4.5.2.2.1. Avaliação inicial

As formulações cosméticas (**Creme A e B, Gel A e B, Xampu A e B**), após 24 horas de preparo, considerado como **t₀** (tempo zero), foram avaliadas inicialmente, quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor), valores de pH e de viscosidade aparente. Os resultados obtidos em **t₀** foram considerados como referência para comparação com as demais leituras das amostras, em todas as condições, durante o Teste de Estabilidade.

4.5.2.2.2. Condições de armazenamento do estudo de estabilidade

Amostras das formulações cosméticas foram submetidas às seguintes condições de armazenamento e períodos de avaliação:

a) Temperatura ambiente (luz solar indireta)

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), durante 60 dias, sendo avaliadas no 7º, 15º, 30º e 60º dias.

Utilizou-se a luz solar indireta, pois esta pode alterar significativamente a cor e o odor do produto e levar à degradação de componentes da formulação. As amostras foram expostas à luz solar de forma indireta e não diretamente ao sol.

b) Estufa a 45 °C

As amostras foram submetidas à temperatura de $45,0 \pm 2,0$ °C em estufa, durante 60 dias, sendo avaliadas no 7º, 15º, 30º e 60º dias.

c) Freezer

As amostras foram submetidas à temperatura de $-10,0 \pm 2,0$ °C em freezer, durante 60 dias, sendo avaliadas no 7º, 15º, 30º e 60º dias.

d) Refrigerador (geladeira)

As amostras foram mantidas em refrigerador ($5,0 \pm 2,0$ °C), durante 60 dias, sendo avaliadas no 7º, 15º, 30º e 60º dias.

4.5.2.2.3. Parâmetros avaliados no estudo de estabilidade

Todas as amostras, submetidas às diversas condições de armazenamento descritas acima, foram avaliadas quanto às características organolépticas, pH e viscosidade, quando atingiram a temperatura ambiente. Os resultados foram comparados com os obtidos inicialmente nas amostras de referência (t0).

Características organolépticas: foram observados os aspectos da preparação, a separação de fases da emulsão, a presença de grumos e precipitados; o odor e a cor. As amostras foram classificadas em normal (**N**) quando não sofreram modificação da cor e aspecto, (**LM**) com leves modificações e (**M**) com modificação das características organolépticas.

pH (valor e variação): as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 (p/v) em água destilada, previamente neutralizada (pH 7,0). Realizaram-se os

ensaios das amostras em pHmetro (Hanna Instruments 8417) e comparou-se com aqueles obtidos em **t₀**, seguindo a equação 1:

$$\text{Variação percentual do pH (\%)} = \frac{(\text{pH}_{\text{fin}} - \text{pH}_{\text{in}}) \times 100}{\text{pH}_{\text{in}}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: **pH_{in}** = valor de pH em **t₀** (inicial)

pH_{fin} = valor de pH final (intervalo de tempo avaliado)

Viscosidade aparente: foram pesados cerca de 15 g das amostras e transferidas para o compartimento do viscosímetro (Visco Star-R), para a leitura da viscosidade aparente (cP, *centiPoise*) após 1 minuto de agitação à temperatura ambiente.

As condições do viscosímetro para *spindle* (agulha) e velocidade de agitação empregadas foram: **Creme A**, TR 9 e 6 rpm; **Creme B**, TR 11 e 12 rpm; **Gel A e B** – TR 11; 50 e 20 rpm, respectivamente; **Xampu A e B** – TR 8; 200 e 10 rpm, respectivamente.

As leituras obtidas foram comparadas com aquelas obtidas em **t₀**, seguindo a equação 2:

$$\text{Variação percentual da viscosidade aparente (\%)} = \frac{(\text{Visc.}_{\text{fin}} - \text{Visc.}_{\text{in}}) \times 100}{\text{Visc.}_{\text{in}}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: **Visc._{in}** = valor de viscosidade aparente em **t₀** (inicial)

Visc._{fin} = valor de viscosidade aparente final (intervalo de tempo avaliado)

4.5.2.2.4. Critérios para aprovação das formulações cosméticas

Foram adotados os seguintes critérios para seleção das amostras avaliadas nos testes preliminares e no estudo de estabilidade normal, descritos a seguir (BABY, 2005; BRASIL, 2004):

Aspecto: as amostras devem manter sua integridade durante todo o teste, mantendo seu aspecto inicial em todas as condições de armazenamento, sendo que leves alterações em temperaturas elevadas e freezer são aceitáveis.

Cor e odor: foram aceitas leves alterações nas diversas condições de armazenamento.

Valor de pH: a variação máxima do valor de pH de $\pm 10\%$, normalmente aceitável em especificações técnicas de produtos cosméticos e que não compromete sua integridade.

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

4.6. Avaliação da eficácia do sistema conservante das formulações cosméticas

As formulações cosméticas selecionadas no estudo de estabilidade normal foram submetidas ao teste de eficácia do sistema conservante.

4.6.1. Microrganismos desafiante

Os microrganismos desafiante utilizados na validação e no teste de eficácia do sistema conservante foram provenientes do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e

identificados como *Escherichia coli* IAL 2393 (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1874 (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* IAL 1875 (ATCC 6548), *Burkholderia cepacia* IAL 1834 (ATCC 17759), *Candida albicans* IAL 1611 (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* IAL 2122 (ATCC 16404).

4.6.2. Preparação e padronização das suspensões microbianas

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

A massa celular resultante desse crescimento foi recolhida com 9,0 mL de solução salina a 0,85 % (p/v) estéril, considerada como suspensão microbiana padrão. A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da suspensão foi realizada pela técnica de semeadura em profundidade. Nesta técnica é transferido para as placas de Petri estéreis, em duplicata, 1,0 mL das diluições de 10^{-4} à 10^{-6} da suspensão microbiana, obtidas por diluições decimais seriadas em tubos contendo 9 mL de solução salina estéril a 0,85 % (p/v). Adicionaram-se alíquotas de 15 a 20 mL de meio de cultura TSA para as bactérias ou SDA para fungos, resfriado até cerca de 42 °C e a seguir fez-se a homogeneização em movimentos suaves em forma de oito. Após solidificação do meio de cultura, incubaram-se essas placas a 30 – 35 °C, para as bactérias em estufa por 48 horas e os fungos, a 20 – 25 °C, por 5 dias. O número de UFC/mL da suspensão

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

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

4.6.3. Preparo de meios de cultura e diluentes utilizados

Os meios de cultura e o diluente Dey Engley (D/E Neutralizing Broth, Difco) foram preparados e esterilizados conforme as instruções do fabricante (Difco), a partir da mistura complexa e desidratada de nutrientes. O diluente Dey Engley (D/E) contém os inativantes tioglicolato de sódio (0,1% p/v); tiosulfato de sódio (0,6% p/v); bissulfito de sódio (0,25% p/v), polissorbato 80 (0,5% p/v) e lecitina de soja (0,7% p/v). A solução salina 0,85% (p/v) foi preparada por dissolução de NaCl PA (Merck) em água destilada, em seguida a solução foi esterilizada em calor úmido.

4.6.4. Validação do método através de neutralização do sistema conservante

A condição de inativação ou neutralização do sistema conservante tem como objetivo validar o método usado no teste de eficácia do sistema conservante. A confiabilidade do método usado no teste de eficácia de conservante depende da sua capacidade em evitar a interferência do sistema conservante no crescimento dos microrganismos de acordo com a Farmacopéia Americana (U.S. Pharmacopoeia, 2008).

Os microrganismos utilizados para verificação da inativação do sistema conservante foram descritos no **item 4.6.1.**

O estudo foi conduzido com as formulações cosméticas avaliadas e essas foram preparadas em condições assépticas, consideradas amostras teste. Como controle da viabilidade dos microrganismos utilizou-se solução salina 0,85% (p/v).

As amostras teste foram diluídas na razão 1:10 (p/v), com diluente Dey Engley (D/E) contendo os inativantes químicos em sua composição, descritos no **item 4.6.3.**

Para placas de Petri estéreis foram transferidas alíquotas de 0,5 mL da suspensão padronizada de cada microrganismo (**item 4.6.2.**) diluída de modo a obter 100 a 200 UFC. Adicionou-se 1,0 mL da amostra teste e 15 a 20 mL de TSA ou SDA resfriados até cerca de 42 °C. Homogeneizou-se a mistura e após solidificação completa do meio de cultura, incubaram-se as placas a 30 – 35 °C, para as bactérias em estufa por 48 horas e os fungos, a 20 – 25 °C, por 5 dias. O mesmo procedimento foi realizado para a solução salina, considerada no experimento como controle da viabilidade celular.

Foi calculada a média dos valores de Unidades Formadoras de Colônias obtidas da amostras teste e do controle. A porcentagem de recuperação de cada microrganismo foi relacionada entre o valor médio de UFC da amostra teste e o valor médio de UFC do controle. Assim, a média de recuperação total da condição de ensaio foi obtida pelas porcentagens de cada microrganismo. Por ser teste limite, analisaram-se os valores calculados, considerando como < 70% ou > 70%.

4.6.5. Teste de eficácia do sistema conservante das formulações cosméticas

As amostras das formulações cosméticas selecionadas foram avaliadas quanto à eficácia do sistema conservante. O teste de desafio ou *challenge test*

(CTFA, 2001) foi executado para cada um dos microrganismos descritos no **item 4.6.1.**

Aproximadamente 20 g de cada amostra foram acondicionadas em frasco de polietileno estéril e mantidas a temperatura ambiente durante todo o teste. Em condições assépticas, sob fluxo laminar vertical (VLFS-09, Veco), as amostras foram inoculadas com cada um dos microrganismos desafiante em cerca de 10^5 a 10^6 UFC/g, proveniente da suspensão padronizada conforme o **item 4.6.2.** Imediatamente após a inoculação, homogeneizou-se e cada amostra foi submetida às diluições decimais seriadas empregando-se o diluente Dey Engley (D/E) e a técnica de semeadura em profundidade, utilizando o meio de cultura adequado, conforme o microrganismo desafiante. Após período de incubação, foi realizada a contagem das UFC de microrganismos viáveis sobreviventes, com auxílio de contador de colônias.

A periodicidade de avaliação do sistema conservante das amostras foi de acordo com os critérios estabelecidos, sendo logo após a inoculação e nos intervalos de tempo de 2, 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente denominados de T_0 , T_2 , T_7 , T_{14} , T_{21} e T_{28} .

Para a verificação da viabilidade dos microrganismos durante os ensaios, realizou-se o mesmo procedimento utilizado para as amostras, para a solução salina 0,85 % (p/v), considerada no teste como controle da viabilidade de microrganismos.

4.6.6. Critérios de aceitação

Os critérios de aceitação adotados foram de acordo com o descrito pelo CTFA (*The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association*, 2001).

“O conservante é considerado eficaz para formulações cosméticas, em geral, se”:

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

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

4.7. Avaliação da compatibilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm. sobre equivalentes dermo-epidérmicos – sistema ar-líquido

Os ensaios foram realizados sob condições assépticas e em ambiente controlado utilizando materiais e reagentes esterilizados. Os experimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF – USP (CEP/FCF/USP/ 229).

Utilizou-se sistema *in vitro* de composto dermo-epidérmico empregando para tal, derme humana acelular preservada em glicerol e reidratada, como suporte para o cultivo de queratinócitos isolados, diretamente em sua superfície. Tal sistema visa verificar a compatibilidade das formulações cosméticas (creme, gel e xampu) contendo o extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* 0,2% (p/p) com as células da epiderme humana.

4.7.1. Preparo das bases dérmicas como suporte das culturas

Foram utilizadas lâminas de pele de espessura parcial, removidas de doadores não-vivos, cedidas para finalidade de pesquisa pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O tecido foi então mantido em glicerol sob refrigeração a 4 °C por um mínimo de 21 dias até sua utilização (HERSON et al., 2001; PIGOSSI, 1971).

O glicerol a 98% foi removido dos tecidos pela agitação cuidadosa do fragmento em solução salina 0,9% durante aproximadamente 15 minutos, aguardando-se a recuperação das características físicas normais do tecido, como, opacidade e maleabilidade.

O fragmento inicial foi recortado em fragmentos menores, de 2,0 cm² aproximadamente. Os fragmentos foram colocados em solução de dispase a 2,5% (Protease Neutra – grau II, Boehringer-Manhein, Alemanha) a 4 °C. A separação espontânea entre a epiderme e a derme ocorreu entre 18 horas, proporcional à espessura dérmica do fragmento. Foram obtidos assim 24 fragmentos (HERSON et al., 2001).

As epidermes foram descartadas e os fragmentos dérmicos foram removidos da solução de dispase, lavados em solução salina 0,9% e expostos à ação complementar de uma solução de tripsina a 0,05% e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,02% (GIBCO), durante 15 minutos. Após nova lavagem com solução salina 0,9%, os fragmentos foram dispostos individualmente em placas de cultura tipo multipoços de 6 poços (Falcon) com a derme papilar voltada para cima e recobertos com meio de cultura KGM.

As placas multipoços foram mantidas em estufa com CO₂ a 5% e 37 °C de temperatura até sua utilização, normalmente transcorridas 24 a 48 horas,

permitindo assegurar a inexistência de contaminações bacterianas ou fúngicas dos fragmentos.

4.7.2. Cultura de queratinócitos

Fragmentos cutâneos de espessura total, removidos em Centro Cirúrgico, por ocasião de mastoplastias redutoras realizadas em pacientes saudáveis do sexo feminino, com idade entre 17 e 42 anos, foram utilizados como fonte de queratinócitos isolados.

Após transferência para placa de Petri, o tecido celular subcutâneo e o máximo de derme possível foram removidos com tesoura, resultando em pele de espessura parcial fina. Esta pele de espessura parcial foi recortada em fragmentos menores de 1,0 mm², que foram então submersos em solução enzimática de tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02% (GIBCO) e mantidos sob agitação a 37 °C.

A cada 30 minutos, o sobrenadante (solução enzimática e células desprendidas) foi removido e transferido para tubo cônico. Nova solução de tripsina e EDTA foi adicionada aos fragmentos de pele dentro do agitador e o processo descrito acima foi repetido por cerca de cinco a seis vezes. A ação da enzima tripsina foi bloqueada pelo íon cálcio introduzido no sistema pela adição de meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino.

A suspensão de células foi centrifugada a 1500 rpm durante cinco minutos (centrífuga Marathon 8k – Fischer Scientific). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* celular ressuscitado em volume conhecido de meio apropriado. O número de células/mL de diluente foi estabelecido pela contagem em câmara de Neubauer.

Normalmente, foram utilizadas para as culturas primárias as células provenientes da 2ª à 5ª meia hora do processo de separação enzimática, de acordo com os protocolos de GREEN et al. (dados não publicados).

O total de células obtido foi ressuspensionado em meio de cultura KGM na concentração desejada e foram semeadas em garrafas plásticas tratadas para esta finalidade (FALCON), com 25 cm² de superfície de cultivo sobre uma camada de sustentação (*feeder layer*).

As garrafas de cultura foram colocadas em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% e temperatura constante de 37 °C (Fischer Scientific). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas até a subconfluência das células.

4.7.3. Culturas secundárias de queratinócitos sobre bases dérmicas – cultivo na interface ar-líquido

Assim que os queratinócitos atingiram a subconfluência, foram tripsinizados, contados e semeados, cerca de 300000 células, em anéis pequenos acomodados sobre os 24 fragmentos de derme de 2,0 cm² (como descrito no **item 4.7.1.**). Após 24 horas, retiraram-se os anéis, trocou-se o meio (1,5 mL/poço) para retirar as células em suspensão e evitar aderência à placa.

As culturas foram mantidas em estufa de cultivo com atmosfera de CO₂ a 5%, à temperatura de 37 °C, submersas em meio KGM, sendo que o meio de cultivo foi trocado a cada dois dias até o 7º dia de experimento. Após este período, os sistemas foram suspensos em grelhas apropriadas de aço inoxidável de maneira que apenas a base dérmica ficasse em contato com o meio de cultura e os queratinócitos expostos ao ar, criando-se a situação de cultivo na interface ar-líquido (RÉGNIER, DARMON; 1989).

Novamente, as culturas foram mantidas em estufa de cultivo com atmosfera de CO₂ a 5%, à temperatura de 37 °C, sendo que o meio de cultivo foi trocado a cada dois dias até o 14º dia de estudo e diariamente até o 21º dia, quando foram utilizadas para o experimento de contato das formulações.

4.7.4. Contato das formulações contendo extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm. com equivalentes dermo-epidérmicos – sistema ar-líquido

O experimento de contato das formulações com equivalentes dermo-epidérmicos foi realizado após o 21º dia de cultivo, sendo adicionados de 20 a 30 µL (cerca de 1 gota) das formulações base creme A, gel B e xampu B, contendo 0,2% (p/p) do extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius*. Foram adicionados 3,0 mL de meio KGM em cada poço, para manutenção da viabilidade celular.

As formulações ficaram em contato com os equivalentes dermo-epidérmicos por 24 e 48 horas, em estufa a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Após cada período de contato, as formulações foram retiradas, os equivalentes dermo-epidérmicos lavados com solução fisiológica, retirados das grelhas e acondicionados em solução fixadora específica para microscopia ótica.

4.7.5. Estudos histológicos – microscopia ótica dos fragmentos dermo-epidérmicos

Os fragmentos de pele empregados para o estudo de formulações cosméticas com extrato bruto de *R. rosaefolius* 0,2 % (p/p) foram lavados com solução fisiológica, fixados em solução de formaldeído 10% (p/v) e enviados para o Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para desidratação, inclusão em parafina e realização de cortes histológicos para a coloração por hematoxilina-eosina (H-E).

Os cassetes contendo os fragmentos foram retirados da solução fixadora (formaldeído 10%) e processados em equipamento apropriado (Autotécnico Leica TP 1020, Aotec), passando por 12 banhos com duração de 01 hora cada, sendo 2 banhos em álcool 95%, 3 em álcool absoluto, 4 em xilol e 3 em parafina 65 °C. Em seguida o material é retirado do cassete e moldado com parafina bruta

liquidificada (Petrobrás), dentro do quadro de Leuckhart, até solidificação do meio de impregnação (parafina). Os blocos são resfriados, levados ao Micrótomo Rotativo (RM 2145 Leica), e cortadas fitas do material incluso em parafina, com espessura de 4 μm . As fitas são colocadas em água fria e banho histológico (60 °C) para aderirem nas lâminas. Posteriormente, as lâminas são colocadas em estufa por 30 minutos, para retirar o excesso de parafina e melhorar a aderência.

Para coloração com H-E, as lâminas foram mergulhadas em xilol para completa desparafinização, em seguida para hidratação do material, são mergulhadas em banhos de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 70% e água corrente. As lâminas são coradas com hematoxilina por 5 minutos, lavadas em água corrente, mergulhadas em solução ácida de álcool 70%, solução amoniacal 1%, álcool 95% e coradas em eosina floxina por 3 minutos. Em seguida, são desidratadas em álcool 70%, 95%, absoluto e por último passam pelo banho de xilol. Para montagem do material, as lâminas são estendidas em papel de filtro, coloca-se 01 gota do solvente Entellan na lamínula e verte a mesma sobre a respectiva lâmina.

A análise morfológica foi realizada em microscópio ótico, com aumento de 100 vezes (microscópio Labophot – Nikon).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Descrição macroscópica da planta

R. rosaefolius Sm. é um arbusto escandente, que atinge cerca de 1,0 metro de altura, com poucos acúleos desenvolvidos, frutos isolados, agregados ocos, rubros na maturidade e cada frutículo drupáceo apresenta uma semente em seu interior. As flores axilares e terminais, isoladas, brancas, pentâmeras, com simetria actinomorfa, apresentam cálice gamossépalo e corola dialipétala, com o pedúnculo floral cônico e protuberante, contendo um gineceu apocárpico dialicarpelar, com numerosos pistilos, o que é característico de algumas espécies da família Rosaceae. O caule é ramificado, cilíndrico, de cor verde. A raiz principal é pivotante. As folhas são compostas, alternas, imparipenadas, com 3 a 7 folíolos e estípulas. O limbo dos folíolos é membranáceo, ovado-oblongo, ápice agudo ou acuminado, base arredondada, áspera ao tato e pubescente à visão. As margens são duplamente denteadas, com nervuras pinadas. Acúleos recurvados estão presentes em toda a parte aérea da planta, sendo mais freqüentes nos caules e pecíolos. A espécie floresce durante todo o ano (JORGE; MARKMAN, 1993).

5.2. Descrição microscópica da planta

A análise da secção transversal do folíolo mostra uma epiderme unisseriada, com células de paredes delgadas, recobertas por cutícula fina. As células da face dorsal são menores que as da face ventral. Na região da nervura central, há 2-3 camadas de colênquima angular. O feixe vascular presente na nervura central é bicolateral, com abundantes idioblastos com drusas. O mesófilo é heterogêneo assimétrico ou dorsiventral, com 1-2 camadas de parênquima paliçádico e 2-3 camadas de lacunoso (**Figura 5**). Há abundantes tricomas tectores unicelulares, bastante alongados (**Figura 6**).

Figura 5 - Corte transversal de limbo

Figura 6. Corte transversal de limbo. Tricoma glandular e tector unicelular

A epiderme da face ventral apresenta numerosos estômatos anomocíticos (**Figura 7**), que em corte transversal, exibem uma câmara subestomática (**Figura 8**).

Figura 7. Corte paradérmico de limbo, com estômatos anomocíticos

Figura 8. Estômato com câmara subestomática

O pecíolo apresenta secção côncavo-convexa, com os mesmos tricomas tectores observados no folíolo, raros tricomas glandulares pedicelados, com glândula pluricelular, 2-3 camadas de colênquima angular e um feixe vascular bicolateral, com início de desenvolvimento secundário, no centro, com 2 menores nas extremidades (**Figuras 9 e 10**).

Figura 9. Corte transversal do pecíolo

Figura 10. Tricoma glandular pedicelado

O caule apresenta secção quadrangular nos ramos tenros, próximo à gema apical. Abundantes fibras floemáticas formam calotas, em torno do floema secundário. Há 3-4 camadas de colênquima lamelar, na parte cortical caulinar (**Figura 11**).

Figura 7 – C.T. de Caule em Início de fase secundária.

Figura 11. Corte transversal de caule

Em caules mais velhos, foram observados vários peridermes e abundantes idioblastos com drusas, especialmente na região do floema secundário e nos raios parenquimáticos (**Figura 12**).

Figura 12. Corte transversal de caule com peridermes

A raiz pentarca exibe um xilema secundário bem desenvolvido, com abundantes fibras esclerenquimáticas e várias peridermes, na periferia, bem delimitadas pelo súber (**Figura 13**).

Figura 13. Corte transversal de raiz pentarca, em desenvolvimento secundário

Os mesófilos foliares dorsiventrais, aliados à epiderme, constituída por células com parede extremamente delgadas, associada a uma cutícula também delgada, apontam para uma planta mesofítica, o que está de acordo com seu habitat, em regiões serranas (MANTOVANI, 1981). As observações com relação à anatomia do folíolo estão de acordo com o trabalho de Jorge e Markman (1993), que estudaram folhas e frutos desta espécie, e que descrevem a ocorrência de pêlos tectores simples e unicelulares, tricomas glandulares pedunculados e capitados, mesófilo dorsiventral e estômatos anomocíticos como características anatômicas freqüentes na família Rosaceae.

A presença de drusas é particularmente elevada no limbo foliar do folíolo e na raiz, sendo um pouco menos freqüente em caule. Cristais de oxalato de cálcio são freqüentes em espécies da família Rosaceae (METCALFE; CHALK, 1950). Existem cerca de 200 espécies de *Rubus* relatadas (FONTQUER, 1993). No Brasil, ocorrem, nas regiões centro-leste e sudeste, três espécies de *Rubus*: *Rubus brasiliensis* Mart., *Rubus urticifolius* Poiret e *R. rosaefolius* Smith (KISSMANN; GROTH, 1995). A família Rosaceae, com cerca de 100 gêneros e 2000 espécies, engloba espécies que diferem quanto ao porte, morfologia da flor e tipo de fruto (TREASE; EVANS, 1996).

O gineceu apocárpico dialicarpelar, as folhas compostas imparipenadas e a presença de estípulas apresentadas por esta espécie são também características de outras espécies de Rosaceae, como *Rosa* e *Fragaria*, sendo que em espécies de *Rosa* verifica-se a presença de acúleos.

Os estudos realizados com plantas medicinais demonstram que geralmente aquelas que apresentam atividade antimicrobiana têm grande probabilidade de possuir outras atividades farmacológicas (GIESBRECHT, 1980). Constatou-se a presença de antraquinonas livres, taninos, flavonóides, saponinas e alcalóides nos órgãos estudados. Os testes para alcalóides evidenciaram sua presença em caule e raiz. As saponinas foram encontradas no caule e nas folhas, sendo que nessas observou-se maior quantidade de espuma persistente.

5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações do extrato de *R. rosaefolius* Sm.

5.3.1. Recuperação dos microrganismos na mistura de solventes utilizados

Para validação prévia do método de determinação da atividade antimicrobiana do extrato da planta, os microrganismos utilizados no estudo foram recuperados de misturas de solventes (metanol, etanol, dimetilsulfóxido), sendo escolhidos para solubilização do extrato aqueles que não interferiram no crescimento dos mesmos, como se observa nas **Figuras 14, 15 e 16**.

Legenda: C: controle de crescimento; D+M50: mistura dimetilsulfóxido: metanol (50:50); D+M75: mistura dimetilsulfóxido: metanol (25:75); D+M25: mistura dimetilsulfóxido: metanol (75:25); D+E50: mistura dimetilsulfóxido: etanol (50:50).

Figura 14. Recuperação de *S.aureus* 10² UFC/mL frente à mistura de solventes (metanol, etanol, dimetilsulfóxido)

Legenda: C: controle de crescimento; D+M50: mistura dimetilsulfóxido: metanol (50:50); D+M75: mistura dimetilsulfóxido: metanol (25:75); D+M25: mistura dimetilsulfóxido: metanol (75:25); D+E50: mistura dimetilsulfóxido: etanol (50:50).

Figura 15. Recuperação de *E.coli* 10^2 UFC/mL frente à mistura de solventes (metanol, etanol, dimetilsulfóxido)

Legenda: C: controle de crescimento; D+M50: mistura dimetilsulfóxido: metanol (50:50); D+M75: mistura dimetilsulfóxido: metanol (25:75); D+M25: mistura dimetilsulfóxido: metanol (75:25); D+E50: mistura dimetilsulfóxido: etanol (50:50)

Figura 16. Recuperação de *P.aeruginosa* 10^2 UFC/mL frente à mistura de solventes (metanol, etanol, dimetilsulfóxido)

5.3.2. Estudo da atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações do extrato de *R. rosaefolius* Sm.

As **Figuras 17 a 21** demonstram a atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações de *R. rosaefolius* Sm. frente aos microrganismos em teste.

Legenda: Cc: controle de crescimento; cloranf: cloranfenicol; Cs DM: controle do solvente DMSO: metanol; ext bruto: extrato bruto; hex: hexano; clor: clorofórmio; acet et: acetato de etila; but: butanol.

Figura 17. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *S.aureus* 10^6 UFC/mL

Legenda: Cc: controle de crescimento; cloranf: cloranfenicol; Cs DM: controle do solvente DMSO: metanol; ext bruto: extrato bruto; hex: hexano; clor: clorofórmio; acet et: acetato de etila; but: butanol.

Figura 18. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *E. coli* 10^6 UFC/mL

Legenda: Cc: controle de crescimento; cloranf: cloranfenicol; Cs DM: controle do solvente DMSO: metanol; ext bruto: extrato bruto; hex: hexano; clor: clorofórmio; acet et: acetato de etila; but: butanol.

Figura 19. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *P. aeruginosa* 10^6 UFC/mL

Legenda: Cc: controle de crescimento; cloranf: cloranfenicol; Cs DM: controle do solvente DMSO: metanol; ext bruto: extrato bruto; hex: hexano; clor: clorofórmio; acet et: acetato de etila; but: butanol.

Figura 20. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *C.albicans* 10^4 UFC/mL

Legenda: Cc: controle de crescimento; cloranf: cloranfenicol; Cs DM: controle do solvente DMSO: metanol; ext bruto: extrato bruto; hex: hexano; clor: clorofórmio; acet et: acetato de etila; but: butanol.

Figura 21. Valores de absorbâncias relacionadas à atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações frente *A.niger* 10^4 UFC/mL

Na avaliação da atividade antimicrobiana, o método turbidimétrico, técnica de diluição em meio líquido, é mais freqüentemente utilizado quando comparado com o método de difusão em ágar. O primeiro método considera a relação entre a proporção de maior ou menor crescimento microbiano e a concentração da substância em estudo. O método de difusão em ágar relaciona o tamanho do halo de inibição de crescimento com a quantidade da substância ensaiada. Esse é um método trabalhoso que demanda grande quantidade de material, tempo e espaço físico. O emprego de meio líquido e o parâmetro de resposta apresentam como vantagens rapidez, facilidade operacional, medida objetiva, ausência de efeitos de difusão e exatidão (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A técnica de diluição em meio líquido tem sido mais utilizada para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos, antissépticos e conservantes. Atualmente, como refinamento à esta técnica, utiliza-se microplacas que apresentam como vantagens a redução do material, espaço e trabalho. Outro ponto relevante é o pequeno volume de amostras e reagentes utilizados, possibilitando que o ensaio possa ser realizado com maiores números de réplicas e repetições (ELOFF, 1998).

No estudo da avaliação da atividade antimicrobiana, as espécies e o número de microrganismos desafiados não são concordantes e os experimentos são conduzidos de formas variadas. Mazzanti e colaboradores (2000) utilizaram para verificar a atividade antimicrobiana de frações semipurificadas de *Ginkgo biloba*, 22 cepas de microrganismos diferentes desafiando as três frações isoladas das folhas da planta estudada. Considerando o objetivo do trabalho em utilizar extratos ou as frações como conservantes, optou-se pelos microrganismos e carga microbiana recomendados pelos compêndios oficiais (European Pharmacopoeia, 2002; U.S. Pharmacopoeia, 2008).

Antes de avaliar a atividade antimicrobiana da planta, o método foi validado conforme o capítulo <1227>, *Validation of Microbial Recovery from Pharmacopoeial Articles*, de acordo com a Farmacopéia Americana (U.S. Pharmacopoeia, 2008),

que preconiza a recuperação da carga desafiante de menos que 100 UFC/mL. Considerando a recuperação dos microrganismos nas misturas dos solventes utilizados, este procedimento garantiu a não interferência da mistura escolhida no crescimento dos microrganismos avaliados no estudo (**Figuras 14, 15 e 16**).

Diante dessas considerações, a próxima etapa do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações do extrato de *R. rosaefolius*. O extrato bruto 0,2% (p/v) e a fração clorofórmio 0,2% (p/v) demonstraram atividade antimicrobiana sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (**Figura 17**), *Escherichia coli* (**Figura 18**), *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 19**) e *Candida albicans* (**Figura 20**), as frações hexano e butanol 0,2% (p/v) demonstraram discreta atividade sobre *Aspergillus niger* (**Figura 21**).

Como descrito anteriormente, os resultados foram obtidos a partir da média de cada variável de pelo menos 03 réplicas com 03 repetições para cada microrganismo teste, totalizando 09 resultados. Assim, observou-se uma melhor atividade antimicrobiana do extrato bruto 0,2% (p/v) sobre as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e a levedura em estudo, sendo que o bolor *Aspergillus niger* demonstrou maior resistência frente à ação antimicrobiana do extrato.

Ressalta-se que a obtenção das frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol é simples, mas muito demorada e o rendimento muito baixo. Uma conservação eficiente de produtos cosméticos depende de conceitos disponíveis para a indústria cosmética atualmente como preservação natural e sustentável (IBARRA; JOHNSON, 2008). Assim, considerando o aspecto custo e benefício, o extrato bruto da planta em estudo, torna-se escolha provável como conservante natural nas formulações cosméticas avaliadas.

5.4. Teste de toxicidade *in vitro* do extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm.

Os experimentos de citotoxicidade foram repetidos 10 vezes, sendo que alguns destes resultados foram invalidados por contaminação celular, por células

que não evoluíram satisfatoriamente ou ainda pelo solvente de diluição do extrato interferir nos resultados.

Para visualização das células viáveis, utilizou-se Rodamina B, reagente cromogênico, que em métodos colorimétricos fornece maior sensibilidade, rapidez e precisão no teste (PASHA; NARAYANA, 2007). Na **Figura 22** observa-se o aspecto do crescimento da cultura de queratinócitos em relação ao número de células semeadas, coradas com Rodamina B.

Número de células	Cultura celular
2.500
5.000	
10.000	
15.000	
25.000	
50.000	

Figura 22. Aspecto do crescimento da cultura de queratinócitos em relação ao número de células semeadas, por coloração com Rodamina B

A visualização ao microscópio invertido e posterior coloração das células com Rodamina B mostrou que para o teste de avaliação de viabilidade celular, poderiam ser usadas concentrações iniciais de células, variando de 15.000, onde a coloração poderia ser bem observada a olho nu, até 50.000 onde no final do experimento, as culturas ainda não haviam atingido a confluência.

A **Figura 22** apresenta o crescimento da cultura de queratinócitos com diferentes concentrações de células. Com base nesses resultados, estimou-se a quantidade inicial de 25.000 células a serem utilizadas para o teste de viabilidade celular.

Na **Figura 23** pode-se observar a placa corada com Rodamina B de uma das réplicas, após incubação com concentrações variadas de extrato bruto de *R. rosaefolius*.

Controle	6 horas de contato	12 horas de contato	24 horas de contato
0,5 mg/mL
0,75 mg/mL
1,0 mg/mL
1,5 mg/mL
2,0 mg/mL

Figura 23. Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de *R. rosaefolius* nas concentrações 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL, em células de queratinócitos humanos, coradas com Rodamina B, nos tempos de contato de 6, 12 e 24 horas, em triplicata

Quando utilizado o corante Rodamina B (**Figura 23**), teste semi-quantitativo, usado como triagem das concentrações e tempos de contato, pode-se verificar que nas soluções mais concentradas do extrato, a coloração é menos intensa, principalmente em maior tempo de contato (24 horas).

Na **Figura 24**, observa-se a curva de citotoxicidade do conservante sintético (Phenonip®), utilizado como controle positivo no teste.

Figura 24. Curva de viabilidade celular (%) das culturas de queratinócitos em contato com a solução Phenonip® (controle positivo) por 24 e 48 horas, utilizando como indicador da viabilidade celular MTS

Parabenos são agentes antimicrobianos largamente empregados na indústria cosmética (HUSSEIN et al., 2007; SIVASEGARAN et al., 2007). Phenonip® é uma combinação de parabenos em fenoxietanol, uma solução conservante de amplo espectro, sendo um dos *blends* de conservantes mais populares disponível para a indústria cosmética. A concentração de uso depende de vários fatores, mas em geral, concentrações de 0,25% (2,5 mg/mL) a 1,0% (10 mg/mL) conservam adequadamente produtos cosméticos (PHARMASPECIAL, 2004). Como demonstrado na **Figura 24**, a partir de 0,2% (2,0 mg/mL), a solução de Phenonip® já apresentou total toxicidade em 24 e 48 horas de contato com os queratinócitos. Pesquisas recentes mostram a presença de ésteres de parabenos em tecidos humanos, através da penetração na pele intacta sem sofrer ruptura pelas esterases presentes no tecido. Utilizando uma grande variedade de ensaios *in vitro* e *in vivo* as propriedades agonistas estrogênicas de parabenos e seu

metabólito mais comum, ácido *p*-hidroxibenzóico, foram extensivamente documentadas, possivelmente aumentando a incidência de câncer de mama, interferindo com a função reprodutiva masculina e influenciando o desenvolvimento de melanomas (DARBRE; HARVEY, 2008). Atendendo ao apelo internacional da indústria cosmética, fabricantes contemplam o desenvolvimento de conservantes isentos de parabenos e não liberadores de formaldeído, visando reduzir o potencial alergênico e tóxico dos produtos (MORAES, 2008).

Entre os critérios decisivos para o uso de preservação natural em produtos cosméticos estão disponibilidade, efetividade e perfil toxicológico das substâncias (IBARRA; JOHNSON, 2008).

Os resultados indicam que o extrato de *R. rosaefolius*, em contato direto com queratinócitos basais provenientes de culturas primárias, resultou em viabilidade celular menor que 50% para as concentrações a partir 1,0 mg/mL para o tempo de contato de 48 horas e a partir de 1,5 mg/mL para os tempos de contato de 6, 12 e 24 horas.

Os resultados de viabilidade celular, expressos em forma gráfica, obtidos após coloração com MTS, são demonstrados na **Figura 25**.

Figura 25. Curva de viabilidade celular (%) das culturas de queratinócitos em contato com o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm. e solventes (metanol e polietilenoglicol 400) (MP) (1:1), nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas para os extratos e 24 e 48 horas para os solventes, utilizando como indicador da viabilidade celular MTS

A avaliação da interferência do solvente no teste de viabilidade celular é aspecto que deve ser considerado. Inicialmente foi testada a mistura de solvente, DMSO/metanol (1:1), mistura esta, onde os extratos da planta apresentavam melhor solubilização, porém a quantidade necessária, cerca de 20% do volume final, mostrou-se tóxica para as células de queratinócitos utilizadas no ensaio. Os outros solventes testados, metanol: PEG 400 1:1, com os quais se conseguiu uma solubilidade suficiente do extrato da planta, possibilitaram testar concentrações contendo entre 10 a 40% de solvente em relação ao volume total. Elegeu-se a concentração de 10% de solvente no poço, que se mostrou atóxica (**Figura 25**). Esta escolha se baseou em testes preliminares onde foi verificado que concentrações mais altas poderiam ser tóxicas às células em estudo.

Para o teste de viabilidade celular, selecionou-se o método colorimétrico *CellTiter 96™ Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS), por apresentar melhor desempenho, pois resulta em uma formazana solúvel, diferente do método MTT convencional que necessita de solução que lise a célula e solubilize o composto colorido. Portanto, o método MTS por não necessitar dessas condições mencionadas, possibilita que a amostra seja analisada em diferentes intervalos de tempos, retornando a incubação até obter a coloração desejada (RAPAPORT; ROBINSON, 1993).

A **Figura 25** apresenta o teste de viabilidade celular quantitativo pelo método colorimétrico com MTS. A citotoxicidade do extrato foi evidenciada em concentrações mais altas (1,5 e 2,0 mg/mL), com intervalo de tempo de contato prolongado (48 horas).

Para a maior concentração em estudo (2,0 mg/mL), sendo essa a concentração mínima inibitória do crescimento microbiano (**item 5.3.2.**), as amostras em contato direto com as células, em todos os intervalos de tempo, apresentaram aproximadamente 5 a 25% de viabilidade celular. A amostra do extrato bruto de *R. rosaefolius* com concentração de 1,5 mg/mL em contato com as células por 6, 12 e 24 horas apresentou cerca de 40-45% de viabilidade celular; para 48 horas de contato, foi constatado apenas 10% de viabilidade. Na concentração de 1,0 mg/mL, a viabilidade celular durante 48 horas de contato foi aproximadamente 45% (**Figura 25**).

Testes de toxicidade aguda sistêmica são conduzidos para determinar os riscos que determinados produtos podem causar a saúde. Estudos sugerem que os métodos *in vitro* podem ser úteis em predizer a toxicidade aguda *in vivo* (NHI, 2001).

Embora os testes *in vitro* para a avaliação da toxicidade ainda não possam substituir completamente os testes *in vivo*, eles nos fornecem informações úteis quanto aos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular,

são convenientes, geralmente rápidos e fáceis de realizar. Os testes de viabilidade celular fornecem informações quanto a respostas imediatas ou curtas, tais como alterações na permeabilidade da membrana ou uma perturbação de um caminho metabólico específico, medindo a proporção de células viáveis após um procedimento traumático. A maioria destes testes se baseia na ruptura da integridade da membrana que é determinada pela entrada de um corante (“trypan blue”) ao qual a célula é geralmente impermeável ou a liberação de um corante (“neutral red”) normalmente adquirido e retido por células viáveis (FRESHNEY, 2005). Estes testes utilizam geralmente as células NIH-3T3, linhagem de fibroblastos de pele de camundongo Balb/C, para avaliar a citotoxicidade em função da viabilidade celular.

Nesse experimento foram utilizados queratinócitos humanos para avaliar a citotoxicidade do extrato de *R. rosaefolius*, pois esse tipo de célula apresenta vantagens em mimetizar as condições de uso por serem as primeiras células em contato com qualquer substância aplicada topicamente. Além disso, em longo prazo, resultados obtidos de toxicidade às células humanas, derivados desta abordagem, podem ser adicionados a bancos de dados para facilitar o desenvolvimento de métodos, que mais tarde podem prever letalidade aguda humana (NIH, 2001).

Os resultados indicam que o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm. é citotóxico a partir da concentração de 1,0 mg/mL, pois com 48 horas de contato, restou-se aproximadamente 50% de viabilidade celular, valor este considerado como índice de citotoxicidade *in vitro* (IC50) (ROGERO et al., 2003).

A citotoxicidade foi avaliada em cultura de queratinócitos humanos, onde ocorreu contato direto entre o extrato bruto de *R. rosaefolius* e as células basais, sendo essa considerada condição drástica. Em se tratando do extrato nas formulações cosméticas, o contato ocorre inicialmente com o estrato córneo, tecido queratinizado e de proteção, após a liberação deste das formulações em teste. Assim para o desenvolvimento e estudo das formulações selecionou-se a

concentração de 2,0 mg/mL, sendo essa a menor concentração testada com atividade antimicrobiana, de acordo com o estudo da Concentração Mínima Inibitória (MIC). Para avaliar o risco real de toxicidade do extrato, quando incorporado nas formulações, há a necessidade do teste de compatibilidade epidérmica, ensaio este que verifica as modificações ocorridas no tecido cutâneo (item 5.7.). Uma avaliação mais rigorosa dos dados microbiológicos e dos testes desafio pode revelar a utilidade ou confiabilidade de conservantes naturais alternativos, como por exemplo, dados da MIC, podem ser um primeiro passo confiável, pois não sofrem a influência de várias matérias-primas presentes numa formulação, nem dos obstáculos físico-químicos envolvidos no processo (IBARRA; JOHNSON, 2008).

5.5. Estudo de estabilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm.

5.5.1. Testes de estabilidade preliminar

Emulsões são sistemas heterogêneos e termodinamicamente instáveis que, com o tempo apresentam sinais progressivos de instabilidade, como eventual separação de fases (LEONARDI, 2004).

Para garantir a estabilidade de um sistema emulsificado, testes de estabilidade física, química e microbiológica são necessários. Submeter sistemas emulsificados às diferentes condições de temperatura e gravidade são as condições rápidas mais freqüentemente utilizadas para avaliar o comportamento de produtos cosméticos (BOOCK, 2007). O teste de centrifugação é considerado como teste de triagem e não deve indicar a estabilidade física real das preparações cosméticas, porém é eficiente para selecionar as emulsões que devem ser submetidas ao teste de estabilidade normal (BOOCK, 2007; BRASIL, 2004).

No teste de estresse térmico, aplica-se condição extrema de temperatura em períodos pré-determinados de tempo e juntamente com o teste de centrifugação, são importantes para prever a estabilidade físico-química de sistemas emulsionados (BOOCK, 2007). Os possíveis sinais de instabilidade dos Cremes A e B foram observados e descritos a seguir:

a) Centrifugação – Creme A e B

Após a centrifugação das amostras não foi observada coalescência ou separação de fases, demonstrando estabilidade física de ambas as formulações e adequação do sistema tensoativo.

b) Estresse térmico:

Creme A - ocorreu separação de fases; adquirindo coloração verde mais intensa na parte externa (contato com o material de acondicionamento) e superior.

Creme B - não ocorreu separação de fases, mas houve leve alteração de cor (mais escuro) e de odor.

5.6.2. Teste de estabilidade

A seguir, os resultados da avaliação física e físico-química realizada durante o **teste de estabilidade** das amostras de **Creme A e B** (Tabela 7 e Figuras 26 a 29), **Gel A e B** (Tabela 8 e Figuras 30 a 33) e **Xampu A e B** (Tabela 9 e Figuras 34 a 37). As fotos das formulações cosméticas avaliadas em t0, 30 e 60 dias de teste de estabilidade são apresentadas nas Figuras 38, 39 e 40, respectivamente.

Tabela 7. Avaliação física e físico-química das amostras do **Creme A** e **Creme B** no estudo de estabilidade

CREME A e CREME B																	
		FREEZER				REFRIGERADOR				AMBIENTE				ESTUFA			
<i>Tempo (dias)</i>	T0	7	15	30	60	7	15	30	60	7	15	30	60	7	15	30	60
pH_A	6.45	6.25	6.37	6.09	6,24	6.40	6.34	6.02	6,49	6.37	6.65	5,90	5,67	6.01	5.98	5.56	5,42
$Asp._A$	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor_A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
$Odor_A$	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N
$Visc._A$ (cP)	31000	27200	24100	24700	24300	29500	29500	30000	28300	29400	29300	29500	33400	31100	35500	34000	32800

pH_B	6.47	6.15	6.19	6.08	6,13	6.16	6.24	6.09	6,34	6.26	6.47	6.04	5,49	5.82	5.85	5.71	5,39
$Asp._B$	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	N	N	N	N
Cor_B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
$Odor_B$	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
$Visc._B$ (cP)	51500	47900	52400	52900	52500	49000	47800	49500	48000	52500	55900	52100	51100	51100	52200	47900	46200

Legenda:**Asp: Aspecto:** N - normal, sem modificação; LM - levemente modificado; M – modificado.**Cor:** N – normal (creme A: bege; creme B: mais amarelado), sem modificação; LM - levemente modificada e M – modificada.**Odor:** N -normal, sem modificação; LM - Levemente modificado; M – Intensamente modificado.**Visc:** viscosidade aparente em *centipoise* (cP).**Valores de pH** – média de duplicatas.

Figura 26. Variação (%) do valor de pH do **Creme A**

Figura 27. Variação (%) do valor de pH do **Creme B**

Figura 28. Variação (%) de viscosidade aparente do **Creme A**

Figura 29. Variação (%) de viscosidade aparente do **Creme B**

Tabela 8. Avaliação física e físico-química das amostras do **Gel A e Gel B** no estudo de estabilidade

GEL A e GEL B																	
		FREEZER				REFRIGERADOR				AMBIENTE				ESTUFA			
Tempo (dias)	T0	7	15	30	60	7	15	30	60	7	15	30	60	7	15	30	60
pH _A	6,6	6,22	6,31	6,04	6,1	5,9	6,12	6,06	6,15	6,04	6,24	5,62	5,48	5,67	5,51	5,28	5,2
Asp. _A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	N	N	N	M
Cor _A	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	M
Odor _A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Visc. _A (cP)	15200	14400	14100	15600	13700	15500	15900	14900	16000	15800	15600	16300	300	15700	15200	13400	16800
pH _B	6,4	6,42	6,41	6,58	6,55	6,49	6,4	6,5	6,46	6,39	6,37	6,54	6,42	6,4	6,33	6,38	6,34
Asp. _B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor _B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM
Odor _B	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Visc. _B (cP)	24500	24300	24200	32500	32100	24700	26100	21200	22900	24900	22700	22000	19300	22000	22200	19000	20600

Legenda:**Asp: Aspecto:** N - normal, sem modificação; LM - levemente modificado; M – modificado.**Cor:** N – normal (gel A: amarelo; gel B: amarelo mais claro), sem modificação; LM - levemente modificada e M – modificada.**Odor:** N -normal, sem modificação; LM - Levemente modificado; M – Intensamente modificado.**Visc:** viscosidade aparente em *centipoise* (cP).**Valores de pH** – média de duplicatas.

Figura 30. Variação (%) do valor de pH do **Gel A**

Figura 31. Variação (%) do valor de pH do **Gel B**

Figura 32. Variação (%) de viscosidade aparente do **Gel A**

Figura 33. Variação (%) de viscosidade aparente do **Gel B**

Tabela 9. Avaliação física e físico-química das amostras do **Xampu A** e **Xampu B** no estudo de estabilidade

XAMPU A e XAMPU B																	
		FREEZER				REFRIGERADOR				AMBIENTE				ESTUFA			
<i>Tempo (dias)</i>	T0	7	15	30	60	7	15	30	60	7	15	30	60	7	15	30	60
<i>pH_A</i>	6,2	6,21	6,22	6,23	6,17	6,23	6,21	6,22	6,25	6,22	6,22	6,16	6,07	6,18	6,17	6,19	6,33
<i>Asp._A</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	LM	M	M	M	M	M
<i>Cor_A</i>	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	M
<i>Odor_A</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Visc._A (cP)</i>	210	200	240	230	180	190	230	240	220	240	-	420	-	-	-	-	-

<i>pH_B</i>	6,26	6,23	6,26	6,26	6,24	6,17	6,2	6,21	6,28	6,16	6,2	6,18	6,05	6,06	5,95	5,92	5,62
<i>Asp._B</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M
<i>Cor_B</i>	N	N	N	N	LM	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	M
<i>Odor_B</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Visc._B (cP)</i>	4180	3940	4430	4390	3780	4130	4330	4470	3870	3930	4300	4580	3950	1860	510	830	140

Legenda:**Asp: Aspecto:** N - normal, sem modificação; LM - levemente modificado; M – modificado.**Cor:** N – normal (xampu A: verde escuro; xampu B: verde perolado), sem modificação; LM - levemente modificada e M – modificada.**Odor:** N -normal, sem modificação; LM - Levemente modificado; M – Intensamente modificado.**Visc:** viscosidade aparente em *centipoise* (cP).**Valores de pH** – média de duplicatas.

Figura 34. Variação (%) do valor de pH do **Xampu A**

Figura 35. Variação (%) do valor de pH do **Xampu B**

Figura 36. Variação (%) de viscosidade aparente do **Xampu A**

Figura 37. Variação (%) de viscosidade aparente do **Xampu B**

Figura 38. Fotos das formulações cosméticas no início do teste de estabilidade normal (t0)

	Creme A	Creme B	Gel A	Gel B	Xampu A	Xampu B
Temperatura Ambiente
Freezer
Refrigerador
Estufa

Figura 39. Fotos das formulações cosméticas submetidas ao teste de estabilidade por 30 dias

	Creme A	Creme B	Gel A	Gel B	Xampu A	Xampu B
Temperatura Ambiente
Freezer
Refrigerador
Estufa

Figura 40. Fotos das formulações cosméticas submetidas ao teste de estabilidade por 60 dias

No desenvolvimento de produtos cosméticos a escolha de matérias-primas deve ser criteriosa, a fim de obter um produto final estável durante seu prazo de validade e com características sensoriais aceitáveis pelo consumidor (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002). Nesta pesquisa diversas formulações foram testadas e avaliadas quanto às suas características sensoriais e organolépticas, como aspecto, espalhabilidade, suavidade, untuosidade, pegajosidade, dentre outras.

Na elaboração do **Creme A** optou-se por uma cera auto-emulsionante não iônica, utilizando como base emulsificante o Polawax[®], um produto de reação de álcoois graxos superiores (cetílico e estearílico) com óxido de etileno, permitindo facilidade na obtenção de emulsões estáveis, eficientes, seguras e bem toleradas pela pele (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2000; LEONARDI, 2004; RIBEIRO, 2006).

Na elaboração do **Creme B** utilizou-se Hostacerin[®] SAF, uma base que associa em sua composição doadores de viscosidade, emulsionantes e emolientes, possibilitando o preparo de emulsões com caráter aniônico a frio (SOUZA, 2004).

As substâncias formadoras de géis, geralmente são polímeros que quando dispersos em água doam viscosidade à formulação. O gel pode ser formado por matéria-prima natural, sintética ou semi-sintética, como goma adraganta, pectina, carbômeros, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, entre outros. O sensorial promovido pelos diferentes polímeros é bastante variável, sendo que alguns géis apresentam toque mais seco enquanto outros são mais pegajosos (LEONARDI, 2004).

Os componentes básicos de um xampu são tensoativo aniônico, estabilizador de espuma, espessante, conservante, essência e água, podendo conter substâncias ativas, tensoativos anfóteros, não iônicos e opacificantes. O corante verde foi adicionado aos xampus com a finalidade de melhorar as

características organolépticas da preparação, devido a mesma conter extrato vegetal e interferir na coloração final dessa formulação.

Alguns componentes da formulação podem causar problemas na viscosidade do xampu, como essências e extratos vegetais, enquanto álcoois graxos etoxilados e diestearato de polietilenoglicol atuam como espessantes. A formação de espuma e a viscosidade adequada de um xampu oferecem ao consumidor sensorial bastante agradável (LEONARDI, 2004).

O estudo de estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições que o produto pode estar sujeito, desde sua fabricação até o final de sua validade. Para disponibilizar esses produtos para o consumo, a avaliação da estabilidade é requisito fundamental à qualidade e segurança dos mesmos. O estudo de Estabilidade Normal por 90 dias fornece dados para prever a estabilidade do produto, estimar o prazo de validade e a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (BRASIL, 2004).

No estudo de estabilidade realizado, foram consideradas as características organolépticas, físicas e físico-químicas para avaliar as formulações cosméticas. Para critério de seleção das formulações cosméticas, consideraram-se elegíveis aquelas formulações com modificações menos intensas (**LM**) das características iniciais (**t0**) e com menor variação de pH e viscosidade durante o estudo. O objetivo do teste foi selecionar uma formulação de cada tipo (creme, gel e xampu) para ser submetida as demais etapas dessa pesquisa.

A avaliação das características organolépticas (aspecto, cor e odor) dos **Cremes A e B (Tabela 7)**, apresentou o aspecto do **Crema A** levemente modificado (**LM**) na condição de freezer em 60 dias de teste e o odor levemente modificado (**LM**) em temperatura ambiente com 30 dias. No **Crema B** ocorreu alteração mais intensa (**M**) do aspecto em temperatura ambiente em 60 dias de estudo. A variação do valor de pH (**Tabela 7 e Figuras 26 e 27**) dos **Cremes A e**

B estavam de acordo com os critérios previamente estabelecidos (10-15%), no entanto, observou-se maior variação no **Creme B**, durante todo o estudo. Em relação à viscosidade aparente (**Tabela 8 e Figuras 28 e 29**), tanto o **Creme A** como o **creme B** apresentaram pequenas variações nas condições analisadas, que não foram perceptíveis visualmente. Este fato indicou estabilização da emulsão e a importância do período de repouso de 24 horas após o preparo das formulações, antes de seu armazenamento nas diversas condições. Esta resposta foi favorável às duas preparações, pois frequentemente, a elevação da temperatura, causa redução do valor da viscosidade aparente, permitindo que as gotículas da fase interna da emulsão colidam com maior magnitude, em função da intensificação da cinética e do movimento *browniano* destas, aumento da energia fornecida pelo aquecimento e resistência inadequada ao deslocamento das partículas da fase interna da emulsão em consequência da diminuição da consistência da fase externa (MAIA, 2002; ANVISA, 2004).

Em relação às formulações **Gel A e Gel B (Tabela 8)**, observaram-se modificações (**M**) no aspecto e cor do **Gel A**, com aumento da temperatura (estufa) e do tempo de armazenamento (60 dias). Estas observações estão de acordo com estudos de estabilidade citados na literatura, onde a ação do calor e o tempo de armazenamento propiciam modificações nas características organolépticas das formulações e sugerem que seu armazenamento seja ao abrigo do calor (LEONARDI; CAMPOS, 2001; MAIA, 2002; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2002). No **Gel B** ocorreram apenas modificações leves (**LM**) na cor, observando-se também a influência do tempo e temperatura de armazenamento.

As variações do valor de pH do **Gel A e B (Tabela 8 e Figuras 30 e 31)** estavam de acordo com a especificação estabelecida. Apesar disso, o **Gel A** apresentou uma variação maior (pH inicial= 6,6 e pH final= 5,2) no final do teste e na condição de maior temperatura de armazenamento (estufa). Em relação à variação de viscosidade aparente (**Tabela 8 e Figuras 32 e 33**), somente o **Gel A**

apresentou uma queda brusca de viscosidade em temperatura ambiente com 60 dias de teste, que foi perceptível visualmente e ocasionou modificação no aspecto da preparação.

Considerando-se as modificações ocorridas nas formulações **Xampu A (transparente) e B (perolado)**, apresentadas na **Tabela 9**, observa-se que ambas formulações apresentaram leves alterações (**LM**) e alterações intensas (**M**) na cor, nas condições de freezer e estufa, nos intervalos de tempo de 30 e 60 dias. O **Xampu B** também apresentou modificações pouco intensas na cor e odor na condição de armazenamento no refrigerador com 60 dias de estudo.

Considerando-se a variação de pH (**Tabela 9 e Figuras 34 e 35**), ambas formulações estavam de acordo com a especificação técnica estabelecida, com pequenas variações em relação ao valor inicial. Referente a viscosidade aparente inicial (**Tabela 9**), o **Xampu A** não alcançou o mesmo espessamento que o **Xampu B**, apesar de serem testadas diversas proporções de cloreto de sódio (espessante). Este fato pode ter ocorrido provavelmente, por interação do sistema tensoativo com o extrato do *R. rosaefolius*, previamente diluído em álcool absoluto.

A variação de viscosidade aparente (**Tabela 9 e Figura 36**) alterou intensamente (**M**) o aspecto do **Xampu A**, devido ao aumento significativo de viscosidade da referida formulação, em temperatura ambiente e estufa, durante todo o estudo de estabilidade. Como não foi possível detectar esse aumento nas condições pré-estabelecidas do viscosímetro, descritas em Material e Métodos (**item 4.5.2.2.3**), estabeleceu-se o valor de variação de viscosidade em 2% para expressar graficamente esse aumento de viscosidade do **Xampu A**.

No caso do **Xampu B** ocorreu redução dos valores de viscosidade aparente (variação negativa) (**Tabela 9 e Figura 37**), na condição de estufa em 60 dias de teste, que modificou visualmente o aspecto da referida formulação.

Considerando-se as modificações ocorridas durante o estudo de estabilidade normal e os aspectos sensoriais das formulações cosméticas avaliadas, elegeram-se para as próximas etapas dessa pesquisa, as formulações **Creme A** (emulsão não-iônica), **Gel B** (gel aniônico) e **Xampu B** (perolado).

5.6. Avaliação da eficácia do sistema conservante das formulações cosméticas

A **Tabela 10** apresenta os resultados de recuperação dos microrganismos na condição de neutralização adotada no teste (Material e Métodos **item 4.5.4.**). Observa-se que o controle apresentou a recuperação sempre maior que 70% para todos os microrganismos, comprovando a viabilidade dos microrganismos durante o teste e garantindo que as recuperações menores que 70% eram devidas à condição não adequada para o crescimento dos microrganismos. Ressalta-se que no procedimento da Farmacopéia Americana (USP XXIX) não é descrita a utilização de um controle, no entanto, para assegurar a validação realizou-se, também esse ensaio.

Utilizando caldo neutralizante D/E, foi possível recuperar todos os microrganismos (**Tabela 10**) das formulações avaliadas (Creme A, Gel B e Xampu B), confirmando a inativação do sistema conservante e garantindo assim confiabilidade nos resultados. Portanto, para o teste de eficácia de conservantes, descrito em Material e Métodos **item 4.5.5.**, procedeu-se a diluição das formulações em D/E e contagem de microrganismos sobreviventes nos períodos imediatamente após a inoculação, 2, 7, 14, 21 e 28 dias.

Tabela 10. Recuperação dos microrganismos das formulações cosméticas avaliadas na condição de neutralização estudada para inativação do sistema conservante

Microrganismo	Controle	Creme A	Gel B	Xampu B
<i>P. aeruginosa</i>	>70%	>70%	>70%	>70%
<i>E. coli</i>	>70%	>70%	>70%	>70%
<i>S. aureus</i>	>70%	>70%	>70%	>70%
<i>Burkholderia cepacia</i>	>70%	>70%	>70%	>70%
<i>C. albicans</i>	>70%	>70%	>70%	>70%
<i>A. niger</i>	>70%	>70%	>70%	>70%

Controle de viabilidade celular: solução salina 0,85% (p/v) e microrganismo teste

Amostras-teste (Creme A, Gel B, Xampu B) = produto preparado com conservante, em condições assépticas; cada valor representa a média do ensaio realizado em cinco réplicas.

Para avaliação da eficácia do sistema conservante, os métodos oficiais (U.S. Pharmacopoeia, 2008) e não oficiais *The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association* (CTFA, 2001) foram utilizados, pois estes fornecem informações para melhor conduzir o ensaio. Como descrito no **item 4.5.5.**, o teste consiste na contaminação proposital com *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* em cada amostra, em seguida determina-se a carga de sobreviventes em períodos pré-estabelecidos durante 28 dias, utilizando-se técnica de contagem microbiana convencional validada (**item 4.5.2.**). Os resultados da avaliação da atividade conservante, do extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. 0,2% (p/v), nas formulações **Creme A**, **Gel B** e **Xampu B** são apresentados a seguir (Tabelas 11 a 16).

Tabela 11. Carga de sobreviventes de *Escherichia coli* IAL 2393 (ATCC 10536) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Amostra	Intervalo de tempo					
	T ₀	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
Creme A	$1,5 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel B	$1,5 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu B	$1,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^2$	< 10	< 10	< 10	< 10
Controle	$2,3 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	$6,1 \times 10^5$

T₀ = contagem imediatamente após a inoculação.

T₂, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ = contagem em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

Controle de viabilidade celular: solução salina e microrganismo teste.

Tabela 12. Carga de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1874 (ATCC 9027) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Amostra	Intervalo de tempo					
	T0	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
Creme A	$1,2 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel B	$1,0 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu B	$9,2 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Controle	$1,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$

T0 = contagem imediatamente após a inoculação.

T₂, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ = contagem em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

Controle de viabilidade celular: solução salina e microrganismo teste.

Tabela 13. Carga de sobreviventes de *Staphylococcus aureus* IAL 1875 (ATCC 6538) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Amostra	Intervalo de Tempo					
	T0	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
Creme A	$9,7 \times 10^5$	30	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel B	$2,1 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu B	$4,9 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Controle	$2,0 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$

T0 = contagem imediatamente após a inoculação.

T₂, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ = contagem em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

Controle de viabilidade celular: solução salina e microrganismo teste.

Tabela 14. Carga de sobreviventes de *Burkholderia cepacia* IAL 1834 (ATCC 17.759) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Amostra	Intervalo de Tempo					
	T0	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
Creme A	$4,2 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel B	$6,7 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu B	$2,6 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Controle	$3,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$

T0 = contagem imediatamente após a inoculação.

T₂, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ = contagem em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

Controle de viabilidade celular: solução salina e microrganismo teste.

Tabela 15. Carga de sobreviventes de *Candida albicans* IAL 1611 (ATCC 10231) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Amostra	Intervalo de Tempo					
	T0	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
Creme A	$5,2 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
Gel B	$4,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	70	$6,4 \times 10^3$	Incontável	$1,1 \times 10^6$
Xampu B	$4,4 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Controle	$5,9 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$	$4,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$

T0 = contagem imediatamente após a inoculação.

T₂, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ = contagem em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

Controle de viabilidade celular: solução salina e microrganismo teste.

Tabela 16. Carga de sobreviventes de *Aspergillus niger* IAL 2122 (ATCC 16404) (UFC/g) no Teste de Eficácia de Conservantes

Amostra	Intervalo de Tempo					
	T ₀	T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
Creme A	$3,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$
Gel B	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Controle	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$

T₀ = contagem imediatamente após a inoculação.

T₂, T₇, T₁₄, T₂₁ e T₂₈ = contagem em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

Controle de viabilidade celular: solução salina e microrganismo teste.

A presença de microrganismos em produtos não estéreis pode ser condição relacionada à deterioração do produto; bem como o não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação pode, também, conduzir a produção com qualidade sanitária inadequada. Esse processo pode até ser observado nos casos em que o substrato oferece condições mínimas necessárias para o desenvolvimento microbiano. Os contaminantes, muitas vezes, sobrevivem e multiplicam-se em meio pobre de fatores nutricionais ou mesmo adaptam-se em condições bastante desfavoráveis. A proliferação de microrganismos pode provocar alterações de diversas naturezas, como perda do teor da substância ativa e alterações físico-químicas e/ou organolépticas do produto. Portanto, a comprovação da qualidade microbiana de produtos cosméticos, objetiva evitar essas alterações e, principalmente, a transmissão de doenças, pois o consumidor se em condições debilitadas, e por vezes com imunidade baixa, torna-se susceptível à ação de microrganismos contaminantes (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Para produtos cosméticos é permitido nível limite de microrganismos viáveis, mas restringe-se, porém, a ausência de patogênicos específicos. Assim, a formulação deve ser criteriosamente estudada no tocante a eficácia do sistema conservante do produto, essa só pode ser garantida através de teste de eficácia

ou desafio. Para garantir que o teste de desafio seja realizado de forma adequada, há a necessidade de validação do teste para cada produto. De acordo com a Farmacopéia Americana (U.S. Pharmacopoeia, 2008), o conceito de validação para os métodos microbiológicos é a recuperação dos microrganismos durante o teste, diferente dos métodos químicos e físico-químicos que consideram os parâmetros de especificidade/seletividade, intervalo de curva de calibração, linearidade, limite de quantificação e detecção, exatidão, precisão e robustez.

A validação tem como finalidade garantir a neutralização ou inativação da atividade antimicrobiana do conservante na contagem de microrganismos viáveis, utilizando a técnica por semeadura em profundidade ou “Pour Plate”. O teste visa à seleção das condições de neutralização do conservante durante o período de incubação das placas contendo o produto, os microrganismos e os meios de cultura utilizados no teste de eficácia de conservantes. A escolha da condição de neutralização ou sistema de recuperação dos microrganismos deve ser adequada, pois influencia a acuidade e sensibilidade dos dados experimentais a serem obtidas pelo uso da técnica de semeadura da amostra diluída em meio sólido. Os compêndios oficiais apresentam recomendações, mas o método e a escolha da condição de neutralização do sistema conservante são de responsabilidade do laboratório produtor. Para cada fórmula há uma condição mais adequada, isto é, ação neutralizante rápida não comprometendo o crescimento dos microrganismos presentes na amostra.

A porcentagem adotada de recuperação do microrganismo inoculado é de 70%, para comprovação da inativação do sistema conservante e confiabilidade nos resultados, de acordo com a Farmacopéia Americana (U.S. Pharmacopoeia, 2008), capítulo <1227> *Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles*. Os valores abaixo de 70% não são considerados e indicam que os inativantes e/ou a concentração dos mesmos estão inadequados, devendo ser alterados. De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 10**, constata-se que o inativante de escolha (diluente D/E), utilizado no teste, é adequado.

O teste foi realizado, concomitantemente com solução salina 0,85% (p/v) inoculada com a mesma carga microbiana das amostras teste, a suspensão foi considerada controle e teve como intuito a verificação da viabilidade dos microrganismos desafiantes durante os 28 dias do teste. Nesta consideração, verificou-se que as bactérias *Escherichia coli* (**Tabela 11**), *Pseudomonas aeruginosa* (**Tabela 12**), *Staphylococcus aureus* (**Tabela 13**) e *Burkholderia cepacia* (**Tabela 14**) apresentaram-se viáveis durante todo o teste, assim como os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* que se mantiveram, também, adequados no decorrer do tempo de avaliação (**Tabelas 15 e 16**). No entanto houve decaimento do número de microrganismos sobreviventes e posterior aumento, ou mesmo só o decaimento no decorrer do tempo. Em se tratando de manter o microrganismo em solução salina esse comportamento pode ser considerado normal uma vez que o meio de cultivo é pobre em nutrientes, ocorrendo uma menor multiplicação do germe. O aumento pode ser explicado pela adaptação dos microrganismos frente a essa condição.

Como descrito em Material e Métodos (**no item 4.5.6.**), os critérios de aceitação do sistema conservante foram de acordo com o CTFA (2001) que requer 7 dias e 28 dias, como período de tempo de avaliação do decréscimo da carga microbiana em relação a carga inicial (t_0). No entanto, para acompanhar criteriosamente o comportamento da carga microbiana durante o ensaio foram analisados, também, os intervalos de tempo de 2, 14 e 21 dias. Adicionalmente, essas determinações poderiam informar a ocorrência do fenômeno conhecido como "reboud" ou "Phoenix", que apresenta decaimento do número de microrganismos sobreviventes e posterior aumento do número, no decorrer do tempo do teste (BLOOMFIELD, 1988).

O fenômeno *Phoenix* foi observado no acompanhamento da carga de sobreviventes de *Candida albicans* para o Gel B apresentado na **Tabela 15**. Houve um decaimento do número de sobrevivente em 7 dias e com posterior aumento nos tempos subseqüentes (14, 21 e 28 dias). As razões que justificam esse comportamento podem ser devido ao produto apresentar como conservante,

somente o extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. 0,2% (p/v) em concentração próxima à concentração mínima inibitória; pela redução da sua concentração livre decorrente da interação deste com outros componentes da formulação e ou pela seleção de microrganismos resistentes durante o teste (BLOOMFIELD, 1988). Esses resultados evidenciam a necessidade de realizar o teste em período longo e confirmam a exigência dos compêndios oficiais e não oficiais de preconizarem o tempo de 28 dias para o teste de eficácia de sistemas conservantes.

Analisando-se os resultados do teste de eficácia para todas as formulações em estudo, verifica-se que para as bactérias estudadas foram encontrados números de sobreviventes menores que 10 UFC/g em 7 dias e nenhum aumento foi observado até o final do teste, no 28º dia (**Tabelas 11 a 14**). Durante o experimento, não houve sobreviventes após a incubação das placas de Petri contendo a diluição 10^{-1} da amostra, assim a apresentação dos resultados como menor que 10 UFC é forma convencional de expressar esse comportamento na amostra. Esses resultados indicam que o extrato de *R. rosaefolius* incorporado nas formulações apresentou atividade conservante satisfatória.

Para a *Candida albicans* apenas o **Xampu B**, no teste de desafio, atendeu as especificações adotadas. As amostras de Creme A e Gel B não atenderam o critério de aceitação, uma vez que não houve redução logarítmica preconizada e apresentou crescimento da carga microbiana no intervalo de tempo igual a 28 dias.

Na avaliação da eficácia do sistema conservante frente ao bolor *Aspergillus niger*, as amostras de Creme A e Gel B não atenderam a especificação adotada, pois não apresentaram redução logarítmica no intervalo de tempo igual a 7 dias, apesar de demonstrarem uma redução da carga microbiana. Diante desse resultado insatisfatório e devido a insignificante atividade antimicrobiana do extrato da planta em relação ao bolor, apresentado no teste de concentração mínima

inibitória (item 5.5.2., figura 21), não foi realizado o teste de desafio para a amostra de xampu.

5.7. Avaliação da compatibilidade de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm. sobre equivalentes dermo-epidérmicos – sistema ar-líquido

Na **Figura 41**, observam-se os sistemas equivalentes dermo-epidérmicos, cultivados na superfície ar-líquido, utilizados como controle (sem contato com as formulações), e os sistemas em contato com as formulações cosméticas contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius* , por 0, 24 e 48 horas.

Tempo de contato (horas)			Formulações
0			Gel / xampu Creme / controle
24			Gel / xampu Creme / controle
48			Gel / xampu Creme / controle

Figura 41. Fotos dos tempos 0, 24 e 48 horas. Contato dos controles e amostras teste das formulações gel, creme e xampu, contendo o extrato de *R. rosaefolius*, no sistema dermo-epidérmico

Este teste foi elaborado para mimetizar *in vitro* prováveis alterações ocasionadas nas células da epiderme, caso o extrato de *R. rosaefolius* seja liberado da formulação, entrando em contato direto com esse tecido. Para tanto foram testadas 3 formulações Crema A, Gel B e xampu B, contendo como conservante o extrato vegetal, sendo que as mesmas foram utilizadas como

controle (sem extrato) e amostras teste (com extrato) e todas as formulações foram mantidas em contato com o equivalente dermo-epidérmico, por 24 e 48 horas.

5.7.1. Estudos histológicos – microscopia ótica dos fragmentos dermo-epidérmicos

Após o término do ensaio de compatibilidade epidérmica, as formulações foram retiradas e os fragmentos dos equivalentes dermo-epidérmicos foram estudados por microscopia ótica após coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) (item 4.6.5.). Na **Figura 42** pode-se observar um corte transversal de um controle do sistema dermo-epidérmico, que foi mantido em contato somente com meio de cultura, durante todo o período do experimento de contato das formulações.

Figura 42. Foto de corte transversal de um fragmento dermo-epidérmico utilizado como controle do experimento. Coloração HE, aumento de 100x

Nas **Figuras 43, 44 e 45**, pode-se observar os cortes transversais dos fragmentos dermo-epidérmicos que permaneceram em contato com as formulações controle gel, creme e xampu e amostras teste contendo o extrato, respectivamente, por 24 e 48 horas.

Figura 43. Fotos dos cortes transversais dos fragmentos dermo-epidérmicos em contato com o gel controle e o gel contendo o extrato, por 24 e 48 horas. Coloração HE, aumento 100x

Figura 44. Fotos dos cortes transversais dos fragmentos dermo-epidérmicos em contato com o creme controle e o creme contendo o extrato, por 24 e 48 horas. Coloração HE, aumento 100x

Figura 45. Fotos dos cortes transversais dos fragmentos dermo-epidérmicos em contato com o xampu controle e o xampu contendo o extrato, por 24 e 48 horas. Coloração HE, aumento 100x

No teste tridimensional, em um sistema ar-líquido utilizando equivalentes dermo-epidérmicos, pode-se prever prováveis alterações ocasionadas nas células da epiderme, caso o extrato de *R. rosaefolius* seja liberado da formulação, entrando em contato direto com estas células.

Na **Figura 43**, avaliando-se os efeitos da formulação gel contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius*, observa-se alterações evidentes nas células viáveis da epiderme quando comparadas com o controle dermo-epidérmico (**Figura 42**) e com o controle de contato da formulação sem o extrato, sendo que estas alterações parecem ser mais intensas após 48 horas de contato. Este fato pode

ser justificado pela composição hidrofílica da formulação, que favorece maior liberação do extrato, o qual apresenta característica mais lipofílica e conseqüentemente menor afinidade com a formulação gel testada.

Na **Figura 44**, avaliando-se os efeitos da formulação creme contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius*, não se observou alterações tão evidentes nas células viáveis da epiderme quanto aquelas observadas na **Figura 43**, apesar dessas alterações aparecerem após 48 horas de contato. Esse comportamento pode ser devido aos componentes lipofílicos contidos na fase oleosa do creme, os quais podem reter o extrato na formulação, ocorrendo assim, uma menor liberação deste.

Na **Figura 45**, podem-se observar alterações nas camadas mais superficiais da epiderme, tanto na amostra teste, quanto no controle. Reação esta já esperada, devido à composição do xampu base que contém alta concentração de tensoativos, substâncias irritantes que induzem mudanças bioquímicas na pele quando aplicadas topicamente, provavelmente devido suas propriedades solubilizantes de membranas lipídicas, o que ocasiona, geralmente aumento da permeabilidade cutânea (EFFENDY; MAIBACH, 1995). Sendo esta formulação de uso para enxágüe, não permanece em contato com a epiderme por períodos prolongados.

6. CONCLUSÃO

- O extrato bruto e a fração clorofórmica de folhas de *R. rosaefolius* Sm., ambos a 0,2% (p/v), apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* IAL 2393 (ATCC 10536), a *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1874 (ATCC 9027), ao *Staphylococcus aureus* IAL 1875 (ATCC 6548), a *Burkholderia cepacia* IAL 1834 ATCC (17759) e a *Candida albicans* IAL 1611 (ATCC 10231).

- Pela facilidade de obtenção considerou-se o extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. o melhor candidato como conservante em formulações cosméticas, o qual mostrou índice de citotoxicidade *in vitro* (IC50) de 1,0 mg/mL.

- As formulações (gel B, creme A e xampu B) estudadas, quando incorporados com 0,2% (p/p) do extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm., apresentaram-se adequadas no estudo de estabilidade, nas condições avaliadas.

- O sistema conservante com 0,2% (p/p) de extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. nas formulações estudadas mostrou-se eficaz frente a *Escherichia coli* (ATCC 10536), a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 6548), a *Burkholderia cepacia* ATCC (17759). Somente o xampu atendeu as especificações adotadas frente à *Candida albicans* (ATCC 10231) e nenhuma das formulações atuou contra o bolor *Aspergillus niger* (ATCC 16404), no teste desafio do sistema conservante. Diante da baixa atuação do extrato vegetal estudado, frente aos fungos, sugere-se a associação com outras substâncias, visando aumentar o espectro de ação do sistema conservante presente nas formulações cosméticas avaliadas.

- A avaliação da compatibilidade epidérmica de formulações cosméticas contendo o extrato bruto de *R. rosaefolius* Sm. depende da influência dos componentes das fórmulas.

O extrato bruto de folhas de *R. rosaefolius* Sm. a 0,2% (p/v) foi selecionado como conservante das formulações cosméticas estudadas, sendo estável em preparações tópicas e apresentar compatibilidade epidérmica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALONSO-AMELOT, M.E.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; CALCAGNO-PISARELLI, M.P. Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 1-10, 2007.

AJAIYEGBA, E.O.; ABIODUN, O.O.; FALADE, M.O.; OGBOLE, N.O.; ASHIDI, J.S.; HAPPI, C.T.; AKINBOYE, D.O. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, v. 13, p.295-298, 2006.

BABY, A. R. **Desenvolvimento e Avaliação da Estabilidade de Formulações Cosméticas Anticelulíticas Contendo o Extrato Comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth, padronizado em Flavonóides Totais**. 2005. 159 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BANOV, D. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato seco de *Ginkgo biloba* L.** 2002. 112 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BARRANDON, Y.; GREEN, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 2302-2306, 1987.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. Cap. 111, 1117 p.

BATISTUZZO, J.A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário Médico-Farmacêutico**. São Paulo: Tecnopress, 2000. 421 p.

BENAVIDES, T., MARTÍNEZ, V., MITJANS, M., INFANTE, M.R., MORAN, C., CLAPÉS, P., CLOTHIER, R., VINARDELL, M.P. Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. **Toxicology**, v. 201, p. 87-93, 2004.

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

BLOOMFIELD, S.F. Microbial contamination: spoilage and hazard. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M. **Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals**, Chichester: Ellis Horwood Limited, 1990. p. 29-52.

BOOCK, K.P. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacao*)**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BOYCE, S.T. Fabrication, quality assurance, and assessment of cultured skin substitutes for treatment of skin wounds. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 107-112, 2004.

BRANDÃO, L.A. **Index ABC: Ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. 2.ed. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2000. 1 CD-ROM.

BRASIL. Resolução RDC n. 162, de 11 de setembro de 2001. A Secretaria de Vigilância Sanitária estabelece a lista de substâncias de ação conservante para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de setembro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2004, v.1, 45 p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2006.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.** [online], v. 55, n. 3, pp. 37-39, 2003.

CAMPANA, R.; SCESA, C.; PATRONE, E.; VITTORIA, E.; BAFFONE, W. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 301-306, 2006.

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

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

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

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

COLLINS, C.H. **Microbiological methods**. 7.ed. Oxford: Butterworth-Hunemann, 1995. 178 p.

CTFA. Technical guidelines. US Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association. Inc, New York 2001.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O. R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004. 310 p.

DAI, N.; YEH, M.; LIU, D.D.; ADAMS, E.F.; CHIANG, C.; YEN, C.; SHIH, C.; SYTWU, H.; CHEN, T.; WANG, H.; WILLIAMSON, M.R.; COOMBES, A.G.A. A co-cultured skin model based on cell support membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, p. 905-908, 2005.

DARBRE, P.D.; HARVEY, P.W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 561-578, 2008.

DRAELOS, Z. **Cosméticos em Dermatologia**. 2.ed. Porto Alegre: Revinter, 1999. 329 p.

DUPONT, S.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B.; DYKES, G. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food and Drug**, v. 41, p. 345-363, 2005.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H.I. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 33, p. 217-225, 1995.

EHRLICH, H.P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 29S-33S, 2004.

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

EUN, H.C.; JUNG, S.Y. Comparison of irritant potential of shampoos using cultured human epidermal keratinocytes model and patch test reaction measured by laser doppler flowmetry. **Contact Dermatitis**, v.30, p.168-171, 1994.

European Pharmacopoeia. 4.ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2002.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O; BINGEL, A .S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Las plantas medicinales en la terapeutica. **Bol. Sanit. Panam.**, v. 107, n. 4, p. 314-27, 1989.

FARRINGTON, J.K., MARTZ, E.L., WELLS, S.J., ENNIS, C.C., HOLDER, J., LEVCHUK, J.W., AVIS, K.E., HOFFMAN, P.S., HITCHINS, A.D., MADDEN, J.M. Ability of Laboratory Methods to Predict In-Use Efficacy of Antimicrobial Preservatives in an Experimental Cosmetic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4553-4558, 1994.

FLORES, M., MORILLO, M., CRESPO, M.L. Deterioration of Raw Materials and Cosmetic Products by Preservative Resistant Microorganisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 40, n.24, p. 157-160, 1997.

FONTQUER, P. **Dicionário de Botânica**. Editorial Labor S A, 1993, vol. 2.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 5.ed. New York: Wiley-Liss, 2005. 642 p.

GIESBRECHT, A.M. **Atividade antibiótica de produtos naturais**. São Paulo, 1980. 64 p. Tese - Livre docência, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

GRANDI, T.S.M., & col. Plantas Medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 3, n.2, p. 185-236, 1989.

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

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p. 985-990, 1999.

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

HERSON, M. R.; MATHOR, M. B.; ALTRAN, S.; CAPELLOZZI, V.; FERREIRA, M. C. *In vitro* construction of a potential skin substitute through direct human

keratinocyte plating onto de-cellularized glycerol preserved allodermis. **Artificial Organs**, v. 25, n. 11, p. 901-906, 2001.

HOOKE, J.D. Rosacea. In MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G. **Flora Brasiliensis**, v. 14, n. 2, p. 1-75, 1967.

HUSSEIN, S.E.; MURET, P.; BERARD, M.; MAKKI, S.; HUMBERT, P. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis-dermis layers (*ex-vivo* study). **Experimental Dermatology**, v. 16, p. 830-836, 2007.

IBARRA, F.; JOHNSON, C.H. Natural Preservation from Concepts in Nature. **Cosmetics & Toiletries**, v. 123, p. 81-90, 2008.

JASSIM, S.A.A., NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 412-427, 2003.

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

JORGE, L.I.F., MARKMAN, B.E.O. Caracterização Histológica das Folhas e dos Frutos de *R. rosaefolius* Smith (amora-do-mato). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.53, p.1-4, 1993.

KAMOLZ, L.P., LUEGMAIR, M., WICK, N., EISENBOCK, B., BURJAK, S., KOLLER, R., MEISSEL, G., FREY, M. The Viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels. **Burns**, v. 31, p. 25-29, 2005.

KANEGUSUKU, M.; SBORS, D.; BASTOS, E.S.; SOUZA, M.M.; CECHINEL-FLHO, V.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; NIERO, R. Phytochemical and Analgesic Activity of Extract, Fractions and a 19-Hydroxyursane-Type Triterpenoid Obtained from *Rubus rosaefolius* (Rosaceae). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 5, p. 999-1002, 2007.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KHAN, Z.K.; KATIYAR, R. Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 87-100, 2000.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo III. São Paulo: Editora BASF S.A., 1995. 683 p.

LEE, E.; AN, S.; CHOI, D.; SEONGJOON, M.; CHANG, I. Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives. **Contact Dermatitis**, v. 56, p. 131-136, 2007.

LEONARDI, G.R.; CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de Formulações Cosméticas, **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, São Paulo, v.3, n.4, p.154-156, 2001.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Livraria e Editora Medfarma, 2004. 234 p.

LI-CHANG, L.; YUE-WEN, C.; CHENG-CHUN, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food and Drug Microbiology**. v.102, p.213-220, 2005.

LIN, P.; VAUGHAN, F.L.; BERNSTEIN, I.A. Formation of interstrand DNA cross-links by Bis-(2-chloroethyl) Sulfide: a possible cytotoxic mechanism in rat keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.218, p. 556-561, 1996.

LINTNER, K., GENET, V. A physical method for preservation of cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 103-115, 1998.

LOPES, P.S. **Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos**. 2003. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MACCIONI, A.M.; ANCHISI, C.; SANNA, A.; SARDU, C.; DESSI, S. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, p. 53-59, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000. 750 p.

MAIA, A.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. São Paulo, 2002. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MANTOVANI, W. Flora fanerogâmica da reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). 79- Rosaceae. **Hoehnea** 9, p. 94-96, 1981.

MATHOR, M.B. **Estudos da expressão gênica mediante utilização de células transfectadas com o gene do hormônio de crescimento humano. “Possível utilização em terapia gênica”**. São Paulo, 1994. 154 f. Tese (Doutorado em Pesquisas Energéticas e Nucleares) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1994.

MAURO, C.; CARDOSO, C.M.Z.; LOPES, P.S.; MARCONDES, E.M.C.; MIRANDA, J.P.; FROTA, M; PACHECO, A.L. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *R. rosaefolius* Sm., Rosaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** , v. 12, Supl., p. 23-25, 2002.

MAZZANTI, G.; MASCELLINO, M.T.; BATTINELLI, L.; COLUCCIA, D.; MANGANARO, M.; SASO, L. Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n.12, p. 83-88, 2000.

MEHMOOD, Z.; AHMAD, I.; MOHAMMAD, F.; AHMAD, S. Indian medicinal plants: a potencial source for anticandidal drugs. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 3, p. 237-242, 1999.

METCALFE, C.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**, Oxford: Clarendon Press, 1950. 539 p.

MIN, B.; LEE, G.; KIM, S.; NAM, Y.; LEE, T.; PARK, W. Eletrospinning of silk fibroin nanofibers and its effects on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 25, p 1289-1297, 2004.

MONTEIRO-RIVIERE, N.; INMAN, A.; RIVIERE, J. Skin toxicity of jet fuels: ultrastructural studies and the effects of substance P. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, p. 339-347, 2004.

MOODY, J.O.; ADEBIYI, O.A.; ADENIYI, B.A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 57-60, 2004.

MORAES, R. Boas práticas de produção e biocidas protegem o consumidor. **Revista Química e Derivados**, v. 475, 2008.

MORETTO, L.D. A estabilidade de fármacos e medicamentos. **Pharmaceutical Tech.**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 46-48, 1999.

NIH Publication. Guidance Document on Using *In Vitro* Data to Estimate *In Vivo* Starting Doses for Acute Toxicity [No: 01-4500, august 2001].

NOGUEIRA, E., ROSA, G.J.M., HARAGUCHI, M., VASSILIEFF, V.S. Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 111-117, 1998.

NOGUEIRA, E., VASSILIEFF, V.S. Hypnotic, anticonvulsant and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis*. Involvement of GABA_A-system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 275-280, 2000.

NOSTRO, A.; CANNATELLI, M.A.; MORELLI, I.; MUSOLINO, A.D.; SCUDERI, F.; PIZZIMENTI, F.; ALONZO, V. Efficiency of Calamintha officinalis essential oil as preservative in two topical product types. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 395-401, 2004.

O'NEILL, M.J.; LEWIS, J.A. The renaissance of plant research in the pharmaceutical industry. In Human Medical Agents from Plants, American Chemical Society, Washington, DC, **ACS Symposium Series 534**, 1993. 48 p.

OKEKE, I.N., LAMIKANRA, A. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 922-928, 2001.

OKEKE, M.I.; IROEGBU, C.U.; EZE, E.N.; OKOLI, A.S.; ESIMONE, C.O. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 119-127, 2001.

OKOLI, A.S.; IROEGBU, C.U. Evaluation of extracts of *Anthocleista djalensis*, *Nauclea latifolia* and *Uvaria afzalli* for activity against bacterial isolates from cases of non-gonococcal urethritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 135-144, 2004.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1991. 412 p.

ORTIZ, K.J., YIANNIAS, J.A. Contact dermatitis to cosmetics, fragrances, and botanicals. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 264-271, 2004.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; LAMER-ZARAWSKA, E.; SWIADER, K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. **Food Chemistry**, v. 100, p. 579-583, 2007.

PAASONEN, L.; KORHONEN, M.; YLIPERTTULA, M.; URTTI, A. Epidermal cell culture model with tight stratum corneum as a tool for dermal gene delivery studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 188-193, 2006.

PAPPINEN, S.; PASONEN-SEPPÄNEN, S.; SUHONEN, M.; TAMMI, R.; URTTI, A. Rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) as a model for chemically induced skin irritation testing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 208 p. 233-241, 2005.

PASHA, C.; NARAYANA, B. A Facile Spectrophotometric Method for the Determination of Hypochlorite using Rhodamine B. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 1, p. 167-170, 2007.

PHARMASPECIAL. Informativo técnico literatura Phenonip® 2004. Disponível em www.pharmaspecial.com.br. Acesso em 05 julho 2007.

PHILLIPS, B.J. Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. **Toxicology in Vitro**, v. 10, p. 69-76, 1996.

PIGOSSI, N.; RAIA, A.; LEX, A; HABRGAMA, A; SIMONSEN, O; HADDAD, J.; STOLF, N.A.G.; ZERBINI, E.J.; MINITI, A; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 17, p. 263-78, 1971.

PINTO, J.A.P.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2003. 325 p.

PROMEGA CORPORATION. Technical Bulletin n° 169: Cell Titer 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Revisado em 07/2001. Disponível em: www.promega.com. Acesso em 05 janeiro 2007.

RABANAL, R.M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 287-292, 2002.

RAHUA, J.; REMES, S.; HINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLOJA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. v.56, p.3-12, 2000.

RAPAPORT, L.; ROBINSON, J. Cell Titer 96[™] and Cell Titer 96[™] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assays. **Promega Notes Magazine**, n. 44, p. 46, 1993.

RÉGNIER, M.; DARMON, M. Human epidermis reconstructed in vitro: a model to study keratinocyte differentiation and its modulation by retinoic acid. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, v.25, p. 1000-8, 1989.

REGNIER, M., CARON, D., REICHERT, U., SCHAEFER, H. Barrier Function of Human Skin and Human Reconstructed Epidermis. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.82, n.4, p.404-407, 1993.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2006. 270 p.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAHM, D.F.; WASHINGTON II, J.A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.;

SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. Cap. 110, 1105 p.

SASSEVILLE, D. Hypersensitivity to preservatives. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 251-263, 2004.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKY, P. **Iniciação à Química Cosmética**. São Paulo: Tecnopress, 2002. v. 3. 78 p.

SEO, S.B., RYU, C.S., AHN, G.W., KIM, H.B., JO, B.K., KIM, S.H., LEE, J.D., KAJIUCHI, T. Development of a natural preservative system using the mixture of chitosan-Inula helenium L. extract. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, p. 195-206, 2002.

SHRIMALI, M.; JAIN, D.C.; DAROKAR, M.P.; SHARMA, R.P. Antibacterial activity of *Ailanthus excelsa* (Roxb). **Phytotherapy research**, v. 15, p. 165-166, 2001.

SHUNYING, Z.; YANG, Y.; HUAIDONG, Y.; YUE, Y.; GUOLIN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.151-158, 2005.

SILVA, J.P., SIQUEIRA, A.M. Acción antibacteriana de extractos hidroalcoólicos de *Rubus urticaefolius*. **Rev. Cubana Plant. Med.** v. 5, n. 1, p. 26-29, 2000.

SIMONS, J. V. **Cosméticos: formulación, preparación y aplicación**. Madrid: Madrid Vicente, 2000. 459 p.

SIMIÉ, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 713-717, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1999. 821 p.

SINGH, R.; JAIN, A.; PANWAR, S.; GUPTA, D.; KHARES. K. Antimicrobial activity of some natural dyes. **Dyes and Pigments**, v. 66, p. 99-102, 2005.

SIVASEGARAN, K.; HO, L.; MORAN, K.L.; BANTSEEV, V.; SIVAK, J.G. Dose-response of the cultured bovine lens to butyl, methyl and propyl parabens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p. 103-110, 2007.

SOUZA, V.M. **Ativos Dermatológicos**. 2.ed. São Paulo: Tecnopress, 2004. v.1, 225 p.

SPRINGFIELD, E.P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, p. 434-439, 2003.

SUFFREDINI, I.; SADER, H.; GONÇALVES, A.; REIS, A.; GALES, A.; VARELLA, A.; YOUNES, R. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 375-384, 2004.

SUHONEN, M.; PANOSSEN-SEPPÄNEN, S.; KIRJAVAINEN, M.; TAMMI, M.; TAMMI, R.; URTTI, A. Epidermal cell culture model derived from rat keratinocytes with permeability characteristics comparable to human cadáver skin. **Eur. Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 107-113, 2003.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X. Z.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449–7454, 2002.

SUN, T.; HAYCOCK, J.; MACNEIL, S. In situ image analysis of interactions between normal human keratinocytes and fibroblasts cultured in three-dimensional fibrin gels. **Biomaterials**, v. 27, p. 3459-3465, 2006.

TADEG, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K.; GEBRE-MARIAN, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.168-175, 2005.

THORNSBERRY, C. Antimicrobial Susceptibility testing: General Considerations. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. Cap. 107, 1059 p.

TORO, J.R., ENGASSER, P.G., MAIBACH, H.I. Cosmetic Reactions. In: MARZULLI, F.N., MAIBACH, H.I. **Dermatotoxicology**, 5.ed. Taylor & Francis, Washington, 1996. p. 607-642.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Pharmacognosy**, 14.ed. London: WB Saunders Co. Ltda, 1996. 612 p.

TSHINBANGU, J.; CHIFUNDERA, K.; KAMISKY, R.; WRIGHT, A.; KÖNIG, G. Screening of African medicinal plants for antimicrobial and enzyme inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.25-35, 2002.

U.S. Pharmacopoeia. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 31/ THE NATIONAL FORMULARY, NF 26 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

UPHOF, J.C. **Dictionary of economic plants**. Weinheim: H.R. Engelmann, 1959. 400 p.

VIoux-CHAGNOLEAU, C., LEJEUNE, F., SOK, J., PIERRARD, C., MARIONNET, C., BERNERD, F. Reconstructed human skin: From photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 2, S1-S12, 2006.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.49-54, 2004.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry**. Madrid: V. Diaz de Santos, 1990. 1039 p.

WITZMANN, F.A.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; INMAN, A.O.; KIMPEL, M.A.; PEDRICK, N.M.; RINGHAM, H.M.; RIVIEE, J.E. Effect of JP-8 jet fuel exposition on protein expression in human keratinocytes cell in culture. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 8-21, 2005.

ZANI, F., MINUTELLO, A., MAGGI, L. SANTI, P., MAZZA, P. Evaluation of preservative effectiveness in pharmaceutical products: the use of a wild strain of *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 322-326, 1997.

ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 221-225, 2001.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165–5170, 2001.

APÊNDICE

Determinação de polifenóis totais e taninos no extrato de folhas de *R. rosaefolius* Sm.

Realizou-se o doseamento de polifenóis totais e taninos no extrato bruto de *R. rosaefolius*, de acordo com a farmacopéia européia (European Pharmacopoeia, 2002), descrito a seguir:

Preparou-se inicialmente a solução do extrato dissolvendo-se 0,2 g do extrato bruto de *R. rosaefolius* em 10 mL de etanol PA (Merck, Darmstadt, Germany). A seguir dissolveu-se 1,0 mL da solução do extrato em 10 mL de água destilada e essa diluição foi considerada solução mãe.

Para a determinação de polifenóis totais, diluiu-se 5 mL da solução mãe em 25 mL de água destilada. Retiraram-se 2 mL dessa solução e misturou-se com 1,0 mL do reagente *ciocalteau* (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma Chemical CO. St. Louis), 10 mL de água destilada e diluiu-se para 25 mL em balão volumétrico, com uma solução 29% (p/v) de carbonato de sódio anidro PA (Synth). Após 30 minutos mediu-se a absorbância (Spectrophotometer DU[®] 640, Esalab) em 760 nm (A1).

A determinação de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele foi realizada em tubo de ensaio adicionando-se 10 mL da solução mãe e 0,1 g do pó de pele (Merck), agitando-se vigorosamente por 60 minutos (180 rpm) em banho de água termostatzado (banho incubador modelo 501ID, Nova Ética). Em seguida, filtrou-se e diluiu-se 5,0 mL do filtrado para 25 mL de água destilada em balão volumétrico. Retirou-se 2,0 mL dessa solução e misturou-se com 1,0 mL do reagente *ciocalteau*, 10mL de água e diluiu-se para 25 mL com uma solução de

carbonato de sódio 29%. Após 30 minutos, mediu-se a absorbância em 760 nm (A2).

A solução padrão foi preparada dissolvendo-se 50 mg de pirogalol (Merck) em água destilada para 100 mL num balão volumétrico. Diluiu-se 5,0 mL dessa solução em 100 mL de água destilada num balão volumétrico. Retirou-se 2,0 mL dessa solução, misturou-se com 1,0 mL do reagente *ciocalteau*, 10 mL de água e diluiu-se para 25 mL com uma solução de carbonato de sódio 29%. Após 30 minutos, mediu-se a absorbância em 760 nm (A3).

Para determinação da curva-padrão de pirogalol, realizaram-se diluições a partir da solução padrão de pirogalol em água destilada, obtendo-se as concentrações de 100, 50, 25 e 5 mg/L. Para a leitura das absorbâncias, o procedimento foi semelhante ao da solução padrão.

O cálculo para detecção de polifenóis totais (PT) e taninos (T) presentes no extrato de *R. rosaefolius* é dado pelas equações:

$$\% \text{ PT} = \frac{3,125 \times A1}{A3 \times m_1} \qquad \% \text{ T} = \frac{62,5 \times (A1 - A2) \times m_2}{A3 \times m_1}$$

Onde:

m_1 : massa da amostra examinada.

m_2 : massa de pirogalol

A1: absorbância medida em 760 nm correlacionada à quantidade de polifenóis totais no extrato.

A2: absorbância medida em 760 nm correlacionada à quantidade de polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele.

A3: absorvância medida em 760 nm que corresponde à solução padrão de pirogalol.

Na figura abaixo pode-se verificar a curva padrão de pirogalol para determinação de polifenóis totais.

Figura 46 - Curva padrão de pirogalol

O cálculo para detecção de polifenóis totais (PT) e taninos (T) presentes no extrato de *R. rosaefolius* é dado pelas equações:

$$\% \text{ PT} = \frac{3,125 \times A1}{A3 \times m_1} = 10,23\%$$

Onde:

$$m_1 = 0,2 \text{ g}$$

$$A1 = 0,1754$$

$$A3 = 0,2679$$

$$\% \text{ T} = \frac{62,5 \times (A1 - A2) \times m_2}{A3 \times m_1} = 5,8\%$$

Onde:

$$m_1 = 0,2 \text{ g}$$

$$m_2 = 0,05 \text{ g}$$

$$A1 = 0,1754$$

$$A2 = 0,0749$$

$$A3 = 0,2679$$

ANEXO

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP