

NÃO LILACS
23.109

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE
EM XAMPU ANTICASPA COM
CETOCONAZOL A 2%**

Robson Vicente Machado de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:
Prof^a Dr^a Mitsuko Taba Ohara

15906
São Paulo
1999

DEDALUS - Acervo - CQ



30100002247

Ficha Catalográfica

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

O48a Oliveira, Robson Vicente Machado de
Avaliação do sistema conservante em xampu anticaspa com
cetoconazol a 2% / Robson Vicente Machado de Oliveira -- São
Paulo, 1999.
198p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ohara, Mitsuko Taba

1. Xampu : Controle de qualidade biológico 2. Farmacotécnica
I. T. II. Ohara, Mitsuko Taba. orientador.

668.55 CDD

Robson Vicente Machado de Oliveira

AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM
XAMPU ANTICASPA COM
CETOCONAZOL A 2%

COMISSÃO JULGADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

Prof^ª Dr^ª Mitsuko Taba Ohara
Presidente e Orientador

Prof^ª Dr^ª Érika Rosa Maria Kedor
1^º Examinador

Prof^ª Dr^ª Maria José Vieira da Fonseca
2^º Examinador

São Paulo, 24 de Junho de 1999

À minha esposa VÂNIA ELIZABETH CAMPOS

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade.

À Coordenadoria da CAPES.

À Professora Doutora MITSUKO TABA OHARA pela dedicada orientação que tornou possível a concretização deste trabalho.

À Professora Associada TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO.

À Professora Doutora TELMA MARY KANEKO.

Ao Professor Doutor VICENTE DE OLIVEIRA FERRO

À ROSA NORIKO YAMAMOTO.

Ao Senhor CARLOS EDUARDO BARBOSA.

À colega MÁRCIA REGINA SPURI ESPINELLI LEMES DE SOUSA.

À bibliotecária MOEMA RODRIGUES DOS SANTOS.

Ao Senhor JOSÉ DE SOUSA SOBRINHO.

À colega NÁDIA ARACY BOU CHACRA.

Ao colega AILSON DA LUZ ANDRÉ DE ARAÚJO.

Ao colega MÁRCIO FERRARINI.

À todos os professores, funcionários e colegas que auxiliaram na elaboração deste trabalho.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	3
3	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	CASPA	4
3.1.1	Conceitos sobre caspa	4
3.1.2	Fatores etiológicos da caspa	8
3.1.3	Métodos de avaliação da caspa e da eficácia de produtos anticaspa	12
3.1.4	Princípios ativos anticaspa	14
3.1.4.1	Cetoconazol	17
3.1.4.2	Outros compostos	19
3.1.5	Produtos anticaspa	21

3.2	MICROORGANISMOS CONTAMINANTES	25
3.3	SISTEMAS CONSERVANTES	30
3.3.1	Características	30
3.3.2	Características de alguns conservantes antimicrobianos	40
3.3.2.1	Parabenos	40
3.3.2.2	Fenoxietanol	41
3.3.2.3	Imidazolidinil uréia	43
3.3.2.4	Diazolidinil uréia	44
3.3.2.5	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol	45
3.3.2.6	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano	47
3.3.2.7	Formaldeído	47
3.3.2.8	Hidroximetilglicinato de Sódio	48
3.3.2.9	1,2-dibromo-2,4-dicianobutano	49
3.3.2.10	Ácido salicílico	50
3.3.3	Fatores que influem na eficácia antimicrobiana	51
3.4	ESTUDOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SISTEMAS CONSERVANTES	56
3.4.1	Características	56
3.4.2	Características comuns aos estudos desafio	61
3.4.3	Testes desafio e de uso efetuados em produtos de higiene e cosméticos	64

4 MATERIAL E MÉTODOS	68
4.1 MATERIAL	68
4.1.1 Xampus sem conservantes	68
4.1.1.1 Matérias-primas	68
4.1.1.2 Preparações	69
4.1.2 Conservantes e ácido salicílico	70
4.1.2.1 Matérias-primas	70
4.1.2.2 Soluções de conservantes	71
4.1.3 Xampus com conservantes ou ácido salicílico	72
4.2 MÉTODOS	74
4.2.1 Preparação dos xampus sem conservantes (preparações 1 a 6)	74
4.2.1.1 Preparação da solução de ácido cítrico 10% (p/v)	74
4.2.1.2 Preparação da solução de trietanolamina 20% (p/v)	74
4.2.1.3 Preparação dos xampus com o cetoconazol a 2% (p/v) (preparações 2, 4 e 6)	74
4.2.1.4 Preparação dos xampus sem cetoconazol (preparações 1, 3 e 5)	75
4.2.1.5 Acondicionamento dos xampus	75
4.2.2 Preparação das soluções de conservantes (Sc1 a Sc7)	76

4.2.3	Preparação dos xampus com conservantes ou ácido salicílico (preparações 7 a 32)	76
4.2.3.1	Preparo dos xampus utilizando-se da preparação número 2 (preparações 7 a 18 e 25 a 32)	78
4.2.3.2	Preparo dos xampus utilizando-se da preparação número 3 e 4 (preparações 19 a 24)	79
4.2.3.3	Acondicionamento dos xampus	80
4.2.4	Análise físico-química dos xampus	81
4.2.4.1	pH	81
4.2.4.2	Doseamento do cetoconazol por espectrofotometria	81
4.2.4.2.1	Preparação da solução padrão de cetoconazol 2% (p/v)	82
4.2.4.2.2	Preparação da solução da amostra e do controle (branco)	82
4.2.4.2.3	Preparo do aparelho e leitura das absorbâncias	83
4.2.4.2.4	Cálculos	83
4.2.4.3	Teste de estabilidade do cetoconazol	83
4.2.5	Avaliações microbiológicas	84
4.2.5.1	Preparação dos meios de cultura	84
4.2.5.2	Preparação das soluções	85
4.2.5.2.1	Solução fisiológica	85
4.2.5.2.2	Solução fisiológica com 1% (p/v) de polissorbato 80	85
4.2.5.2.3	Solução de cloreto de trifetil tetrazólio (CTT) a 1% (p/v)	86

4.2.5.3	Manutenção dos microrganismos	86
4.2.5.3.1	Bactérias	86
4.2.5.3.2	Leveduras e bolores	86
4.2.5.4	Determinação da carga microbiana viável	87
4.2.5.4.1	Técnica da semeadura em profundidade	87
4.2.5.4.2	Técnica da filtração por membrana de ésteres de celulose	87
4.2.5.4.3	Cálculo da carga microbiana	88
4.2.5.5	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras pelo teste de desafio	88
4.2.5.5.1	Preparo e padronização das suspensões microbianas	88
4.2.5.5.2	Teste de desafio das amostras com microrganismos	89
4.2.5.5.3	Interpretação dos resultados	90
4.2.6	Avaliação da atividade antimicrobiana dos xampus sem conservante	91
4.2.6.1	Teste do desafio com bactérias	91
4.2.6.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	91
4.2.6.1.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92
4.2.6.1.3	<i>Pseudomonas cepacia</i>	92
4.2.6.2	Teste do desafio com leveduras e bolores	92
4.2.6.3	Interpretação dos resultados	94
4.2.7	Avaliação da atividade antimicrobiana das soluções aquosas de conservantes pelo teste de desafio	94
4.2.7.1	Teste de desafio	94
4.2.7.2	Interpretação dos resultados	95

4.2.8	Avaliação da atividade antimicrobiana dos xampus adicionados de conservantes ou ácido salicílico pelo teste de desafio	95
4.2.8.1	Teste de desafio	95
4.2.8.2	Interpretação dos resultados	96
4.2.9	Teste do uso	96
4.2.9.1	Amostras utilizadas	96
4.2.9.2	Seleção e procedimento dos usuários	97
4.2.9.3	Avaliações microbiológicas	97
4.2.9.3.1	Contagem de bactérias viáveis	97
4.2.9.3.2	Contagem de leveduras e bolores viáveis	98
4.2.9.3.3	Identificação de microrganismos contaminantes	98
4.2.9.4	Interpretação dos resultados	98
5	RESULTADOS	99
5.1	XAMPUS SEM CONSERVANTE	99
5.1.1	Análise físico-química dos xampus	99
5.1.1.1	pH	99
5.1.1.2	Doseamento	100
5.1.2	Avaliação da atividade antimicrobiana	101
5.1.2.1	Teste de desafio pelo método da regressão linear	101
5.1.2.2	Teste de desafio pelo método oficial	110
5.1.2.3	Teste do uso	113

5.1.2.3.1	Quantificação da carga contaminante	113
5.1.2.3.2	Identificação do microrganismo contaminante	113
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE CONSERVANTES	114
5.2.1	Teste de desafio pelo método da regressão linear	114
5.2.2	Teste de desafio pelo método oficial	118
5.3	XAMPUS ADICIONADOS DE CONSERVANTES OU ÁCIDO SALICÍLICO	119
5.3.1	Análise físico-química dos xampus	119
5.3.2	Avaliação da atividade antimicrobiana	120
5.3.2.1	Teste de desafio pelo método da regressão linear	120
5.3.2.2	Teste de desafio pelo método oficial	128
5.3.2.3	Teste do uso	131
6	DISCUSSÃO	132
6.1	FORMULAÇÃO DOS XAMPUS	132
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS XAMPUS SEM CONSERVANTE	133
6.2.1	Teste do desafio	133

6.2.2	Teste do uso	138
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CONSERVANTES EM SOLUÇÃO AQUOSA PELO TESTE DO DESAFIO	141
6.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS XAMPUS ADICIONADOS DE CONSERVANTES OU ÁCIDO SALICÍLICO	145
6.4.1	Teste do desafio	145
6.4.1.1	Xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol	146
6.4.1.2	Xampus com hidroximetilglicinato de Sódio	147
6.4.1.3	Xampus com metilparabeno isolado ou em associação com propilparabeno	148
6.4.1.4	Xampus com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano	149
6.4.1.5	Xampus com ácido salicílico	150
6.4.2	Teste de uso	153
6.5	TESTE DE ESTABILIDADE DO CETOCONAZOL NOS XAMPUS	155
6.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	157
7	CONCLUSÕES	159
	APÊNDICE	161

RESUMO	180
SUMMARY	182
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184

1

INTRODUÇÃO

A caspa manifesta-se no couro cabeludo pela escamação crônica constante, não inflamatória e com produção e liberação de flocos de escamas de pele seca de coloração acinzentada, podendo ou não ocasionar ainda prurido, rubor e alopecia.^{2, 46, 66, 121, 124, 137, 139}

Existe muita divergência em relação aos fatores considerados etiológicos da escamação excessiva do couro cabeludo, entre os quais citam-se o aumento da renovação celular^{46, 121, 124}, o aumento e acúmulo da secreção sebácea^{124, 139} e a presença de microrganismos como o *Malassezia furfur*^{2, 5, 46, 124}. Considerando-se esses fatores, um produto para o tratamento da caspa deve conter princípios ativos que apresentam propriedades citostáticas, ou de limpeza, ou fungicidas ou características queratolíticas, ou ainda a associação destas substâncias⁴⁶.

Atualmente, existe uma grande variedade de produtos destinados ao tratamento da caspa, que vão desde cosméticos vendidos em supermercados e perfumarias, até os medicamentos industrializados e as fórmulas magistrais. Os xampus representam o veículo mais comum para os princípios ativos anticaspa. Em 1980, nos Estados Unidos, dos 6 xampus mais vendidos, 2 possuíam indicação para o tratamento da caspa⁶⁶.

Na década de 80 introduziu-se o cetoconazol no grupo dos princípios ativos anticaspa, veiculado em xampu na concentração de 2%. O cetoconazol é um agente antifúngico imidazólico de amplo espectro de ação^{1, 8, 58, 61, 62, 104, 132, 134}, ativo sobre o fungo associado à caspa³⁶.

Os microrganismos, além de causar danos à saúde do homem, quando presentes em produtos cosméticos ou farmacêuticos, causam a deterioração dos mesmos pela ação enzimática de seus processos biológicos vitais, alterando as características estéticas e funcionais originais do produto. Além disso, seus metabólitos podem ser toxinas altamente perigosas à saúde dos usuários ^{44, 69, 80, 130}.

Os microrganismos contaminantes de produtos não estéreis podem ser provenientes de matérias-primas contaminadas, ou podem ser introduzidos acidentalmente durante a sua produção, mesmo em processos executados segundo as boas normas de fabricação, ou pelo próprio usuário final ^{31, 130}.

Para prevenir a ação de microrganismos, conservantes são incluídos nas fórmulas de cosméticos e em algumas matérias-primas que possuem grande susceptibilidade à contaminação microbiana, como é o caso dos tensoativos aniônicos para xampus ¹¹⁷. Os conservantes atuam sobre algumas estruturas das células dos microrganismos, causando destruição e morte. Contudo, essas substâncias podem agir também sobre as células do homem, quando o produto entra em contato com a pele, causando reações alérgicas. Nenhum conservante está isento dessas características toxicológicas. Além disso, os conservantes representam um custo na fórmula, encarecendo o produto.

Considerando-se a característica antimicrobiana intrínseca do próprio cetozonazol e também de conservantes que podem estar presentes nos tensoativos utilizados, faz-se necessário o estudo da atividade antimicrobiana de xampus com estas características, quanto a necessidade de adição de conservantes na fórmula.

Se comprovada a sua necessidade, a escolha do conservante e da concentração a ser utilizada devem ser definidas por estudos de eficácia antimicrobiana.

2

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi apresentar uma fórmula base, devidamente estudada quanto a eficácia antimicrobiana, para a formulação de xampu anticaspa com cetoconazol, a ser utilizada em farmácias de manipulação.

3

REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CASPA

3.1.1 Conceitos sobre caspa

A caspa é uma moléstia caracterizada pela escamação crônica constante e não-inflamatória do couro cabeludo, apresentando como sintoma característico a produção de escamas, podendo ocorrer rubor e prurido associados ^{2, 48, 110, 137}.

A incidência da caspa na população é muito comum, e é raro encontrar-se indivíduos que não apresentam nenhuma caspa ². Num estudo efetuado nos Estados Unidos em 1980, verificou-se que apenas 5% da população estudada não apresentava nenhum sintoma da caspa ². Reforça este dado, o resultado obtido do levantamento de xampus no mercado americano em que se constatou que das 6 marcas mais vendidas, 2 eram anticaspa ⁶⁷.

A caspa é muito difícil de ser avaliada clinicamente pois os critérios utilizados são muito subjetivos, dependendo da habilidade e do conhecimento do dermatologista que faz o exame. A caspa pode ser classificada quanto a severidade e a intensidade, e em geral, nos estudos descritos na literatura, encontraram-se as graduações: 0-nenhuma, 1-suave, 2-moderada, 3-intensa e 4-severa ^{46, 52, 73}.

ROIA e VANDERWICK ¹¹⁶, utilizando 24 pacientes sem caspa e 28

com caspa, verificaram que aqueles com os valores médios dos pesos das escamas liberadas entre 13,3 até 40,0 mg não apresentavam escamação visível; aqueles com valores médios entre 40,0 até 79,9 mg apresentavam escamação visível. A presença de caspa moderada e severa foi verificada em indivíduos que apresentavam valores médios entre 80,0 até 119,9 mg e maiores que 120,0 mg, respectivamente.

A escamação do extrato córneo paraqueratótico ocorre devido a aceleração da renovação celular ^{66, 121}.

A renovação celular inicia-se na porção central da epiderme. As células multiplicam-se e empurram as células das outras camadas mais externas. Essas, então se tomam rígidas e achatadas, formando uma estrutura entrelaçada, a melanina é decomposta, perdem contato com o líquido intersticial e são liberadas como pó queratinoso praticamente invisível ⁵⁷. No caso da caspa, esse pó queratinoso é produzido muito intensamente, formando aglomerados de escamas visíveis que são liberadas.

As escamas ou flocos de pele seca são ricas em grupamentos sulfidril, pentoses e pobres em nitrogênio amínico livre ⁵ podendo apresentar secreção sebácea ¹³⁹

O tecido do couro cabeludo apresenta na epiderme as camadas basal e córnea. Através da comparação destas camadas no estado normal e quando na presença de caspa, observam-se nítidas diferenças em relação ao número de camadas de células presentes, uniformidade da aparência, queratinização e a velocidade de multiplicação ².

No couro cabeludo normal, a camada córnea é composta da junção de 25 a 30 camadas de células, podendo chegar a 48. Cada camada é composta de células poligonais com alguns focos de reprodução celular intensa e com poucas irregularidades. Sofre constante escamação, e o processo de multiplicação celular é mais rápido que o de outras células do organismo. Já no estado de caspa, a camada córnea possui menos camadas de células, num total de até 10 ou 15 e muitos focos de reprodução intensa. Isto resulta em diferentes espessuras, tornando-a muito irregular e com contorno ondeado, com fendas profundas e deslocamento de grupos celulares, que

tendem a enrolar e curvar. Ocorre então, a formação de microfocos de paraqueratose e liberação de escamas. As células apresentam-se com o núcleo desorganizado, poucos desmossomas e muitas gotículas de lipídeo que servem de nutriente aos microrganismos associados à moléstia^{2, 48}.

A camada basal produz as células que descamarão posteriormente. No estado de caspa, esta camada é menor. A velocidade de proliferação das células em pessoas com caspa é o dobro⁴⁸ ou o triplo¹²⁴ daquela em pessoas em estado normal. Em condições normais do couro cabeludo, uma célula produzida na camada basal demora de 20 a 30 dias para atingir a camada córnea. Essa mesma célula leva apenas de 7 a 10 dias quando na presença de caspa⁴⁸. Isto ocasiona um processo denominado paraqueratose, onde há queratinização incompleta das células^{2, 121}.

O conteúdo de zinco que as células do tecido com caspa apresentam é o dobro da quantidade deste elemento em relação às células de tecidos normais. O excesso de zinco está relacionado ao aumento da atividade enzimática¹²¹.

HARRY⁵⁷ classificou a caspa em três tipos: pitíriase sicca (ou pitíriase simples captis), siborréia sicca e pitíriase esteatóide (ou pitíriase serosa). As características das duas últimas são semelhantes às da dermatite seborréica (também denominada pitíriase circinata).

A pitíriase sicca ou pitíriase simples captis é causada por agressões mecânicas e químicas ao couro cabeludo, que se apresenta seco, sem sebo, e os sintomas da escamação aparecem imediatamente e desaparecem quando o agente agressor é retirado.

A siborréia sicca do couro cabeludo apresenta-se gordurosa, ocorre somente a partir do 12 anos de idade e está associada ao aumento da produção de sebo, de característica crônica, diferente do sebo normalmente produzido nas células do couro cabeludo. Este tipo de caspa surge após 3 a 4 dias do aumento da produção sebácea.

A pitíriase esteatóide, também denominada pitíriase serosa, apresenta-se com produção de escamas muito gordurosas que ficam aderidas ao couro

cabeludo, acompanhadas de exsudação, de cura espontânea somente após alguns anos.

Segundo BONADEO ¹⁶, a caspa apresenta um ciclo de duas fases, uma inicial exógena seguida de uma endógena. Na primeira fase ocorre o aumento da secreção sebácea e a lipólise por enzimas de bactérias e fungos, liberando ácidos graxos. Estes são oxidados por peroxidases também de origem microrgânica, pelo oxigênio do ar ou pela radiação luminosa, formando lipoperóxidos que são irritantes ao couro cabeludo. Na fase endógena, os lipoperóxidos passam a ser liberados de maneira crônica, acelerando a mitose do couro cabeludo. Ocorre então uma evolução queratogênica anormal do couro cabeludo, desencadeando a paraqueratose, com produção de células queratínicas nucleadas desidratadas, com excesso de grupos sulfidrílicos e mucopolissacarídeos. A paraqueratose evolui então para descamação e são liberadas as escamas.

Além da caspa, outras moléstias, como a dermatite seborréica e a psoríase, são caracterizadas pelo aumento da produção de escamas no couro cabeludo. Apesar de estas moléstias apresentarem como sinal a escamação excessiva da pele, possuem alguns aspectos diferentes. A caspa e a dermatite seborréica iniciam-se na puberdade e a psoríase, na idade adulta. Os sintomas da caspa são mais intensos no inverno, enquanto que os da dermatite seborréica e da psoríase são exacerbados quando o paciente está estressado. A caspa é restrita ao couro cabeludo enquanto a dermatite seborréica e a psoríase podem ocorrer na face e nas dobras do corpo (joelhos e cotovelos). Todas as três moléstias estão associadas a alteração na velocidade de renovação celular, entretanto enquanto nas duas primeiras essa velocidade é duplicada, na psoríase apresenta-se multiplicada por 10 a 20 vezes a normal ^{48, 66, 121}. Outra característica de diferenciação é que a caspa não é inflamatória nem apresenta bordas, enquanto a dermatite seborréica e a psoríase são ambos processos inflamatórios, apresentando bordas, indistintas no caso da dermatite e pontiagudas na psoríase. Em relação às escamas, as da caspa são acinzentadas, enquanto as da dermatite seborréica são gordurosas e as da psoríase, prateadas e friáveis ^{2, 43, 57, 66}.

3.1.2 Fatores etiológicos da caspa

Os fatores etiológicos da caspa não estão comprovadamente definidos.

Segundo ACKERMAN E KLIGMAN ², quando se deixa de lavar o couro cabeludo durante duas semanas pode-se desenvolver a escamação, que pode ser tratada pela simples limpeza com xampus sem princípio ativo ^{4, 48, 94}.

Entre os fatores responsáveis pela caspa são citados: agressão ao couro cabeludo, desequilíbrio do balanço entre a produção e escamação das células epidérmicas ^{48, 124}, o acúmulo de secreção sebácea ^{124, 108, 139} e a presença de microrganismos ^{2, 43, 52, 57, 108, 116, 133, 136, 139}.

As agressões mecânicas, como pentear e coçar, e químicas, como aplicação de soluções alcoólicas e sabões alcalinos no couro cabeludo, podem provocar o desenvolvimento da caspa. Este tipo de caspa não está associada ao acúmulo de sebo ⁵⁷. O processo de pentear exageradamente o cabelo também pode ocasionar exaustão do folículo piloso e queda do fio ⁵.

Segundo SPORR ¹²⁴ e WEDDEBURN ¹³⁹ a caspa está associada ao aumento e acúmulo de secreção sebácea no couro cabeludo. Este aumento de secreção pode ser decorrente de fatores nutricionais como deficiência de vitaminas A, B e E, e ingestão de alimentos gordurosos, como chocolate e noz, e fatores fisiológicos, como o balanço hormonal endócrino (hormônios esteróides) aumentado. Estudos com animais mostraram que estes não apresentam caspa porque possuem muito pouca secreção sebácea ¹²⁴.

HARRY ⁵⁷ analisou o quociente colesterol-lecitina e colesterol-fosfatídeos no sangue de indivíduos normais e portadores de moléstias seborréicas da pele e obteve valor de 1:0,83 e 1:1,25 respectivamente para a primeira relação e 1:4 e 1:40, respectivamente no segundo estudo.

ALEXANDER ⁵ observou em seu experimento que a redução da oleosidade do couro cabeludo, em mulheres, promove redução da caspa e da queda de cabelos.

O couro cabeludo em condições normais apresenta flora microbiana da ordem de 10^5 a 10^6 microrganismos aeróbicos/cm². No estado de caspa, esta flora torna-se exacerbada, chegando a apresentar seis vezes mais

microrganismos aeróbios e duas vezes os anaeróbios em comparação aos números obtidos pela análise do couro cabeludo normal. Esta flora é constituída de bactérias e fungos. Segundo estudo de VANDERWICK e ROIA ¹³⁶, foram isoladas 25 espécies de bactérias e 15 de leveduras. Os microrganismos mais freqüentemente isolados e em maior número foram *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium acnes* e *Malassezia furfur* ².

ROIA e VANDERWICK ¹¹⁶ realizaram um estudo com 24 e 28 pacientes com e sem caspa, respectivamente, em relação a flora microbiana do couro cabeludo. As freqüências em porcentagem com que os pacientes apresentavam os diferentes microrganismos, os quais foram isolados por estes autores, estão listadas na tabela I.

TABELA I Freqüência de pacientes, com e sem caspa, com os diferentes microrganismos presentes no couro cabeludo

Microrganismos	Pacientes (%)	
	Com Caspa	Sem Caspa
<i>Malassezia furfur</i>	96,4	75,0
<i>Rhodotaruta</i>	28,6	20,8
<i>Aspergillus awamori</i>	100,0	95,8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	67,9	25,8
<i>Aspergillus flavus</i>	14,3	8,3
Actinomicetos	21,4	4,5
Leveduras	56,4	29,2

O *Malassezia furfur* foi citado na literatura com vários nomes, como *Malassezia ovalis*, *Pityrosporon* de Malassez e *Pityrosporum ovale* ^{57, 75}. Segundo o estudo taxonômico de KURTZMAN ⁷⁵, esse microrganismo também é citado pelo nome de *Pityrosporum orbiculare*. É encontrado normalmente no couro cabeludo, e no estado de caspa em maior quantidade. Este microrganismo é uma levedura lipófila, e como as células do couro

cabeludo apresentam gotículas de lipídeo, encontra-se aí um potencial nutritivo.

A relação da presença do *Malassezia furfur* com a caspa ainda não está elucidada. Existem duas teorias. Uma considera o microrganismo como fator etiológico principal ^{43, 52, 122, 133, 139}, enquanto para a outra é fator secundário, que se desenvolve após instalado o quadro de caspa e passa a induzir maior escamação ^{2, 5, 48, 124, 136}.

GOSSE e VANDERWICK ⁵¹, em análise microscópica, detectaram 5 a 21 células de *Malassezia furfur* por campo nos pacientes com caspa.

ACKERMAN E KLIGMAN ², no teste realizado com aplicação de anfotericina B e nistatina 1% no couro cabeludo de 25 pacientes, observaram a redução na contagem de microrganismos aeróbios, mas não verificaram melhora nos sintomas da caspa. O mesmo foi observado com a aplicação de nistatina 2%.

ALEXANDER ⁵ analisou os microrganismos presentes no couro cabeludo de 141 pacientes com vários níveis de caspa, e obteve 155 culturas de *Malassezia furfur* em diferentes proporções. Entretanto, quando os pacientes foram tratados, os valores séricos desses microrganismos avaliados, pela adição de gamaglobulinas anti-humana em placas, não seguiram diminuição imediata com a melhora no quadro da caspa.

Segundo KOCH ⁵⁷, para que o *Malassezia furfur* possa ser considerado o agente etiológico da caspa, deve apresentar as seguintes características: estar presente em todos os casos da moléstia; ser isolado em cultura *in vitro* e um inóculo dessa cultura em animais deve ocasionar o desenvolvimento da caspa; ser isolado novamente dos animais testados.

Estudos ⁵⁷ mostraram que o *Malassezia furfur* pode ser isolado *in vitro*, quando inoculado no couro cabeludo causa 100% de reações típicas de caspa, e pode ser novamente isolado dos locais onde foi inoculado. Contudo, segundo HARRY ⁵⁷, o microrganismo não pode ser considerado como agente etiológico da caspa, uma vez que não foi detectado em todos os casos da moléstia. WEDDERBURN ¹³⁹, também chegou a essa conclusão, e considerou que o papel do *Malassezia furfur* é acelerar o processo de

queratinização da pele, produzindo metabólitos como Enxofre e Hidrogênio. Segundo o autor, a caspa está associada a presença de vários outros microrganismos tais como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus butilicus*.

GOSSE e VANDERWICK⁵¹ e ROIA e VANDERWICK¹¹⁶ fizeram um estudo com aplicação de um creme contendo 1500 unidades por grama de nistatina e 1,0% de sulfato de neomicina no couro cabeludo de 11 mulheres, 3 vezes ao dia, durante 105 dias. O *Malassezia furfur* foi identificado no couro cabeludo de 96,4% e 75,0% daqueles com e sem caspa, respectivamente. A eliminação da flora microbiana reduziu o peso das escamas em 63,4%. Aplicaram células de *Malassezia furfur* resistente a nistatina e ocorreu aumento de 88,1% no peso médio das escamas produzidas. Verificaram ainda que a diminuição dos microrganismos não provoca diminuição imediata da produção de caspa, fenômeno denominado Lag, e que o aumento do número de microrganismos ocorre antes do aumento da escamação do couro cabeludo.

VANDERWICK e ROIA¹³⁶ estudaram também 9 pacientes do sexo feminino, 7 com caspa, através da aplicação de loções contendo nistatina e também neomicina. Segundo os autores, ocorreu diminuição de 29,7% na produção das escamas, logo após a aplicação da loção nos pacientes com caspa, e de 40,3% no final do teste. A coloração das escamas também mudou de cinza a amarelo. Os microrganismos identificados foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Malassezia furfur*. Apesar destes resultados, os autores concluíram que os microrganismos identificados não são os agentes etiológicos da caspa.

Segundo WEDDERBURN¹³⁹, a presença do *Malassezia furfur* é responsável pela caspa pois este microrganismo promove a queratinização da pele.

TROLLER¹³³ induziu o crescimento deste microrganismo, estafilococos e difteróides em cobaia, pela aplicação de sebo artificial à pele do animal. Após 5 dias, obteve escamas semelhantes às da caspa humana nos animais contaminados com o *Malassezia furfur*. Analisando o sebo que foi

aplicado, detectou grande quantidade de ácido monoenólico C-18, concluindo que este microrganismo atua sobre o sebo, através de enzimas, produzindo o ácido monoenólico C-18.

3.1.3 Métodos de avaliação da caspa e da eficácia de produtos anticaspa

Compreendem métodos *in vivo*, que avaliam o efeito de xampus, loções e tônicos capilares, contendo princípios ativos anticaspa sobre a escamação do couro cabeludo. Inicialmente, observa-se o quadro clínico geral do couro cabeludo dos pacientes com e sem caspa e coletam-se amostras das escamas produzidas para análise quantitativa e qualitativa. Em seguida, os produtos são aplicados, com massagem, no couro cabeludo durante 2-5 minutos, seguido de enxágüe com água. O número de vezes ao dia ou por semana e o período de tempo do teste são previamente estipulados. Os pacientes são orientados a não utilizarem outros tipos de produtos anticaspa durante o teste ^{46, 47}. Decorrido determinado intervalo de tempo, não menor que 30 dias, e até o final do teste, os pacientes são novamente submetidos a análise clínica do quadro, e as escamas da caspa são novamente avaliadas qualitativa e quantitativamente ⁶⁷.

Os procedimentos para se efetuar a coleta de escamas, citados na literatura, compreendem o método do "pente fino com vaselina", o da "escovação sobre superfície de coleta" ⁴² e o da "escovação com coleta em aparelho de aspiração por vácuo" ^{2, 67, 121}. Além destes, foi citado o método de fricção de partes do couro cabeludo raspado, com bastão de teflon, aplicação em seguida de 1 mL de detergente não-iônico tamponado e aspiração dessa solução para um outro recipiente ¹⁰⁹.

Os métodos para análise das características qualitativas e quantitativas das escamas foram agrupados por ACKERMAN e KLIGMAN ², SHUSTER ¹²² e TROLLER ¹³³ em dois tipos: aqueles que avaliam estas características diretamente por pesagem ou contagem e aqueles que estimam essas características em relação às células normais da camada córnea ou da

camada basal do couro cabeludo. São denominados direto e indireto, respectivamente.

Entre os métodos diretos têm-se a pesagem^{51, 136}, determinação em contador de corneócitos¹⁰⁹, eletromicroscopia de imersão⁵¹, utilização de fita adesiva², entumescimento por hidróxido de sódio², da lâmina adesiva², do índice mitótico² e do tempo de trânsito⁷³. Segundo os autores, estes métodos são pouco precisos e pouco reproduzíveis e, na maioria, não incluem o auxílio de microscópio.

O método da fita adesiva consiste no seguinte: raspa-se o couro cabeludo, aplicam-se e retiram-se várias fitas adesivas, sucessivamente, até atingir a camada brilhante; o couro cabeludo é avaliado segundo o número de fitas necessárias. Para o couro cabeludo normal, utilizam-se 26 a 48 fitas, e para aquele com caspa, de 10 a 15, devido à escamação intensa².

O entumescimento por hidróxido de sódio avalia o tempo necessário para as células entumecerem na presença do álcali, o volume final obtido e a presença de camadas de células em coesão. As células do couro cabeludo no estado normal demoram mais tempo e atingem menor volume, devido a maior coesão e organização nas camadas. Além disso, o número de camadas de células coesas no estado normal, entre 25 a 35, é maior que no caso da caspa², ao redor de 15.

O contador de corneócitos determina a quantidade de células que estão descamando e também células paraqueratóticas nucleadas, por centímetro quadrado de couro cabeludo. Este método determina a atividade proliferativa das células germinativas da epiderme, que varia conforme o local do couro cabeludo¹⁰⁹. Segundo SHUSTER¹²², os resultados obtidos por este método são muitos variáveis.

O método do índice mitótico relaciona a porcentagem de células em divisão ao total de células basais; a sua execução é difícil e apresenta muitos erros². Pacientes com caspa apresentam esse valor duplicado, em relação aqueles sem caspa.

O método da lâmina adesiva avalia a quantidade do microrganismo *Malassezia furfur* presente nas escamas do couro cabeludo². GOSSE e

VANDERWICK⁵¹ detectaram 5 a 21 células desse microrganismo por campo em observação microscópica de amostras de escamas de pacientes com caspa.

O método do tempo de trânsito⁷³ estima o tempo necessário para um célula partir da camada basal a atingir a camada mais superficial.

Entre os métodos indiretos têm-se o de marcadores radioativos^{2, 109}, que mede o tempo para que as células da camada basal do couro cabeludo cheguem até a camada córnea. A timidina marcada é incorporada aos núcleos celulares durante a fase S da síntese do DNA. Esse método estima o tempo de renovação celular do couro cabeludo. O teste é realizado pela injeção de solução salina de timidina no couro cabeludo, biópsia após 45 minutos, fixação em formol, exposição a revelador fotográfico e montagem em lâmina.

Tanto testes diretos como indiretos apresentam algumas variáveis que dificultam a avaliação dos produtos anticaspa, como o fato dos pacientes não poderem ser completamente monitorados no modo de uso, podendo ocorrer enormes discrepâncias entre um e outro paciente. A escassez de indivíduos sem nenhuma caspa para serem utilizados como controle é outro problema. SHUSTER¹²² afirmou que os controles utilizados nesses testes são pouco confiáveis, que os estudos efetuados são falhos nos métodos, procedimentos, avaliação estatística, interpretação, reprodutibilidade e obtenção de pacientes controle sem caspa. TROLLER¹³³ também salientou a dificuldade em se obter modelos experimentais confiáveis.

3.1.4 Princípios ativos anticaspa

Os princípios ativos anticaspa atuam sobre as possíveis causas da caspa. São substâncias com atividade citostática, queratolítica ou fungicida além de anti-inflamatórios e anti-sépticos^{66, 137}. Os citostáticos atuam reduzindo a multiplicação celular, os queratolíticos auxiliam a remoção de escamas e os fungicidas ou antimicóticos atuam sobre os microrganismos associados à caspa.

As substâncias mais utilizadas como anticaspa são: cetoconazol, piritionato de Zinco, sulfeto de Selênio, alcatrão da hulha, ácido salicílico, piroctone olamina, alantoína e derivados do amônio quaternário. Entretanto, substâncias como colchicina, hexaclorofeno, fenol, hidrocortisona, Enxofre, além de outras, são citadas com indicações para produtos anticaspa ^{46, 47, 48, 51, 64, 65, 66, 67, 95, 109, 124, 131, 137}.

Os princípios ativos anticaspa foram classificados em relação a segurança e eficácia durante o uso ^{48, 66, 124, 139}. Podem ser: completamente seguros e efetivos, não necessariamente seguros mas efetivos, e não reconhecidos como completamente seguros ou efetivos, mas certamente atóxicos. Com base nessa concepção, receberam as denominações tipo I, II e III, exemplificados na tabela II.

O cetoconazol e algumas outras substâncias anticaspa não foram incluídos nessa classificação porque na época (1983), estes compostos não estavam sendo estudados com essa finalidade. Contudo, essa classificação não é muito precisa, pois o mesmo princípio ativo é associado a classes diferentes, dependendo do autor. Por exemplo, JASS ⁶⁶ considera a alantoína e o cloreto de benzoalcônio pertencentes a como classe III, e a benzocaína, os boratos, o cresol e o resorcinol a II. Já, segundo esse mesmo autor, o FDA considera a alantoína e o cloreto de benzalcônio da classe II, e as outras três substâncias, da classe III.

TABELA II Classificação dos princípios ativos anticaspa quanto a segurança, eficácia e modo de ação ^{48, 66, 124, 139}

Princípios ativos anticaspa	Classe				Modo de ação
	I	II	III	N	
Acido Salicílico	X				queratolítico, antimicrobiano
Alantoína			X		queratolítico
Benzocaína		X			antimicrobiano
Boratos		X			antimicrobiano
Brometo de Alquil-isoquinolina			X		antimicrobiano
Brometo de Isoquinolina			X		antimicrobiano
Brometo de Lauril-Isoquinolina			X		antimicrobiano
Cetoconazol				X	antimicrobiano
Cloreto de Benzaicônio			X		antimicrobiano
Cloreto de Benzetônio			X		antimicrobiano
Cloreto de Metil-benzetônio			X		antimicrobiano
Clorhexadiol			X		antimicrobiano
Cloroxilenol			X		antimicrobiano
Alcatrão da Hulha	X				citostático
Cresol		X			citostático
Detergentes catiônicos				X	desengordurante
Diclorofeno				X	antimicrobiano
Enxofre	X				antimicrobiano
Etohexadiol			X		antisséptico
Fenol			X		antisséptico
Fenolato de Sódio			X		antisséptico
Formaldeído				X	antimicrobiano
Hidrocortisona			X		antiinflamatório
Hexaclorofeno				X	antimicrobiano
Iodo-Povidine			X		antisséptico
Mentol			X		antipruriginoso
Oleato de Mercúrio		X			antimicrobiano
Piritionato de Zinco	X				antimicrobiano, citostático
Piroctone olamina					antimicrobiano
Quinino				X	antimicrobiano
Resorcinol		X			antimicrobiano
Salicilato de Metila			X		antiinflamatório
Salicilato de Sódio			X		antiinflamatório
Sulfeto de Selênio	X				antimicrobiano, citostático
Sulfacetamida sódica				X	antimicrobiano
Timol			X		antimicrobiano
Undecelinatos			X		antimicrobiano

I- completamente seguros e efetivos, II - não necessariamente seguros mas efetivos

III- não completamente seguros ou efetivos mas atóxicos, N - não classificados

3.1.4.1 Cetoconazol

O cetoconazol é uma substância com atividade antimicrobiana. É utilizado no tratamento e controle da caspa, em concentrações de 2,0% e 1,0%, respectivamente ^{20, 67}. É um derivado imidazólico ⁵⁸ de fórmula química $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ e peso molecular 531,4 ^{72, 82, 87}, pertencente ao grupo químico dos derivados aminoalquilbenzeno, sintetizado a partir de 2,4-dicloroacetofenona ^{10, 58}. Sua dissolução depende do pH, sendo maior em valores ácidos, devido ser uma base fraca ²⁵. Possui uma estrutura cristalina com propriedades cromóforas ²⁵.

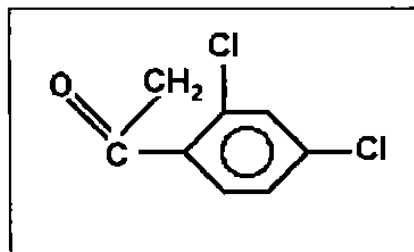


FIGURA 1 Fórmula estrutural da 2,4-dicloro-acetofenona

O cetoconazol é um agente antifúngico de amplo espectro de ação ^{1, 8, 9, 35, 58, 61, 104, 132, 134}. É citado na literatura como sendo ativo contra *Candida albicans*, *Malassezia furfur* ⁸², *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Blastomyce dermatides*, *Coccidioidis immitis*, *Paraccocidioidis brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Phialophora sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum canis*, *Epidermophytum floccosum*, além de bactérias, mais especificamente sobre Gram positivas ⁸².

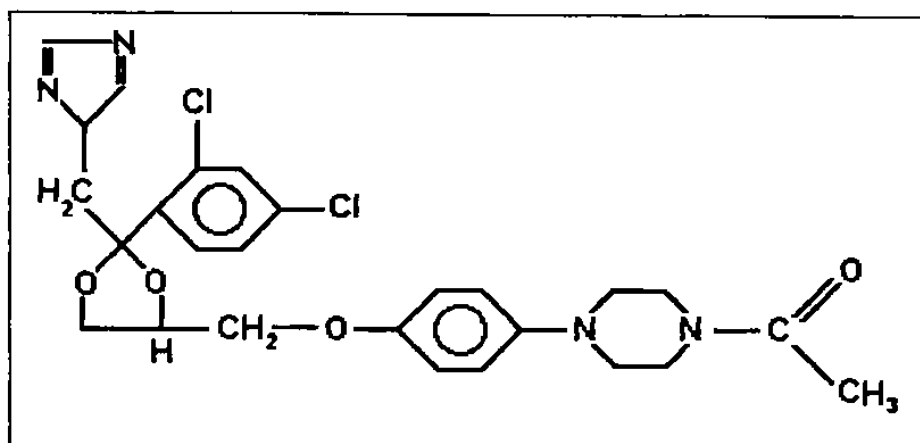


FIGURA 2 Fórmula estrutural do cetozonazol

A atividade antifúngica do cetozonazol é determinada pelo número de átomos de Cloro na molécula ⁵⁹. O seu mecanismo de ação é a inibição da biossíntese do esteróide ergosterol, na membrana celular, e conseqüente alteração da permeabilidade e a morte celular ^{15, 59, 61, 63, 72, 82}. Atua mais especificamente sobre enzimas oxidativas como demetilases, oxidases e peroxidases, como a 14 α demetilase do sistema oxidativo do citocromo P450 e a ciclase-2,3-epoxi-esqualeno-lanosterol da membrana. O cetozonazol também inibe a formação de precursores do ácido desoxiribonucléico e ribonucléico ^{63, 72}, sobre as bactérias, as quais não possuem esteróis na membrana ⁷⁰.

O cetozonazol pode ser absorvido através da pele ⁴⁵, via oral e via mucosas ^{63, 82}. Quando aplicado na pele, acumula-se na camada cutânea, pois liga-se às células do extrato córneo ⁵⁶. É transportado rapidamente pelas glândulas écrinas, e liga-se também aos queratinócitos. Os efeitos adversos pela aplicação tópica são: irritação ocular, dermatite e sensação de queimação na pele. Segundo PIÉRARD-FRANCHISMONT e colaboradores ¹⁰⁸, este princípio ativo promove a diminuição da secreção sebácea, combatendo assim um dos fatores etiológicos da moléstia.

Os estudos de doseamento do cetozonazol citados na literatura se destinavam a avaliação deste em fluidos biológicos ^{6, 7, 11, 123} ou em outras formas farmacêuticas ^{74, 80}, mas nenhuma específica para xampus.

3.1.4.2 Outros compostos

O piritionato de Zinco apresenta atividade bactericida e fungicida, além de atividade antimitótica. É utilizado em concentração de 1,0 até 2,0%, em xampus. Pode causar fotossensibilização reticulóide^{2, 67, 137}. A matéria-prima é comercializada em dispersão aquosa a 48%. Esta substância apresenta propriedades tóxicas quando perde o Zinco, que ocorre na presença de Ferro, Cobre e EDTA²⁹.

ORENTREICH e colaboradores⁹⁵ testaram o efeito de xampu com piritionato de Zinco 2,0% e o controle. Utilizaram 140 pacientes, divididos em três grupos: com caspa suave, moderada e severa, graduada em valores de 0 até 4. Os xampus foram utilizados de maneira habitual durante 6 semanas, quando efetuou-se uma nova avaliação clínica dos pacientes. Segundo os autores, não houve diminuição da oleosidade do couro cabeludo, mas o efeito anticaspa foi superior ao do xampu controle.

O sulfeto de Selênio é utilizado no controle e tratamento da caspa, incorporado em xampus, em concentrações de 1,0 até 2,5%. O tratamento consiste no contato do produto com o couro cabeludo durante 2 a 3 minutos, e aplicado 2 vezes por semana, durante pelo menos duas semanas. Para o controle da caspa, deve ser utilizado em concentrações de 1,00%. O mecanismo de ação desta substância reside nas propriedades citostáticas que promovem a diminuição da multiplicação celular⁶⁷.

SHAZ e SUGDEN¹²¹ testaram o sulfeto de Selênio sobre culturas de *Malassezia furfur in vitro* e obtiveram inibição do crescimento deste microrganismo. Desse modo, alguns autores consideram o mecanismo de ação desse princípio como sendo não-específico^{94, 95}.

Os efeitos adversos são irritação da conjuntiva das áreas genitais e dobras corpóreas e, quando utilizado durante longo períodos, aumento da secreção sebácea do couro cabeludo⁵⁰. A substância é tóxica via oral, e pode ser absorvida pelas mucosas e pele não íntegra. Segundo ALEXANDER⁴, pode ocasionar ressecamento e descoloração dos fios de cabelo, promovendo a alopecia.

PLEWIG e KLIGMAN ¹⁰⁹ analisaram xampus contendo sulfeto de Selênio, em pacientes com caspa, pelo método de marcadores radioativos. Concluíram que este princípio ativo diminui 75% da multiplicação celular em couro cabeludo com caspa e 50% em couro cabeludo normal. Segundo os autores, este efeito é bioquímico e ocorre de maneira subcelular. A biópsia após aplicação de xampu contendo este princípio ativo não demonstrou danos na epiderme. Além disso, essa diminuição ocorre de maneira similar no epitélio e na epiderme.

O ácido salicílico, também denominado ácido ortoxi-benzóico, ácido 2-hidroxi-benzóico ⁸², é utilizado na concentração de 2 a 6 % para o tratamento de hiperqueratose e escamação da epiderme, pela sua atividade queratolítica ^{67, 82} e fungicida. É utilizado no tratamento e controle da dermatite seborréica, ictiose, psoríase, acne e tinha da pele. Atua na caspa removendo as escamas. Contudo, pode ser absorvido na pele e ser excretado lentamente na urina, com efeitos adversos como irritação. Este princípio ativo não deve ser utilizado em áreas extensas, em doses muito altas ou período prolongados de tratamento, em paciente com pele não íntegra ou diabéticos, nem em crianças ²⁰. Pode ser associado a outros princípios ativos como enxofre, resorcinol, ácido benzóico e alcatrão da hulha. Em concentrações acima de 60% é utilizado para remoção de calos e verrugas. Contudo, este princípio ativo não reduz a oleosidade do couro cabeludo ^{94, 95}.

O alcatrão da hulha, também denominado alcatrão mineral e coal tar, promove redução da epiderme e apresenta efeitos antipruriginoso e anti-séptico. Utilizado no tratamento de eczema, psoríase, caspa e dermatite seborréica. O seu mecanismo de ação é citostático ⁶⁷. Embora este princípio ativo, em alguns estudos, apresente efeitos carcinogênicos, foram utilizados em xampus devido a efetividade sobre a diminuição da multiplicação celular ¹³¹. ALEXANDER ⁴, em 1967, testou xampus-controle e xampus com alcatrão da hulha isolado e associado ao sulfossuccinato de alcanolamida de ácido undecilênico, que foram aplicados em 145 pacientes, que apresentavam caspa, durante 10 semanas. Os pacientes que utilizaram xampu sem o princípio ativo tiveram a escamação diminuída somente no primeiro mês do

teste. O xampu com alcatrão da hulha associado ao sulfossuccinato de alcanolamida de ácido undecilênico foi o mais efetivo. Entretanto, a redução da caspa não evidenciou diminuição do prurido.

A colchicina foi outro composto testado como anticaspa. Esta substância possui atividade citostática mas não apresenta atividade antimicrobiana contra o *Malassezia furfur*¹²¹.

O Enxofre possui propriedade queratolítica, antisséptica e parasiticida. Utilizado para o tratamento da caspa, acne, dermatite seborréica, sarna e infecções superficiais por fungos, em concentrações de 10,0%, veiculado em xampus e cremes⁶⁷.

3.1.5 Produtos anticaspa

Os produtos medicamentosos para o tratamento da caspa são indicados para aplicação tópica no couro cabeludo, com a finalidade de limpar e controlar a escamação excessiva. Os cosméticos indicados com anticaspa são também preparações com a finalidade de promover a limpeza e o acondicionamento dos fios, mas fornecendo um resultado mais atrativo do que terapêutico⁵⁹. Além disso, como a própria caspa não está bem caracterizada como uma moléstia ou como um desvio da função normal das células do couro cabeludo, os produtos para o seu tratamento e controle não possuem uma classificação definida entre cosméticos ou medicamentos.

Os produtos anticaspa considerados medicamentos necessitam de prescrição médica e somente devem ser aviados ou dispensados em farmácias e drogarias. Para os considerados cosméticos, não há restrição ao uso e podem ser comercializados livremente junto a outros cosméticos, em farmácias, supermercados e lojas de produtos de toalete.

No Brasil, a portaria 108, publicada no Diário Oficial da União em 26 de Setembro de 1994²⁰, agrupou vários produtos em categorias, tais como: produtos de higiene, cosméticos, perfumes e produtos de uso infantil. Esta mesma portaria definiu o risco a saúde durante o uso, classificando-os em risco mínimo e risco potencial. Os xampus anticaspa estão incluídos nos

produtos de higiene com risco potencial. As loções e os tônicos capilares consideradas cosméticos com risco potencial, porém não se especificou sobre as loções anticaspa. Da mesma forma, os condicionadores foram considerados cosméticos com risco mínimo, entretanto, não há referências sobre os condicionadores anticaspa. Essa portaria fornece também uma tabela de restrição de uso de algumas substâncias, como conservantes, e regulamenta também as informações que devem estar presentes nos rótulos dos produtos finais. O rótulo de produtos contendo ácido salicílico, deve informar a proibição do uso em crianças, e daqueles contendo sulfeto de Selênio, o cuidado para evitar-se contato com os olhos e pele lesionada. Entre as especificações sobre produtos anticaspa, essa portaria estabelece as concentrações máximas dessas substâncias em produtos de higiene: 1% o cetoconazol, 3% para o salicílico, 10% para o enxofre, 1% para o sulfeto de Selênio, 2% para o ácido undecilênico e 2% para o piritionato de Zinco. Contudo, não se estabelece limites de concentração em fórmulas magistrais.

Os produtos anticaspa não são classificados como seus princípios ativos (tipo I, II ou III) em relação à segurança no uso, porque os veículos utilizados alteram a absorção no couro cabeludo^{23, 71}.

A eficiência do tratamento da caspa envolve produtos contendo associação de substâncias com diferentes mecanismos de ação. A associação de um agente antifúngico de amplo espectro de ação, como os derivados imidazólicos, um agente anti-séptico tópico, como o fenol, e um agente queratolítico, como o sulfeto de Selênio ou ácido salicílico, pode resultar em produtos mais eficazes. Além dos princípios ativos, os produtos podem ser adicionados de substâncias antioxidantes para se evitar a formação de sebo oxidado no couro cabeludo, que causa irritação e por sua vez pode desencadear o processo da caspa¹⁶.

O xampu é a forma mais comum de produto anticaspa, pois para a terapia efetiva da caspa com sebo é necessária a limpeza do couro cabeludo gorduroso, eliminando toda a gordura ou sebo já oxidado¹⁶. Os agentes desengordurantes são em geral detergentes pouco irritantes, hipoalergênicos,

espumógenos, mas que não devem retirar demasiadamente a gordura do couro cabeludo para não ressecá-lo ^{124, 139}.

ALEXANDER ⁴ comparou o efeito de xampu com e sem princípio ativo, e de xampu com princípios ativos associados, concluindo que neste último caso, há maior efetividade.

CARR e colaboradores ²⁶ fizeram um estudo, duplo cego, sobre o efeito do xampu de cetoconazol 2% e um outro sem o princípio ativo, em dois grupos de 10 pacientes com caspa. Os níveis de caspa foram graduados de suave, moderada até severa. Os xampus foram utilizados por 12 semanas. Como resultados, obtiveram efeitos de melhoria sobre a caspa de 74% com a utilização de xampu com cetoconazol e nenhum efeito com aquele sem o princípio ativo.

Segundo estudo de PIÉRARD ¹⁰⁷, o uso de produtos para o tratamento do couro cabeludo contendo cetoconazol promove melhora na qualidade geral do cabelo. Esses produtos devem ser utilizados 2 vezes por semana durante 4 semanas ou até desaparecimento dos sintomas, e por mais 2 semanas após ^{37, 38}.

ORENTREICH ⁹⁴ realizou um estudo duplo cego para verificar a efetividade de xampus de Enxofre associado ao ácido salicílico e ao hexaclorofeno em comparação aos xampus com piritionato de Zinco e xampu-controle. A aplicação foi realizada uma vez por semana durante 8 semanas. O exame clínico efetuado após esse período mostrou que os valores de graduações da caspa passaram a 1,3 e o xampu foi considerado bom em 48% e excelente em 28% dos casos, com diminuição de 70% da dermatite seborréica. A atividade do xampu testado foi menor, comparando-se com a do xampu com piritionato de Zinco, ainda que maior que a do xampu controle. Contudo, não se verificou diminuição da oleosidade.

JASS ⁶⁷ citou o estudo de LEYDEN de vários xampus anticaspa. Este estudo mostrou que a utilização do xampu com Piritionato de Zinco a 2,0% reduziu a graduação da caspa de 5,2 para 3,3, o xampu com sulfeto de Selênio de 5,4 para 2,6 enquanto que para o controle, de 5,2 para 4,9.

JASS ⁶⁷ citou um estudo com utilização de xampus contendo piritionato de Zinco a 0,5% e xampus contendo solução dehidroacética, paramonocloroxilenol e alantoína, em pacientes com caspa graduada de leve a severa, durante 3 semanas. Obteve os resultados como bom e excelente em 65% dos pacientes que utilizaram xampu com piritionato de Zinco, e a graduação da caspa reduziu de 2,0 para 0,6. Para os xampus-controle, 43% dos pacientes apresentaram resultados bom e excelente.

Além dos xampus, outras formas de produtos anticaspa como cremes, loções, tônicos e condicionadores capilares foram estudados. GREEN, FARR e SHUSTER ⁵², em um estudo realizado com aplicação de um creme e xampu com cetoconazol a 2%, em 20 pacientes com caspa e dermatite seborréica, observaram a diminuição da escamação e do prurido com os dois produtos. ROSENBERG e BELEW ¹¹⁹ trataram casos de psoríase e dermatite seborréica do couro cabeludo por aplicação tópica de um creme com cetoconazol a 2%, duas vezes ao dia, e obtiveram cura dos sintomas após 4 meses de tratamento. FUTTERER ⁴⁶ testou um tônico capilar com piroctone olamina a 0,1% e um placebo em 107 pacientes. Segundo o autor, o primeiro princípio ativo aliviou a escamação em 49,3% dos pacientes e eliminou totalmente a caspa em 20,8%, enquanto o placebo proporcionou alívio em 17,8% e eliminou totalmente a caspa em apenas 11,5% dos casos.

ORENTREICH e colaboradores ⁹⁵ testaram o efeito de uma suspensão com sulfeto de Selênio a 2,5% e xampu controle, em 140 pacientes divididos, com caspa graduada desde suave até severa. Após 6 semanas não observaram diminuição da oleosidade do couro cabeludo, mas o efeito anticaspa foi superior ao dos xampus-controle.

A formulação de produtos anticaspa envolve solução para problemas inerentes aos princípios ativos, como precipitação, descoloração e odor. Para compensar esses efeitos deve-se formular produtos viscosos, com corantes ou absorventes de irradiação ultravioleta e essências adequadas para mascarar o odor. Recomenda-se acondicionamento em embalagens opacas

3.2 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES

Algumas espécies de microrganismos, adquiridos pelo contato com ar, água ou outras pessoas, desenvolvem-se normalmente na superfície do corpo humano. Estes microrganismos instalam-se na camada que envolve a epiderme, sem contudo causar danos, constituindo a flora microbiana residente ^{113, 129}.

Outras espécies de microrganismos, denominados patogênicos, não participam da flora residente do corpo humano, e quando entram em contato com o organismo e se desenvolvem, promovem alterações graves no estado de saúde, levando a quadros de infecções com manifestação de sintomas característicos ^{60, 116}.

Os microrganismos presentes causam danos à saúde através da liberação substâncias como toxinas, enzimas e produtos metabólitos, pelo acúmulo de microrganismos mortos. Esses fatores podem desencadear processo de irritação e hipersensibilidade (alergia) em indivíduos sensíveis ou sensibilizados ⁶⁹. Essas reações se tornam mais perigosas quando estes são aplicados em pele não íntegra, como na pele apresentando fissuras, cortes, e feridas como a acne ^{19, 40, 81, 85} ou quando os usuários apresentam baixa resistência imunológica às infecções, como as crianças, idosos e pacientes que utilizam drogas imunossupressoras ^{19, 31, 40, 68, 81}.

A aplicação tópica de cosméticos e medicamentos contaminados por microrganismos, patogênicos ou não, pode provocar infecções.

Vários foram os casos de infecções adquiridas pelo uso de produtos de uso tópico contaminados relatados na literatura ^{78, 81, 129}. MADDEN e JACKSON ⁷⁸ citaram o desenvolvimento de blefarite estafilocócica e conjuntivite em pacientes que utilizaram cosméticos contaminados. Segundo MARPLES ⁸¹ e TENENBAUM ¹²⁹, um caso de infecção por *Klebsiella sp* em pacientes foi provocada por enfermeiras que utilizaram uma loção de lanolina para as mãos, contaminada com este microrganismo quando manipularam catéteres. MARPLES ⁸¹ citou ainda o caso de otite externa em bebês

decorrentes da aplicação de solução de hexaclorofeno contaminada por *Pseudomonas sp.*

Por outro lado, os microrganismos contaminantes também representam danos aos produtos, pois provocam alterações nas características físico-químicas originais dos produtos, através de reações enzimáticas de oxidação, redução e hidrólise nos materiais constituintes, promovendo a biodeterioração^{31, 44, 69}. Podem causar: alteração de propriedades reológicas como viscosidade, tornando o produto líquido ou desfazendo emulsões; mudança de coloração ou formação de manchas, como observado por FEAD⁴⁰ e JENKINS⁶⁸ numa loção contaminada por *Serratia marcescens*, cujo produto passou a apresentar manchas; alteração de valores de pH e força iônica.; produção de gases e liberação de odores desagradáveis devido ao acúmulo de microrganismos mortos^{68, 139}.

Vários são os estudos descritos na literatura que mostram que tanto as matérias-primas como produtos são susceptíveis à contaminação microbiana. Segundo McCARTHY⁸⁵, um estudo do FDA, realizado entre 1968 e 1971, isolou 1550 bactérias Gram negativas nas matérias primas de produtos de uso tópico, sendo 50% de *Pseudomonas*. Em 1969¹²⁵ o mesmo órgão detectou contaminação microbiana, principalmente de *Klebsiella* e *Pseudomonas*, em 20% de 169 produtos analisados, como sabões antissépticos, ungüentos oculares, cremes e loções para crianças. BRANNAN¹⁹ citou o caso de contaminação microbiana em máscaras faciais, que representa risco pois se trata de produto utilizado ao redor dos olhos. McCARTHY⁸⁵, no trabalho executado que consistia em análise de contaminação microbiana em produtos cosméticos antes do uso, obteve 12% de produtos contaminados em 165 amostras, sendo que 6,9% dos microrganismos detectados eram *Staphylococcus sp.* A mesma análise efetuada após o uso resultou em 49% de produtos contaminados, em 222 amostras, e a porcentagem de amostras com *Staphylococcus* aumentou para 84%. Este autor citou também o estudo de MEYERS e PASSUTO, também em cosméticos, onde 65% das amostras estavam contaminadas, com fungos. No mesmo trabalho, em uma amostragem de 180 ungüentos tópicos,

encontraram-se 11% e 93% das amostras contaminadas antes e após o uso, respectivamente, e os microrganismos foram identificados como cocos e diplococos Gram positivos.

Os microrganismos podem ser introduzidos acidentalmente nos produtos durante o processo de fabricação, e se multiplicarem durante o armazenamento, ou podem ser introduzidos durante o manuseio pelos consumidores ^{14, 31, 49, 78, 80, 85, 129}. No primeiro caso, podem ser originários das matérias-primas constituintes ou do próprio processo produtivo, mesmo com a obediência às boas normas de fabricação, uma vez que são produtos não estéreis ¹⁴. No segundo caso, o usuário pode introduzir microrganismos durante o uso do produto.

Algumas matérias-primas constituem fontes de Carbono aos microrganismos, como impurezas de água, proteínas, substâncias de origem animal, vegetal como resinas, substâncias biodegradáveis como os tensoativos alquil-benzeno-sulfonatos lineares e sulfatos de álcoois graxos com éter ^{19, 41, 69, 83, 138}. A água representa a principal matéria-prima a promover contaminação microbiana, sendo citada na literatura como responsável por 95% da contaminação microbiana em produtos, principalmente por *Pseudomonas sp* ^{85, 142}. As matérias-primas na forma sólida, como os pós, podem apresentar microrganismos adsorvidos, os quais podem contaminar os produtos finais. Foram encontrados na literatura casos de contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* adsorvido em talco e o *Staphylococcus aureus* em kaolinite ⁸⁶.

No ambiente de produção, a presença de insetos, a limpeza e desinfecção inadequadas de paredes, tetos, chão, as condições também inadequadas do ar e operários não devidamente paramentados e treinados, representam fontes de contaminação microbiana ⁸⁵.

Os equipamentos de fabricação da linha de produção como reservatórios, sistemas de enchimento, tubulações de drenagem e de comunicação podem apresentar locais de difícil limpeza, onde se acumulam resíduos dos produtos, propiciando a multiplicação de microrganismos e conseqüentemente representando focos de contaminação.

O consumidor final, por sua vez, pode expor o produto a condições extremas de introdução de contaminantes, desde o uso até o armazenamento. Durante o uso, determinados produtos, principalmente os cremes, são retirados e aplicados com os dedos, sem lavar previamente as mãos, levando a contaminação do produto pela flora residente da pele. Outros produtos sofrem diluição, acidental durante o uso, como no caso de xampus, ou intencional, como no caso de adição de água para recuperar o restante do produto, que também provoca a inativação do sistema conservante por diluição^{19, 80, 125}. O armazenamento de produtos de higiene é em geral no banheiro, onde há um ótimo ambiente para o desenvolvimento de microrganismos, como umidade, calor, luz solar, sendo até muito comum encontrar-se frascos de xampus e produtos para o tratamento do cabelo e couro cabeludo nas janelas.

Os microrganismos contaminantes podem adaptar-se e tornarem-se resistentes aos sistemas conservantes, em consequência do contato com porções diluídas do produto, condição encontrada em locais de acúmulo de resíduos na linha de produção, na embalagem, ou na pele do usuário, no momento da aplicação^{19, 44, 101}. Os microrganismos possuem sistemas metabólicos versáteis, desenvolvendo a resistência por formação de grupos ou aglomerados celulares, biofilme de substâncias poliméricas ao redor das células, diminuição de metabolismo ou produção de glutatión, ficando inicialmente tolerantes (através de mutação, repressão ou aquisição de plasmídeo) e depois resistentes, transmitindo essa característica por seleção genética e mutação^{44, 89, 91}.

Alguns microrganismos conseguem se desenvolver em determinadas formas farmacêuticas, e não em outras^{85, 142}. YABLONSKI e GOLDMAN¹⁴² afirmaram que a resistência à contaminação microbiana de cremes é menor que de loções, que por sua vez é menor que de géis, e que os xampus representam a forma mais resistente. Os xampus líquidos são susceptíveis a contaminação por bactérias Gram negativas, sendo encontrados *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia raffniae*, *Escherichia cloacae*, *Serratia marcescens*¹⁴², *Aerobacter*

sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Acromobacter sp*, *Alcaligenes sp*. O *Pseudomonas aeruginosa* é o microrganismo que representa maior perigo se desenvolvido em xampus ¹¹⁸. Entretanto outros microrganismos como *Citrobacter*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas sp* também são indesejáveis nesses produtos ¹⁹. Condicionadores de cabelo também são susceptíveis à contaminação, e foram encontradas contaminadas com até 10^6 bacilos por mL ⁶⁵. Loções, quando contaminadas, são normalmente por bactérias Gram negativas como *Pseudomonas sp* e *Serratia sp*. Foram detectados microrganismos contaminantes como *Escopulurapsilopsis brevicaulis* e *Trichoderma viridi* em sabões ⁶⁵. Em produtos para a área dos olhos, como máscaras faciais, delineadores encontrou-se fungos e em talco, *Clostridium tetani* e *Clostridium sporogenes* ⁶⁵.

As especificações de limites de contaminação microbiana são estipulados por órgãos oficiais como as farmacopéias Americana ¹³⁴ e Britânica ²¹. No caso de cosméticos, há a sugestão do CTFA ³², nos Estados Unidos, e portaria 108/94 ²⁰ e a sugestão da Associação Brasileira de Cosmetologia ⁵⁴, no Brasil. As farmacopéias Americana ¹³⁴ e Britânica ²¹ indicam que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* devem estar ausentes em preparações de uso tópico. Já os microrganismos não patogênicos devem estar limitados no produto, no máximo 100 UFC/g ou mL. O CTFA afirma que para xampus não se deve exceder o limite de contagem total de 10^3 UFC/g de viáveis, e para produtos de uso infantil e área dos olhos, no máximo 5×10^2 UFC/g ou mL ³², ⁷⁸, ¹⁴². A Associação Brasileira de Cosmetologia ⁵⁴ sugere o limite de 10^2 UFC/g ou mL para produtos aplicados na área ao redor do olhos e mucosas, ou infantis, e 10^3 UFC/g ou mL para os demais produtos.

3.3 SISTEMAS CONSERVANTES

3.3.1 Características

Conservantes antimicrobianos são substâncias químicas adicionadas aos produtos, em quantidades mínimas capazes de impedir a multiplicação de microrganismos e também destruí-los, prevenindo ou limitando a contaminação microbiana e o desenvolvimento de microrganismos anormais resistentes ^{31, 49, 68, 77, 83, 125, 130, 138, 142}. Possuem a função prevenir a biodeterioração, e conseqüentemente, prolongar a meia-vida e estética do produto. Por outro lado, protegem a saúde dos consumidores durante o uso e possível abuso dos produtos. Contudo, um sistema conservante nunca deve ser colocado à frente das Boas Práticas de Fabricação.

No Brasil, a portaria 108, publicada no Diário Oficial da União em 26 de Setembro de 1994 ²⁰, conceitua conservantes como substâncias adicionadas aos produtos cosméticos, produtos de higiene, perfumes e outros com a finalidade primária de preservá-los contra danos causados por microrganismos, durante sua estocagem, bem como proteger o consumidor da contaminação inadvertida durante o uso do produto.

A preocupação com a presença de microrganismos em produtos é muito antiga. No passado, utilizava-se sal, açúcar, temperos ou substâncias aromáticas em produtos alimentícios em geral ⁸⁹, e também aplicavam-se processos simples que destruíam os microrganismos, como aquecimento e acidificação. Quando se descobriu que os microrganismos eram os causadores dos processos de degradação dos produtos, começaram os estudos sobre substâncias antimicrobianas para uso como conservantes. Segundo MUSCATIELLO e PENICNACK ⁸⁹, o álcool benzílico foi utilizado como conservante antimicrobiano em 1853, o fenol e cresol foram utilizados a partir de 1890, o benzoato de Sódio em 1875, formaldeído em 1900, clorofórmio e acetona em 1903, álcool fenetílico em 1904, clorocresol em 1908, ésteres do parabeno em 1924, tiomersal, e compostos fenil-mercúricos (iodeto ou cloreto de Mercúrio) em 1928, derivados do amônio quaternário

em 1933, ácido sórbico em 1939, timerfonato de sódio e clorhexidine em 1954. Durante a década de 60, quando se detectava contaminação microbiana de fungos em produtos adicionava-se parabenos, ou quando se detectava mau odor, adicionava-se formol ou compostos mercuriais ¹²⁵. A partir de 1991, foram introduzidos no mercado o isopropil-parabeno, isobutil-parabeno, n-butil-parabeno (Liquapar ® Oil) e 3-iodo-2-propil-butilcarbamato (Glydant ® Plus), e a partir de 1992, hidrometilglicinato de Sódio (Suttocid A), 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano dissolvido em fenoxietanol (Euxyl ® K 400, Merguard ® 1200) ¹²⁵. Atualmente existe uma tendência no sentido de se obter produtos sem conservantes, porém com a desvantagem de encarecer demais o produto final ¹²⁵.

Na literatura foram encontradas várias classificações para os conservantes antimicrobianos ^{34, 113, 114, 139, 140}. A tabela III contém a classificação química e concentrações de uso daqueles citados na literatura.

TABELA III Classificação química e concentrações máximas de uso de alguns conservantes antimicrobianos^{30, 20, 114}

Grupo	Nome Químico	Concentração (% p/v ou v/v)
Ácidos e seus sais	ácido benzóico	0,50
	ácido bórico	3,00
	ácido dehidroacético	0,60
	ácido fórmico	0,50
	ácido propiônico	2,00
	ácido salicílico	0,50
	ácido sórbico	0,60
	ácido undecilênico	0,20
	ácido úrsico	0,20
	bissulfito de sódio	0,20
Alcoois	2,4-m-dioxane (Dimetoxane)	0,20
	2-Bromo-nitropropano-1,3-diol	0,10
	álcool benzílico	1,00
	álcool dicloro-benzílico	0,15
	álcool fenílico	1,00
	clorobutanol	0,50
	etanol	maior que 20,0
	fenoxietanol	1,00
Biguanidas	dodecil guanidina	0,10
	hexametil guanida	0,30
Bis-fenóis halogenados	diclorofeno	0,20
	hexaclorofeno	0,10
Carbanilidas	triclorcarbanilida (triclosan)	0,20
Compostos iodóforos	iodeto de Sódio	0,50
Compostos mercuriais	acetato de fenil mercúrio	0,005
Compostos orgânicos	2-metil-4-isotiazolin-3-ona	0,005
	5-Cl-2-metil-4-isotiazolin-3-ona	0,005
Compostos piridínicos	piritionato de Sódio	0,50
	piritionato de Zinco	0,50
Compostos inorgânicos	sulfito	0,20
	bissulfito	0,20
Compostos quinolínicos	sulfato de 8-hidroxi quinolina	0,30

Continuação

TABELA III Classificação química e concentrações máximas de uso de alguns conservantes antimicrobianos^{30, 20, 114}

Grupo	Nome Químico	Concentração (% p/v ou v/v)
Compostos aldeídicos	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano	0,10
	diazolidinil uréia	0,50
	dicloro dimetil hidantoína	0,60
	fomaldeído	0,20
	glutaraldeído	0,20
	imidazolidinil uréia	0,60
	paraformaldeído	0,20
	quatemium-15	0,30
Derivados do amônio quaternário	brometo cetil trimetil amônio	0,10
	cloreto de benzetônio	0,10
	brometo de benzalcônio	0,50
	coreto de dimetil alquil amônio	0,10
Derivados fenólicos	2,4-dicloro-m-xilenol (DCMX)	0,20
	bromoclorofeno	0,20
	carvacol	0,10
	clorofeno	0,20
	fenol	0,20
	metil-isopropil-fenol	0,10
	o-cloro-m-xilenol (PCMC)	0,20
	o-fenil-fenol	0,20
	p-cloro-m-cresol	0,20
	p-cloro-m-xilenol (PCMX)	0,50
tetra-bromo-o-cresol	0,30	
Ésteres do ácido p-hidróxi benzóico	benzilparabeno	0,40
	butilparabeno	0,40
	etilparabeno	0,40
	isobutil-parabeno	0,40
	isopropil-parabeno	0,40
	metilparabeno	0,40
propilparabeno	0,40	
Não classificados	digluconato de clorhexidine	0,10
	dihidrocloreto de clorhexidine	0,10
	fenoxietanol+1,2-dibromo-2,4-diciano-butano	0,10
	hidroximetilglicinato de Sódio	0,50

A associação de conservantes pode diminuir a concentração necessária e aumentar a eficácia antimicrobiana ⁶². É utilizada associação de 2 ou mais conservantes, sendo que um deles fica no estado lábil, como reserva, e o outro no estado estável, exercendo sua ação letal sobre microrganismos ³¹. Contudo, essa associação deve ser baseada em estudos de eficácia, pois dependendo das substâncias associadas, pode não ocorrer sinergismo. McCARTHY, MYBURG e BUTLER ⁸⁶, após análise de 9 tipos de conservantes em 16 associações diferentes, observaram efeitos de aumento na eficácia em apenas 35% dos casos. Órgãos oficiais recomendam que a associação de conservantes deve obedecer os limites de concentração estipulados para cada conservante isoladamente ²⁰; no caso de parabenos, o limite máximo é de 0,8% na somatória das concentrações.

O FDA ^{34, 115, 125}, publica listas contendo os conservantes antimicrobianos, antioxidantes e absorvedores de irradiação luminosa, com a frequência de uso nas formulações cosméticas registradas, anualmente, desde 1977. Contudo, não considera as associações sinérgicas. Os grupos de conservantes antimicrobianos listados pelo FDA em 1977, 1980, 1984 e 1987 estão compilados na tabela IV.

Também, segundo o FDA, os conservantes antimicrobianos mais utilizados desde 1977 até 1985 foram: metilparabeno, propilparabeno, imidazolidinil uréia, formaldeído, quaternium-15, butilparabeno, ácido sórbico, 2-Bromo-nitropropano-1,3-diol, fenoxietanol, diazolidinil uréia. A partir de 1990, utilizou-se o 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano, etilparabeno, metil-cloro-iso-tiazolinona, MMDM hidantoína, fenoxietanol, dihidroacetado de sódio, ácido sórbico e ácido benzóico.

TABELA IV Freqüência de uso de conservantes antimicrobianos nos produtos cosméticos registrados no FDA ³³

Conservantes antimicrobianos	Freqüência de uso (%)			
	1977	1980	1984	1987
álcoois	0,31	0,46	0,51	1,07
amidas e aminas	0,72	1,13	1,13	1,26
carbanilidas	0,32	0,43	0,44	0,61
derivados formaldeídicos	19,46	21,18	21,19	20,20
ácidos e seus sais	0,18	0,24	0,27	0,29
metais	0,40	0,83	0,74	0,25
compostos orgânicos	5,67	5,22	6,78	8,68
ésteres do ácido p-hidróxi benzóico	71,54	69,06	67,79	66,74
derivados fenólicos	0,48	0,61	0,49	0,38
piridínicos	0,29	0,18	0,16	0,14
derivados do amônio quaternário	0,44	0,45	0,46	0,40
outros	0,17	0,19	0,05	0,08

O mecanismo de ação antimicrobiana de conservantes consiste na desestabilização da parede ou da membrana celular, na superfície celular, ou em alterações de processos bioquímicos fundamentais à sobrevivência no citoplasma celular, como desnaturação de proteínas ou enzimas, diminuição da disponibilidade de nutrientes e energia como a glicose ou ATP, e também pela liberação de substâncias tóxicas, como metabólitos ¹⁰³.

A parede celular está presente apenas em algumas espécies de microrganismos, é composta basicamente de 90% de peptidoglicano, mas varia de espécie para espécie. Os conservantes atuam sobre a parede tomando-a instável. É o mecanismo pelo qual atuam os fenóis, álcoois e liberadores de formaldeído (DMDM hidantoína, imidazolidinil uréia, diazolidinil uréia, hexametileno tetramina).

A membrana celular é composta de uma camada bi-lipídica, com proteínas hidrofóbicas aprisionadas no interior, e estabilizada por ligações

hidrofóbicas e pontes de Hidrogênio, contendo Ca^{++} e Mg^{++} ⁷⁰. Possui a função de regular a trocas de produtos e metabólitos da célula com o meio ambiente, garantindo o crescimento e a sobrevivência. Algumas substâncias conservantes promovem a quelação de metais, desestabilizando a membrana celular ¹⁰³, como é o caso do EDTA. Outras, atuam sobre enzimas, como as permeases dos canais das membranas, alterando a eficácia das trocas metabólicas da célula, como por exemplo os parabenos e os ácido orgânicos ¹⁹.

As enzimas mais comumente desnaturadas pelos conservantes são aquelas responsáveis pela produção de ácidos nucléicos, produção de energia a partir da glicose, da respiração celular ou de funções diversas. Como exemplo de conservantes que interferem na produção de ácidos nucléicos têm-se o formaldeído, que provoca reações de alquilação das N-purinas, e a mercaptoetilamina que tautomeriza-se a cloreto de tiouracil e desnatura os ácidos nucléicos. Alguns conservantes atuam sobre enzimas e proteínas, indiscriminadamente, nas ligações dissulfeto. É o caso do 2-Bromo-nitropropano-1,3-diol e 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano ¹⁹.

As enzimas responsáveis pela produção de energia a partir da glicose, como a diglicerídeo 3-fosfato-desidrogenase e a asparaginase, sofrem inativação através de interações no grupamento tiol pelos conservantes do grupo das isotiazolinonas ¹⁹.

Alguns conservantes interferem nas enzimas responsáveis pela produção, transporte e utilização do ATP, durante o processo de respiração celular. É o mecanismo de ação dos compostos mercuriais e dos fenóis, que formam complexos sulfidríla com metabólitos essenciais a formação das enzimas ou quelam os complexos formadores de enzimas, respectivamente ¹³⁹.

Pelo mecanismo da produção de substâncias tóxicas tem-se o 2-Bromo-nitropropano-1,3-diol ¹⁷.

Os conservantes antimicrobianos devem penetrar nas células dos microrganismos e impedir os processos bioquímicos, sem contudo afetar as células do organismo humano, característica denominada toxicidade seletiva.

Contudo, estas substâncias são tóxicas também para as células humanas, que por sua vez promovem reações de defesa, surgindo os sintomas que caracterizam as reações alérgicas. Além disso, podem alterar e destruir a flora microbiana saprófita residente, no local onde são aplicados, exacerbando o desenvolvimento de microrganismos oportunistas, e desencadeando processos infecciosos ¹¹³. Quanto maior a toxicidade seletiva, melhor é a segurança de uso do conservante.

Os conservantes, juntamente com as fragrâncias, embora representem as matérias-primas em menores quantidades numa formulação, são os principais componentes responsáveis pelo desenvolvimento de processos alérgicos e reações de sensibilização nos usuários ¹²³. Uma avaliação de 22 pacientes que consultaram um dermatologista por apresentarem problemas na pele, 12 deles apresentavam reações alérgicas, sendo 8 devido a fragrância e 4 aos conservantes ¹²³.

As reações alérgicas provocadas são de sensibilização ou irritação no local de aplicação ^{76, 139}. O grau, intensidade e frequência dessas reações dependem da concentração das substâncias no produto, do local do corpo onde este foi aplicado e da sensibilidade do usuário. De modo geral, estas reações não são normalmente identificadas pelo consumidores como reações ao produto, e sim como insatisfação em relação aos resultados esperados ⁹³. São relatados casos de uma irritação primária, caracterizada por sensações de coceira, prurido, queimação, rubor, manchas e dor local ¹²³. Contudo, podem se intensificar, promovendo reações mais graves, como dermatite de contato ou dermatite atópica ¹²³. Os conservantes podem ainda ser absorvidos pelos folículos pilosos da pele, promovendo uma ação tóxica sistêmica ¹⁷. Um estudo efetuado sobre o 2-Bromo-nitropropano-1,3-diol a 0,10%, em um protetor solar, detectou a excreção de 5% deste na urina, sob a forma de 2-nitropropano-1,3-diol, e 8 horas após lavagem da pele onde se aplicou o produto detectou-se ainda 72% do mesmo.

O FDA classificou os cosméticos quanto às reações adversas que podem desenvolverem em: tipo I – aqueles que causam reações adversas;

tipo II - podem eventualmente causar reações adversas e tipo III – que seguramente não causam reações adversas ⁷⁶.

No Brasil, a portaria 108 ²⁰ determinou os conservantes e as concentrações máximas permitidas para uso em cosméticos. Para isso, os conservantes foram agrupados em 5 categorias de acordo com o uso e área de aplicação na pele: I - produtos de uso infantil; II - contato com mucosas; III - aplicados sobre a pele durante longo tempo; IV - aplicados sobre a pele durante breve tempo e produtos para cabelo e unhas; V - não aplicado diretamente sobre a pele. Os xampus pertencem a categoria IV.

Alguns fatores próprios da preparação, do modo ou local de aplicação do produto ou da saúde do usuário podem intensificar e agravar as reações alérgicas aos conservantes.

Em relação a preparação, eventuais problemas como a cristalização, aumento da taxa de liberação da parte ativa, ou interação dos conservantes com as matérias-primas ⁷⁶ aumentam ainda mais o potencial alergênico do produto. O aumento da taxa de liberação de formaldeído pelos conservantes que atuam por esse mecanismo, como imidazolidinil uréia, diazolidinil uréia e 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano, ocasiona aumento na concentração de agente sensibilizante.

Os produtos contendo conservantes apresentam capacidades alérgicas diferentes, dependendo do modo de uso e o local de aplicação. A região da área dos olhos e mucosas são especialmente sensíveis aos conservantes, como formaldeído e os liberadores de formaldeído, os quais não devem ser incluídos nos produtos aplicados no rosto, mesmo em doses baixas ¹²³. Contudo, os produtos que são utilizados seguidos de lavagem do local onde são aplicados, como xampus, cremes rinse e máscaras faciais apresentam menor propensão em causar reações alérgicas, podendo além disso, conter concentração de conservantes maior que a de produtos onde a lavagem do local não ocorre ⁵³.

Em relação aos usuários, aqueles com a pele não íntegra, isto é, pele cortada, raspada (caso dos barbeadores e depiladores), queimada, inflamada ou irritada, e aqueles previamente sensibilizados, portadores de moléstias

como diabetes ou imunodeprimidos apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de reações alérgicas ⁷⁸. Além disso, cada população apresenta uma sensibilidade característica aos conservantes. GROOT e BOS ⁵³ citaram casos de alergia aos parabenos em produtos de uso tópico em diversas cidades européias, com diferentes proporções de incidência na população, variando desde 0,3 até 0,7%. Um estudo realizado na Alemanha, que utilizou 2623 pacientes, através da aplicação de 2-Bromo-nitropropano-1,3-diol e parabenos, separadamente, detectou 6 e 14 pacientes com reações adversas, respectivamente, dando um índice de 0,23% e 0,53% ¹⁷.

O desenvolvimento de alergia ou sensibilidade a um tipo de conservante antimicrobiano pode predispor o paciente a desenvolver as mesmas reações a outros conservantes antimicrobianos, isto é, desenvolver reações cruzadas ^{53, 123}. Os pacientes sensíveis ao formaldeído são também sensíveis aos conservantes que atuam pela liberação de formaldeído. Desse modo, tendo-se em vista que muitos conservantes são utilizados em produtos de uso externo e interno, além de alimentos ¹³⁶, se faz necessário uma diminuição das concentrações dessas substâncias em tais produtos.

As propriedades alergênicas dos conservantes são avaliadas através de testes de irritação (primária e secundária), sensibilização localizada (pele, mucosas, olhos), teste de uso, toxicidade (aguda - DL₅₀, subaguda - 28 e 90 dias, crônica 6 - 24 meses, fototoxicidade), toxicocinética (absorção, distribuição, metabolização e excreção), reprodução (fertilidade, teratogenicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade).

Vários foram os autores que estudaram processos alérgicos provenientes da aplicação de produtos de uso tópico ^{31, 53, 84, 123}. SMITH ¹²³, em 1993, citou um teste que foi realizado em 50 pacientes, através da aplicação de soluções hidro-alcoólicas contendo várias concentrações de conservantes, no rosto, durante 30 minutos e observando-se o desenvolvimento de prurido e rubor. O autor concluiu que o aumento de concentração da substância provoca aumento da freqüência de reações, e que dentre as substâncias testadas, o metilparabeno é mais irritante que a imidazolidinil uréia e esta mais irritante que a isotiazolinona.

Um teste efetuado com 1128 pacientes utilizando produtos contendo diversos conservantes antimicrobianos mostrou índices de reações adversas de 0,30% aos parabenos e 2,70% ao formaldeído ⁵³. CROSHAW ³¹ citou a porcentagem 0,80% aos parabenos e 0,50 até 0,80% ao formaldeído.

MARZULLI e MAIBACH ⁸⁴, em 1973, testaram 20 conservantes em concentrações mais elevadas que as usuais, em relação à sensibilização da pele com aplicação de 0,5 g do produto. Obtiveram resultados negativos para os parabenos e propilenoglicol, e positivos para 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol, formol, entre outros.

Uma solução adotada atualmente para se diminuir a incidência das reações adversas aos produtos é o conhecimento das interações possíveis das matérias-primas entre si e com os conservantes antimicrobianos e a diminuição da concentração desses nas fórmulas ¹²³.

3.3.2 Características de alguns conservantes antimicrobianos

3.3.2.1 Parabenos

O metilparabeno é um composto éster do parabeno de fórmula $C_8H_8O_2$, PM 152,14, com nome comercial de Nipagin[®]. É um pó cristalino solúvel na água em concentração de 0,25% a 25°C e 0,75% a 50°C ^{82, 158}.

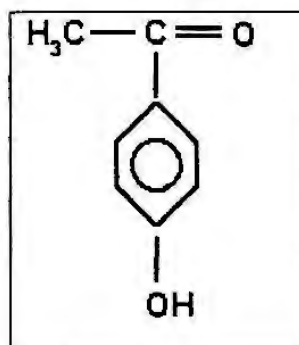


FIGURA 3 Fórmula estrutural do metilparabeno

O propilparabeno é também um éster do parabeno, de PM 180,20, com nome comercial de Nipazol[®]. É um pó cristalino solúvel em 0,04% a 25°C e 0,12% a 50°C em água^{82, 138}.

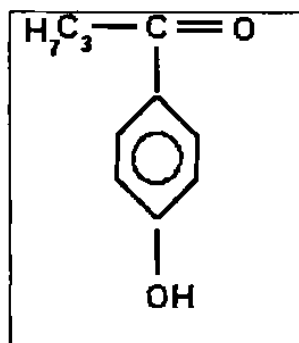


FIGURA 4 Fórmula estrutural do propilparabeno

Ambos conservantes são utilizados como agentes antimicrobianos em cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentos, nas concentrações de 0,25% até 0,40%, isoladamente ou em associação com outros parabenos⁸².

O metilparabeno é ativo em pH de 3,0 até 9,5, sendo incompatível com tensoativos não-iônicos, proteínas e óleos essenciais

Segundo O'NEIL e MEAD⁹¹, a atividade diminui com o aumento da cadeia éster, e assim, o metilparabeno é mais ativo que o etilparabeno, e este mais que o propilparabeno, e sucessivamente o butilparabeno e o benzilparabeno. O metilparabeno apresenta pequena ação sobre bactérias Gram negativas, sendo necessária associação aos outros parabenos de cadeia mais longa, ou com propilenoglicol⁸². Seu mecanismo de ação é a desorganização da parede celular, nas bactérias Gram positivas, e enzimas de transporte da membrana celular⁹¹. Apresenta reações adversas como dermatite, urticária e broncoespasmo⁸².

3.3.2.2 Fenoxietanol

O fenoxietanol é um derivado fenólico, volátil, oleoso, de fórmula $C_8H_{10}O_2$, PM 138,2 solúvel 2,6% em água, PE 244,9 °C, com ampla faixa de

pH para atividade, mas pouco efetivo em pH extremamente baixo. É comercializado com os nomes 2-fenoxietanol, beta fenoxietanol, fenoxietil álcool, etilenoglicol monofenil éter, glicol monofenil éter, Doanol[®] ETH, Fenil[®] Celossolve, Phenoxetol[®], Emerensse[®] Rose Ether 1160, Phenonip[®] e Uniphen[®], sendo nessas últimas duas apresentações associado aos parabenos. Apresenta compatibilidade frente as tensoativos aniônicos, catiônicos, mas é incompatível com os tensoativos não-iônicos e colágeno. O fenoxietanol sofre reações de oxidação liberando formaldeído e ácido carboxílico, reações de condensação formando ésteres, sofre hidrólise ácida, e reações de substituição no anel aromático. Possui uma hidroxila em sua estrutura química, que fornece características de agente emulsificante. Essa característica foi comprovada no estudo de HALL⁵⁵, que detectou aumento na viscosidade de xampu, sabonete líquido e emulsões água em óleo, adicionados desse conservante. Devido a essa característica, pode ser utilizado como espermicida. Foi observado na natureza em campos de cultura de algodão⁵⁵. O fenoxietanol apresenta pequena atividade sobre bactérias Gram positivas, é efetivo contra as bactérias Gram negativas, mas para destruir o *Pseudomonas* se necessitam altas concentrações^{55, 138}, e seu espectro de ação pode ser aumentado através da associação aos parabenos. Seu mecanismo ação é sobre o metabolismo da respiração celular (enzimas malato-desidrogenase), multiplicação celular e membrana celular (ação detergente). É utilizado em concentrações mais elevadas que de outros conservantes, desde 0,5 até 2,0%, para produtos como vacinas (poliomielite, tétano, difteria)⁵⁵, e no passado, foi utilizado como antisséptico de ferimentos por armas de fogo.

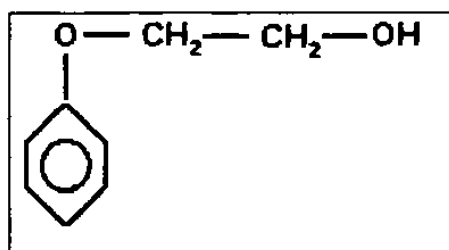


FIGURA 5 Fórmula estrutural do fenoxietanol

3.3.2.3 Imidazolidinil uréia

A imidazolidinil uréia é utilizada como conservante desde 1965 ¹²⁷, sendo comercializada atualmente pelos nomes químicos como imiduréia, e comerciais Germall[®] 115, Biopure[®] 100, Euxyl[®] K 200 ^{126, 127}. É um composto tipo uréia heterocíclica substituída, de fórmula $C_{11}H_{16}N_6O_8$, PM de 388,31, e apresenta-se como pó branco, extremamente higroscópica, solúvel a 50% na água.

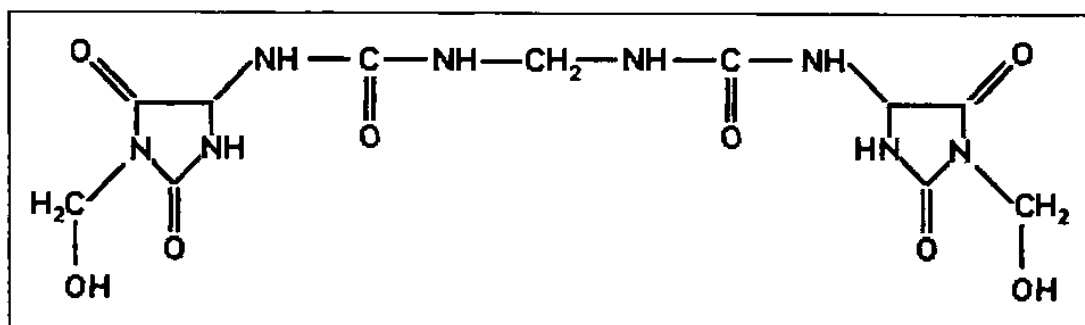


FIGURA 6 Fórmula estrutural da imidazolidinil uréia

A imidazolidinil uréia é utilizada em concentrações de 0,10 a 0,50% para cosméticos como cremes, loções, condicionadores de cabelo, xampus, desodorantes e pós. O pH de ótima atividade é amplo, de 3,0 até 10,0. Compatível com tensoativos aniônicos, catiônicos, não-iônicos, e proteínas. Possui sinergismo de atividade com o metilparabeno, propilparabeno, ácido sórbico, ácido dehidroacético, derivados do amônio quaternário, Irgasan[®] DP 300, EDTA, Phenonip[®] e tensoativos. Possui alto coeficiente de partição ¹¹⁸, não ocorrendo migração de fase. Apresenta atividades bacteriostática e bactericida nas concentrações de 0,20% e 0,50%, respectivamente, e seu mecanismo de ação é a liberação de formaldeído. Não apresenta atividade antifúngica nem sobre leveduras, sendo necessário sinergismo de ação com outros conservantes ¹¹⁸, como metilparabeno e propilparabeno.

3.3.2.4 Diazolidinil uréia

A diazolidinil uréia, com o nome químico N-hidrometil-N-1,3-diidroximetil-2,5-dioxo-4-imidazolidinil-N'-hidroximetil uréia, e os nomes comerciais Germall[®] II e Germaben[®] II, sendo este último está associado ao metilparabeno, propilparabeno e propilenoglicol. É um composto tipo uréia heterocíclica substituída. Possui a fórmula química $C_8H_{14}N_4O_7$ de PM 278,23, e apresenta-se sob a forma de pó branco, muito solúvel em água e extremamente higroscópico^{12,13}.

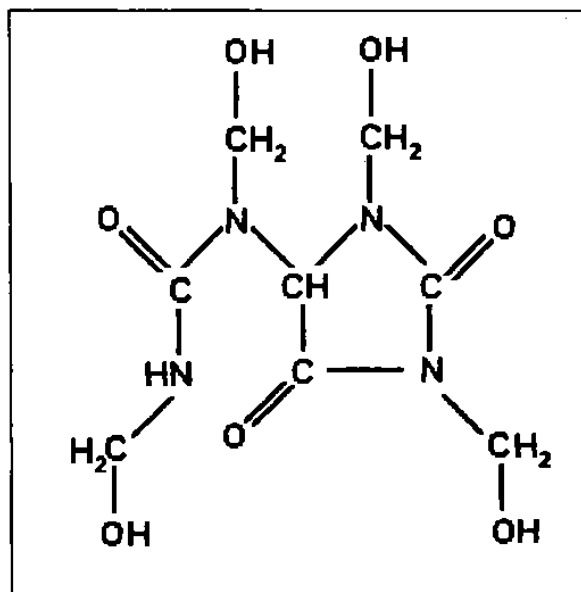


FIGURA 7 Fórmula estrutural da diazolidinil uréia

A diazolidinil uréia é utilizada nas concentrações 0,10 a 0,50% como conservante antimicrobiano de xampus, cremes e loções. A faixa de pH na que apresenta ótima atividade, é aquela de 3,0 a 10,0. É compatível com os tensoativos aniônicos, catiônicos, não-iônicos e proteínas, e os inativantes conhecidos não atuam sobre este conservante. Suporta temperaturas de até 60 °C. Apresenta sinergismo de atividade com os parabenos. É menos ativo que o imidazolidinil uréia sobre os fungos.

BERKE, ROSEN e STEINBERG^{13, 127} realizaram um experimento desafiando diversos tipos de xampu com imidazolidinil uréia a 0,10%, a 0,20%

e a 0,25% da associação de 30,0% de diazolidinil uréia a 11,0% metilparabeno, 3,0% de propilparabeno e 56,0% de propilenoglicol utilizando *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Segundo os autores, os 3 microrganismos testados foram inviabilizados em 72 h, em produtos com o conservante em concentração de 0,10% e 0,20%.

CAGLIANI ²⁴ desafiou xampus conservados com diazolidinil uréia a 0,3%, e observou destruição dos inóculos de bactérias Gram positivas e negativas, leveduras e fungos filamentosos em até 24 horas.

3.3.2.5 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol

O 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol é comercializado pelos nomes de BNPD [®], Myacid [®] BT, Myacid [®] AS, Bronopol [®]. Foi sintetizado quimicamente em 1897, mas foi utilizado como agente antimicrobiano a partir de 1960 ¹⁷.

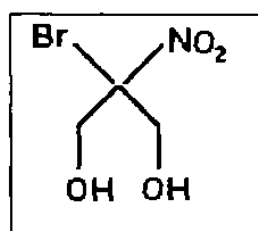


FIGURA 8 Fórmula estrutural do 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol

O 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol é um composto de fórmula $C_3H_6BrNO_4$, PM 169,97, sob a forma de pó cristalino branco, solúvel a 45% em água. Seu ponto de fusão é ao redor de 130 °C ¹⁷ e em preparações, pode ser aquecido até no máximo 40°C ^{85, 17}. É estável em pH ácido, com pH ótimo de atividade antimicrobiana entre 5,00 a 7,00, sofrendo inativação em soluções alcalinas maiores que 8,0 ^{17, 22, 82, 85, 111}.

Apresenta pequena estabilidade frente às radiações ultravioleta ¹⁷.

É utilizado em matérias-primas (detergentes, produtos herbais e proteínas), produtos farmacêuticos, produtos domi-sanitários e cosméticos, em concentrações de 0,01% a 0,10% ^{17, 82, 111}. Nos produtos que são retirados

logo após o uso, como os xampus e cremes de limpeza facial, pode-se utilizar concentrações acima de 0,10% até o limite máximo de 0,25%.

O 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol é compatível com os tensoativos aniônicos, catiônicos, não-iônicos e proteínas ^{17, 136}. Apresenta fraca interação com lauril sulfato de trietanolamina ¹⁷. Entretanto, pode ser inativado por compostos sulfidríla como cisteína e hidrocloreto de cistina (inativante na dose de 0,10 % em testes microbiológicos), e substâncias redutoras como tiosulfato de sódio, tioglicolato de sódio, metabissulfito de sódio e sulfidrato, sendo que sua atividade antimicrobiana diminui de 8 até 64 vezes. A decomposição do 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol libera nitrito, íon Bromo, bromonitroetanol, e 1-hidroximetil-2-nitropropano-1,3-diol ¹⁷.

Quanto ao espectro de ação, apresenta maior ação sobre bactérias Gram negativas, bolores e leveduras; é pouco ativo sobre esporos e inativo contra bactérias resistentes ^{17, 22, 82, 111}. A ação do 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol é mais bacteriostática, e a relação de concentração para se obter ação bactericida é de 2 a 4 vezes. Obtém-se sinergismo de ação com os parabenos e os tensoativos não-iônicos ¹¹¹.

O mecanismo de ação do 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol ainda não está bem esclarecido. Segundo o fabricante, atua pela formação de ligações dissulfeto com grupos tiol de enzimas, principalmente desidrogenases, pepsidases, catalases, responsáveis pelas ligações nas membranas celulares. Segundo alguns autores, como MARZULLI e MAIBACH ⁸⁴, este conservante libera formaldeído em pH baixo. Segundo outros autores, induz ao acúmulo de substâncias tóxicas nas células, como os radicais livres ¹⁷.

O 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol é pouco tóxico, a sua absorção percutânea é limitada, além de ser rapidamente metabolizado nas células ^{17, 22}. Segundo MARZULLI e MAIBACH ⁸⁴, este conservante é o de escolha para produtos que permanecem longo tempo em contato com a pele. É considerado levemente irritante em solução a 1,00% em vaselina líquida e irritante a 5,00% em solução aquosa pH 5,5. Num estudo entre 127 pacientes efetuado em 1983, verificou-se alergia em 6 pacientes e irritação em 8 ⁸². Produtos com esse conservante não é proibitivo mesmo para gestantes ²².

3.3.2.6 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano

O 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano é comercializado em associação com 1,2-propilenoglicol pelo nome de Bronidox[®] L. É um composto o-acetal o-formal, solúvel a 0,46% em água a temperatura de 20°C. Possui PM 212, PF 60°C, PE 113-116°C⁷⁷. É utilizado em concentrações de 0,10% para produtos cosméticos que são retirados por lavagem¹³⁸. Em produtos que não são lavados após uso, pode ser utilizado nas concentrações de 0,05 até 0,05%⁷⁷. A faixa de pH na qual apresenta maior atividade é de 5,00 a 9,00^{77, 101}, sendo instável em valores menores que 5,00. Pode ser aquecido até temperatura máxima de 50°C¹⁰¹. É incompatível com proteínas, e cisteína, não apresenta incompatibilidade com os tensoativos não-iônicos. Provoca corrosão a recipientes de metal.

O 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano apresenta amplo espectro de ação^{77, 138} e seu mecanismo é a oxidação do grupamentos tiol de enzimas e de mercapto-aminoácidos⁷⁷, sendo caracterizado erroneamente como liberador de formaldeído por alguns autores.

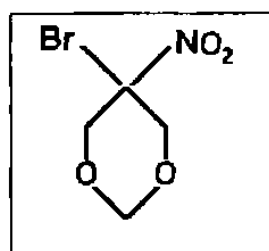


FIGURA 9 Fórmula estrutural do 5-Bromo-nitro-1,3-dioxano

3.3.2.7 Formaldeído

O formaldeído é um líquido incolor de odor característico, solúvel na água, de fórmula CH_2O , PM 30,03, com os nomes comerciais formalina e formol. É comercializado em soluções a 40% e é utilizado para conservação de cosméticos, xampus e matérias-primas, como detergentes, emulsões, borrachas, em concentrações que variam de 0,05% a 0,20%¹¹⁷. É utilizado

também em hospitais como desinfetante e antisséptico. Seu uso foi abolido no Japão ¹²⁵, mas continua sendo utilizado em outros países, inclusive no Brasil. Sofre evaporação quando aquecido ⁸⁵. É incompatível com o amônio, álcalis, água oxigenada, iodetos, permanganato de Potássio, sais pesados, taninos, ferro e metais, gelatina, se oxida lentamente em presença de oxigênio do ar formando ácido fórmico e sofre inativação por proteínas. É compatível com os tensoativos aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Vapores deste conservante causa irritação a mucosas dos olhos, nariz e garganta. A concentração máxima na qual a pessoa pode ser exposta é de 3 ppm. Quando concentrações de 1,00% a 2,00% entram em contato com a pele ocorre dermatite, alergia de contato e urticária, em 1 a 4% da população ¹³⁸.

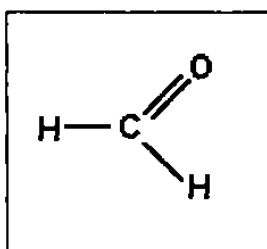


FIGURA 10 Fórmula estrutural do formaldeído

3.3.2.8 Hidroximetilglicinato de Sódio

O hidroximetilglicinato de Sódio é comercializado em solução aquosa a 50%, em pH 10 a 12, com o nome de Suttocid[®] A. É um derivado da glicina. Possui fórmula molecular $C_3H_6NO_3Na$ e é solúvel 100% em água. Para cosméticos, utiliza-se a solução aquosa, em concentrações de 0,10 até 1,0%, e no caso de xampus, de 0,10 a 0,30%. O pH na qual apresenta máxima atividade é ao redor de 6,0 ¹²⁷. Possui a característica de quelar íons de Cobre ¹²⁷ e de neutralizar compostos ácido de formulações. Reage com fragrâncias cítricas produzindo alteração na cor do produto final. Suporta aquecimento de até 60 °C. Quando testado toxicologicamente em concentração de 0,50% em 102 pacientes, com aplicação repetida, durante 24 h, com oclusão, não causou irritação nem dermatite de contato ¹²⁷.

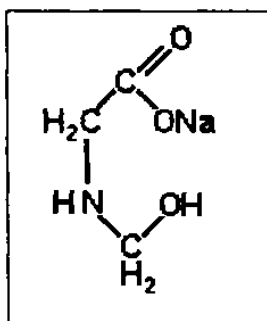


FIGURA 11 Fórmula estrutural do hidroximetilglicinato de Sódio

Efetuiu-se um estudo desafio de produtos, como xampus, creme facial, gel para cabelo, gel de aloe vera, conservados com hidroximetilglicinato de Sódio, utilizando-se os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, inoculados no início e após 21 dias. A quantificação das cargas microbianas nos tempos 0, 2, 7 e 28 dias mostrou contagens de 10 UFC após o tempo 2 dias ¹²⁷.

3.3.2.9 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano

O 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano é comercializado com os nomes 2-Bromo-2-bromoetil-pentanedinitrila, Tetkamer 38 e Merguard[®] 1200, quando associada a 20% de fenoxietanol ¹²⁵. É utilizado como conservante de adesivos, tintas látex, emulsões de látex, pigmentos dispersos, cimentos. Foi introduzida na Alemanha para substituir as isotiazolinonas, e está sendo amplamente utilizada atualmente na Europa em cosméticos ¹²⁵. Não deve ser aquecido a temperaturas maiores que 40 °C.

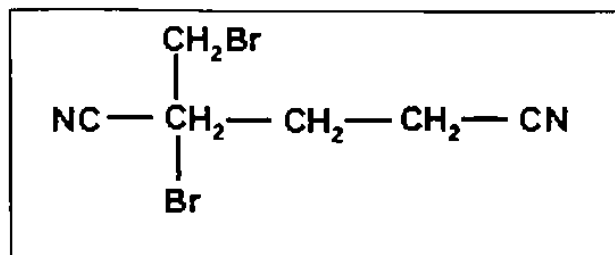


FIGURA 12 Fórmula estrutural do 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano

3.3.2.10 Ácido salicílico

Pertence ao grupo dos conservantes orgânicos, de fórmula $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$, de PM 138,12, com os nomes químicos de ácido orto-hidroxi-benzóico, ácido 2-hidroxibenzóico, utilizado desde 1874. Apresenta-se sob a forma de cristais brancos, solúvel a 0,20% na água ou a 37,0% em álcool. Apresenta propriedades antimicrobianas quando na forma não dissociada, em pH ácido. É Incompatível com sais de ferro, sais nitrosos, acetato, iodeto e radiação de luz. Seu mecanismo de ação é a destruição da membrana plasmática e inibição de processos enzimáticos. É utilizado nas concentrações de 0,025, 0,200 até 0,50%. O ácido salicílico constou em 0,02% das fórmulas registradas no FDA, em 1977 ¹¹⁵.

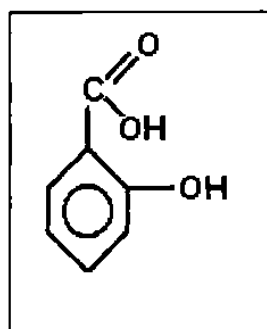


FIGURA 13 Fórmula estrutural do ácido salicílico

3.3.3 Fatores que influem na eficácia antimicrobiana

A eficiência dos sistemas conservantes nas preparações depende da capacidade antimicrobiana intrínseca própria da substância isoladamente e das características da preparação em que está veiculado.

Entre os fatores que definem a atividade antimicrobiana intrínseca de substâncias tem-se o tamanho da molécula, a presença de cargas elétricas e a característica de lipofilicidade, que limitam a capacidade da molécula de entrar em contato com a parede ou membrana celular, ou de penetrar no interior da célula. De modo geral, os conservantes lipofílicos e não-polares passam facilmente através da parede celular e membrana plasmática e atingem o citoplasma, mas os conservantes ionizados ou formados por grandes moléculas não passam ⁷⁰.

Em relação à preparação, a eficácia dos conservantes depende das concentrações em que são utilizados, das matérias-primas constituintes, das características físico-químicas como coeficiente de partição, viscosidade e pH, da técnica de preparação, do material de acondicionamento, além do modo de utilização e do local de aplicação do produto ^{19, 27, 41, 58, 69, 77, 83, 85, 86, 89, 101, 103, 139}.

As matérias-primas podem interagir com os conservantes, promovendo solubilização, complexação, precipitação ou adsorção, e desse modo alterar a atividade antimicrobiana, ^{19, 27, 85, 135}.

Os tensoativos representam matérias-primas essenciais para a formulação de cremes e xampus, sendo classificados em aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros (com características aniônicas em pH básico e catiônicas em pH ácido) ^{27, 29, 112}. Possuem a característica indesejável de interferir na eficácia dos conservantes, alterando a tensão superficial, solubilizando e aprisionando as substâncias em micelas, e conseqüentemente diminuindo a concentração de conservantes livre que exerce atividade antimicrobiana ^{27, 68, 69, 77}. Por outro lado, estes compostos podem potencializar a ação pela diminuição da tensão superficial da

membrana celular dos microrganismos, facilitando assim a sua penetração na célula.

Na literatura foram citados vários casos de interação entre conservantes e tensoativos catiônicos, não-iônicos e aniônicos. Os tensoativos catiônicos reduzem a atividade antimicrobiana de ésteres do parabeno e fenólicos ⁷⁷. Os não iônicos interagem com a maioria dos conservantes antimicrobianos, como formaldeído, parabenos, fenóis, através de reações de complexação, decorrente do grande volume de suas moléculas, e também pelas ligações com os hidrogênios ácidos e oxigênios étereos ^{27, 85}. Estes tensoativos não interagem com imidazolidinil uréia e 2-Bromo-nitropropano-1,3-diol ^{31, 77}.

Os agentes seqüestrantes, como o EDTA, também reduzem a atividade dos sistemas conservantes por formação de complexos ¹⁰³. Para se impedir essas reações deve-se deslocar o conservante do sítio de ligação do agente inativante, com a associação de dois ou mais conservantes

As matérias-primas sólidas em pó, as macromoléculas e géis adsorvem os conservantes da formulação em sua superfície, diminuindo a disponibilidade deste para atuar sobre os microrganismos. Esses fenômenos dependem de fatores como pH, área de superfície e tamanho da cadeia da molécula, cargas elétricas e polaridade. Por outro lado, esse tipo de reação pode ocorrer também com os microrganismos, que são adsorvidos nas matérias-primas, facilitando desse modo o contato e a ação do agente antimicrobiano ⁸⁵. A adsorção de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, adsorvidos em talco, caulinite e trissilicato de magnésio, respectivamente, foi relatada ⁸⁶.

Vários autores analisaram a adsorção de conservantes em preparações, e de modo geral, verificaram que os parabenos e o formaldeído são os mais susceptíveis, enquanto o fenoxietanol sofre pequena adsorção ⁸⁵. As matérias-primas com capacidade de adsorção analisadas foram: amilose, amido, proteínas, goma Veegum [®], metilcelulose, carboximetil celulose sódica, alginatos aniônicos, sílica coloidal, aerosil, trissilicato de Magnésio, carbonato de Bismuto, carbonato de Magnésio, carbonato de Cálcio,

calamina, óxido de Magnésio, óxido de Zinco, dióxido de Titânio, talco, caulim e carvão.

Algumas matérias-primas são comercializadas previamente adicionadas de conservantes, os quais muitas vezes não são sequer citados nas especificações, como é o caso de formol em tensoativos para xampus. Esses conservantes, quando somados as conservantes da formulação, podem aumentar a eficácia dos mesmos por sinergismo de ação, mas também pode ocorrer problemas de irritação e sensibilização nos usuários do produto^{68, 69}. ROSEN e McFARLAND¹¹⁸ analisaram xampus conservados por DMDM hidantoína, imidazolidinil uréia, diazolidinil uréia e quaternium-15 e observaram a presença de formaldeído que pode ser originário da hidrólise dos conservantes ou do processo de fabricação da matéria-prima.

Outros componentes do produto possuem propriedades antimicrobianas intrínsecas, como o propilenoglicol, álcool etílico, álcool isopropílico, 1,3-butilenoglicol, miristato de isopropila, glicerina, sorbitol, óleos essenciais^{83, 85}. Quando associados aos conservantes, estas substâncias proporcionam sinergismo e aumento do espectro de ação, que possibilita a diminuição das doses individuais, e conseqüentemente levando a diminuição do desenvolvimento de reações adversas^{31, 141}. Desse modo, se faz necessário a análise da atividade antimicrobiana das matérias-primas que entram na formulação do produto.

O coeficiente de partição óleo/água da fórmula e a viscosidade determinam a presença dos conservantes nas fases aquosa ou oleosa do sistema, e caso alguma fase fique sem o conservante, poderá ocorrer o crescimento microbiano^{76, 86}. Além disso, os microrganismos podem contaminar a interface das fases aquosa e oleosa de emulsões, local onde não há conservantes⁸⁵.

Os valores de pH numa preparação podem limitar o crescimento microbiano e também a eficácia do sistema conservante⁶⁹. De modo geral, as bactérias crescem em meios com pH próximo da neutralidade, e os fungos pH ácido. Os meios com valores de pH abaixo de 3,0 e acima de 10,0 apresentam alta concentração de íons, provocando destruição dos

microrganismos, sendo em muitos casos, desnecessária a adição de conservantes. Além disso, as alterações de pH podem também ocasionar degradação de componentes da preparação, e liberação de substâncias tóxicas, as quais podem apresentar atividade. Esse fenômeno foi observado num experimento com ácido sórbico, em pH 6,0, que sofreu oxidação e liberou substâncias aldeídicas ⁸⁵.

O pH da fórmula pode alterar as cargas elétricas da molécula do conservante, e com isto, provocar repulsão com cargas de igual valor da parede ou membrana celular dos microrganismos, impedindo a aproximação e portanto anulando o efeito antimicrobiano ⁸⁵. Além disso, as partículas carregadas eletricamente são menos solúveis em gorduras e óleos, deixando estas fases desprotegidas. O pH também influi na dissociação de ácidos e bases. A elevação do pH promove aumento da dissociação do conservante ácido e conseqüentemente a diminuição da concentração da substância não-dissociada, que é a forma ativa, reduzindo a atividade antimicrobiana. Desse modo, os conservantes ácidos como o ácido benzóico, ácido salicílico, ácido dehidroacético, ácido sórbico, parabenos e fenóis são mais ativos em pH ácido ^{17, 31}.

Algumas matérias primas podem alterar o pH da formulação, como o trissilicato de Magnésio e goma Veegum [®], que alcalinizam o meio em que estão.

A preparação do produto também influi na atividade antimicrobiana do conservante.

A temperatura utilizada deve ser compatível com a estabilidade do conservante, principalmente quando se utiliza compostos voláteis. A resistência dos conservantes à temperatura varia muito. Por exemplo, a DMDM hidantoína resiste a temperaturas de até 90°C, enquanto que o formaldeído nem pode ser aquecido, pois evapora mesmo a baixas temperaturas. Produtos com conservantes voláteis, preparados sem os devidos cuidados podem resultar em concentrações abaixo da efetiva ^{19, 83}.

A homogeneização de sistemas muito viscosos também é importante, pois se não for adequada, o produto pode apresentar locais com

concentrações baixas de conservantes e aí ocorre o crescimento microbiano^{68, 83}.

O material de acondicionamento é importante para proteger o produto final da contaminação microbiana durante o uso, de agentes físicos como a ação da luz, oxigênio, e também da perda de componentes pela evaporação^{68, 85, 101}. Caso essa proteção não seja adequada, a eficácia do sistema conservante fica comprometida.

Os plásticos polietileno de baixa densidade não fornecem proteção à ação da luz, colocando em risco a estabilidade de conservantes como os parabenos^{68, 85}.

ORTH, BARLOW e GREGORY¹⁰¹ classificaram a qualidade da proteção à contaminação dos produtos proporcionada pelas embalagens em relação à probabilidade de contaminação em: risco baixo, representado por aquelas hermeticamente fechadas; risco moderado, representado por aquelas de uso múltiplo com proteção à entrada de água ou contato dos dedos; risco alto, representado por aquelas de uso múltiplo e sem proteção à entrada de água ou sem proteção ao contato dos dedos.

Os materiais de acondicionamento são geralmente de borracha, vidro (transparente, âmbar), plásticos (PVC, poliestireno e polipropileno), os quais podem adsorver, absorver ou se complexar com determinados conservantes provenientes das preparações^{19, 85, 142}.

McCARTHY⁸⁵ testou o ácido sórbico em solução frente a diferentes materiais de acondicionamento e verificou que em PVC, polietileno, polipropileno e vidro transparente, foram reduzidas as concentrações a 55,4, 98,2, 26,7 e 44,1% da inicial, respectivamente.

Outras incompatibilidades citadas são: o alumínio, que pode inativar o 2-Bromo-nitropropano-1,3-diol e alguns compostos organomercuriais; o nylon, que pode complexar os parabenos e a borracha os compostos organomercuriais e derivados do amônio quaternário⁸⁵.

Conforme o modo de uso, os produtos recebem repetidas cargas microbianas do usuário, o que pode ocasionar a saturação da capacidade do sistema conservante. Além disso, os produtos podem sofrer diluição,

intencional ou acidental, de modo que a concentração do sistema conservante diminui, e o produto fica desprotegido ⁴¹.

Atualmente, os produtos denominados naturais estão sendo apreciados pelos consumidores. Nesses produtos, os conservantes são substituídos por extratos naturais com atividade antimicrobiana, em altas concentrações. Contudo, esses também podem causar reações adversas, e é muito difícil se identificar exatamente qual substância que desencadeou a reação ¹²³.

Evidentemente, os produtos de uso único são os mais seguros quanto ao uso, pois não promovem reação alérgica, uma vez que os conservantes não são adicionados, e seguros também quanto à proteção aos microrganismos contaminantes ⁷⁸.

3.4 ESTUDOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SISTEMAS CONSERVANTES

3.4.1 Características

Os estudos de eficácia de conservantes em preparações são recentes. Até o final da década de 60, não foram encontrados estudos deste tipo na literatura ¹²⁵. De 1970 até 1980, utilizavam-se métodos microbiológicos para conservantes isoladamente, em soluções, como a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), a análise das zonas de inibição, das curvas de morte microbiana, da tubidez e da produção de esporos ^{27, 41}. Esses métodos baseiam-se na determinação das UFC (unidades formadoras de colônias) ²⁸ e produção de massa celular ²⁷. A partir de 1980, os sistemas conservantes passaram ter sua eficácia avaliada através de inoculação artificial de microrganismos patogênicos ou resistentes, em condições artificiais de laboratório, através dos chamados estudos desafio, os quais são mais práticos, reproduzíveis e acessíveis que os anteriormente utilizados ⁴¹. Atualmente, aliado a esses estudos, desenvolveu-se também o método de

análise dos produtos em condições reais, isto é, durante o manuseio do produto pelo consumidor, denominado teste do uso ¹⁰¹.

Os estudos de desafio são realizados aplicando-se métodos convencionais, que estão descritos nos compêndios oficiais ^{21, 32, 134}, ou os não-convencionais, também denominados métodos rápidos ^{96, 97, 98, 99, 100, 101}. Ambos baseiam-se na inoculação proposital de microrganismos e avaliação da morte celular em intervalos de tempo subseqüentes. O que diferencia um de outro é a freqüência da avaliação das cargas microbianas presentes. A duração do teste é de 28 dias para os métodos convencionais e de até 48 horas para os métodos rápidos. Os microrganismos desafiadores, o tamanho dos inóculos, a quantidade e tratamento das amostras, as técnicas de inoculação e as técnicas de quantificação das cargas microbianas são semelhantes para ambos métodos.

Os métodos convencionais estão descritos na farmacopéia Britânica ²¹, farmacopéia Americana XXIII ¹³⁴ e nos manuais do CTFA (Cosmetics, Toiletries and Fragrance Association) ^{32, 88, 102}. Baseiam-se na porcentagem de redução da carga microbiana inoculada, em diferente tempos. A carga microbiana é expressa em logaritmo decimal das UFC, as quais são expressas em intervalos de tempo variáveis, dependendo do método oficial aplicado. A Farmacopéia Britânica ²¹, nas especificações para medicamentos de aplicação tópica, recomenda que a amostra deve ter sua carga microbiana quantificada no momento da inoculação do produto e após 2, 7, 14 e 28 dias. A Farmacopéia Americana ¹³⁴ XXIII recomenda quantificação das cargas microbianas nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. O CTFA ³² recomenda quantificação no momento da inoculação, denominado tempo 0, e nos tempos 1, 2, 3, 7, 14 e 28 dias e indica a possibilidade de se repetir as inoculações nas amostras. Entretanto, segundo WEDDERBURN ¹³⁹, os produtos devem ser analisados pelo menos durante 6 meses, para se obter dados sobre adaptação dos microrganismos ao sistemas conservantes ou os efeitos na estabilidade dos produtos.

As reações que ocorrem durante a morte celular, provocada por agentes químicos ou físicos, são classificadas de diferentes formas na

literatura. Alguns autores, consideram-nas como reações de primeira ordem e desse modo, analisadas graficamente ¹⁰³. Outros autores, porém, consideram-nas de segunda ordem, estequiométricas, cujo fator limitante é a concentração dos agentes antimicrobianos ¹⁹. Para estes, as reações de primeira ordem são somente aquelas obtidas de processos de esterilização por radiação ou calor. Nos métodos rápidos, a morte celular dos microrganismos provocada pelas substâncias antimicrobianas é avaliada graficamente, através do valor de D, e para isso, as reações ocorridas devem ser consideradas de primeira ordem.

O valor de D, ou valor de redução decimal, equivale ao tempo necessário para ocorrer morte microbiana de 1 ciclo logarítmico ou 90%, em unidade de horas. Esse valor é obtido do número de microrganismos sobreviventes detectados e os diferentes intervalos de tempo de análise, de 0 até 48 horas após a inoculação da amostra com o microrganismo, através de recursos matemáticos. O valor de D é calculado em cada amostra desafiada com o microrganismo, e comparado a critérios de aceitação previamente estipulados. Aquelas amostras cujos valores de D obtidos forem iguais ou menores que aqueles dos critérios de aceitação são consideradas adequadamente conservadas, e seus sistemas conservantes então considerados eficazes.

Os recursos matemáticos utilizados no cálculo do valor de D podem ser do tipo paramétrico ou não-paramétrico. Os paramétricos baseiam-se na quantificação da morte microbiana utilizando recursos matemáticos como a regressão linear. Os não-paramétricos não utilizam a quantificação da morte microbiana, e sim a quantificação das amostras que apresentaram ou não alguma contaminação microbiana. Como exemplo deste último, tem-se o método da fração negativa, utilizado para se validar os processos de esterilização ¹⁰⁵

O método rápido da regressão linear baseia-se na quantificação da carga microbiana presente no momento da inoculação e nos tempos 2, 4, 8, 24 e 48 horas, determinando-se a relação gráfica da população microbiana, em valores de logaritmo de base 10, e o tempo de exposição. Com os valores

obtidos, através da regressão linear, determina-se a equação da reta, $Y = -BX + A$, onde Y equivale a população microbiana obtida, A ao logaritmo decimal da população microbiana no tempo zero, B à taxa de inativação ou coeficiente de correlação linear, e X ao tempo de exposição ¹⁰⁵. O Valor de D é calculado pelo negativo do inverso do coeficiente de correlação linear da reta (-1/B). Por exemplo, com um inóculo de 10^6 bactérias cujo critério de aceitação seja valor de D igual a 4 horas, em uma amostra desafiada, deverá apresentar uma carga microbiana de, no máximo, 10^5 UFC em 4 horas. O Valor de D multiplicado pelo logaritmo decimal do inóculo inicial fornece o tempo necessário para se destruir 90% dessa carga microbiana ^{88, 98, 105}. Esse mesmo valor pode ser obtido através da interseção da reta no eixo x.

Os métodos rápidos são quantitativos e fornecem estimativas sobre o comportamento dos microrganismos, frente aos agentes conservantes, pois os valores de D obtidos são específicos para cada microrganismo. Possibilitam a comparação das taxa de inativação de vários microrganismos num mesmo produto ou em produtos diferentes, avaliam os efeitos sinérgicos da associação de conservantes antimicrobianos e as concentrações de maior atividade. Além disso, avaliam o desenvolvimento de esporos ou microrganismos resistentes, os quais são indicados nas curvas de morte microbiana por picos iniciais ou patamares finais respectivamente ^{88, 98, 102, 103, 105}.

Outros métodos rápidos de desafio para análise de sistemas conservantes foram citados na literatura, como o método da curva de morte rápida, do estudo desafio presuntivo, e o de preservação acelerado, onde as cargas microbianas são quantificadas em intervalos de tempo regulares, até 24 horas, e os números de UFC obtidos são comparados a determinados critérios de aceitação. Contudo, segundo alguns autores, esses métodos são variações do método da regressão linear ^{19, 88, 89}.

A eficácia de conservantes pode ser avaliada nos produtos por testes que simulam o uso, em condições experimentais de laboratório, ou por testes de uso, nas condições reais nas quais serão submetidos pelos consumidores.

Entre os testes que simulam o uso, realizados em laboratórios, foram citados: da zona de inibição, da impressão digital, da inoculação na pele e o da luva ¹³⁹.

O teste da zona de inibição mede o efeito germicida, por deposição da solução do conservante em cilindro, sobre a superfície de meio de cultura solidificado, contendo uma carga microbiana quantificada. Após difusão do conservante, avalia-se o tamanho do halo de inibição obtido.

O teste da impressão digital é usado para cremes e xampus; consiste na aplicação do produto contendo o conservante e posterior contato da região que recebeu o produto com a superfície de meio de cultura solidificado, previamente inoculada com uma carga microbiana quantificada, após incubação das placas, analisa-se a inibição ocorrida no população microbiana contida no ágar.

O teste da inoculação na pele é utilizado para cremes, loções e xampus. Uma suspensão de microrganismo não patogênicos é aplicada no antebraço de voluntários, e após secagem ao ar, o produto em teste é aplicado. Raspa-se o local levemente para retirar a amostra, que é inoculada em meios de cultura. Avalia-se o crescimento microbiano obtido.

O teste da luva é efetuado pela aplicação do produto nas mãos e vestindo-se em seguida uma luva estéril. Após 20 minutos, retira-se a luva, onde se aplica um caldo nutriente contendo microrganismos, agita-se, e faz-se a semeadura desse caldo em meio de cultura pela técnica de "pour-plate". Avalia-se o crescimento microbiano obtido.

O teste do uso é realizado após o produto ter passado nos testes de desafio, sendo um modo eficaz de se confirmar os resultados obtidos em laboratório. Neste teste, um lote de produto, em sua formulação final, é usado por um grupo de consumidores e após determinado período de tempo, o produto é submetido a análise da contaminação microbiana. É recomendável que todo produto de nova fórmula seja submetido a este tipo de teste antes de ser comercializado ^{19, 120}. Contudo, é um teste demorado, e que necessita de voluntários que se sujeitem a usar o produto.

3.4.2 Características comuns aos estudos desafio

Os microrganismos utilizados nos testes podem ser patogênicos, de linhagens padronizadas por laboratórios como o ATCC (American Type Culture Collection) ou isolados de produtos contaminados. Compreendem bactérias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus sp*¹⁰³, respectivamente; bactérias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*; leveduras como *Candida albicans*; e bolores como *Aspergillus niger*¹³⁴. Os microrganismos isolados de produtos contaminados são dotados de comportamento diferente dos microrganismos-padrão e apresentam resistência aos sistemas conservantes. Contudo, para qualquer desses, deve-se utilizar culturas recentes e jovens, de mesma linhagem, durante todo o experimento, sob as mesmas condições e temperaturas¹⁰².

Existem divergências entre os autores quanto ao inóculo utilizado para desafiar as amostras. Alguns autores afirmam que devem-se utilizar inóculos mistos, com diversas espécies, com a finalidade de simular o que ocorre normalmente durante o uso-abuso de produtos pelos consumidores^{19, 80}. Afirmam que isso promove um sinergismo positivo durante a multiplicação celular, através de cometabolismo e produção de cofatores. Contudo, ORTH¹⁰², em seu teste utilizando associação de microrganismos, concluiu que este tipo de inóculo não fornece maiores informações, em relação ao sistema conservante, e ao contrário, ocorre concorrência pelos mesmos substratos, além do efeitos letais devido à produção de metabólitos.

ORTH e BRUEGGEN¹⁰² compararam os efeitos da inoculação única e múltipla (em 10 ciclos) de microrganismos, pelo método da regressão linear e com cálculo do valor de D. Preparações de sabonete líquido foram desafiadas, durante 10 dias seguidos, com *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e outras preparações do mesmo sabonete com inoculação única vez, porém com suspensão 10 vezes mais concentrada. Calcularam os valores de D e observaram valores muito próximos, concluindo assim que a reinoculação das amostras é desnecessária, e ao invés de

fornecer maiores informações, pode ocasionar diluição ou saturação da capacidade do sistema conservante.

Os meios de cultura, condições e período de incubação utilizados para a quantificação das cargas microbianas variam de acordo com o microrganismo utilizado. Em geral, utiliza-se ágar caseína-soja e incubação de 24 horas a 30-35°C para bactérias e ágar Sabouraud-dextrose e incubação por 2-4 dias a 20-25 °C para as leveduras e bolores.

A carga microbiana a ser inoculada varia, conforme o método utilizado, mas o volume da suspensão inoculada nunca deve representar mais que 1% do volume do produto em teste ^{19, 21, 41}. Edições mais recentes das farmacopéias Britânica ²¹ e Americana ¹³⁴ recomendam a inoculação de 10^5 a 10^6 células/mL ou g de amostra. Inóculos com carga maiores que 10^6 UFC/mL ou g superam a capacidade do sistema conservador ¹⁰², e os menores de 10^5 UFC/mL ou g resultam em diminuição dos valores do tempo de destruição total ⁹⁸, fornecendo resultados falsos.

AKERS ³ comparou os inóculos recomendados pelas farmacopéias Alemã de 1986, Italiana de 1985, Americana de 1990 e Britânica de 1988, e concluiu que o número de células inoculadas deve estar entre 10^5 e 10^6 UFC/mL ou g de produto. BRANNAN ¹⁹ sugere inóculo de 10^6 UFC/mL ou g para bactérias e de 10^4 UFC/mL ou g para bolores e leveduras. Segundo a FIP ⁴¹, o inóculo deve estar entre 10^3 e 10^5 UFC/mL ou g de amostra. Independentemente do tamanho inóculo utilizado, esse deve ser mantido durante todo o experimento.

As amostras do produto em análise devem estar na embalagem original ^{19, 134}. O volume de amostra é variável, contendo no mínimo 20 g ou mL ^{41, 102, 134}, e segundo alguns autores, 50 g ou mL ⁸⁸. O número de amostras desafiadas por microrganismo, recomendado varia conforme o autor, sendo citado até triplicatas ^{98, 139}. Durante o teste, as amostras e suas diluições devem ser manuseadas da mesma maneira e muito bem homogeneizadas.

As técnicas mais comuns para a quantificação dos microrganismos viáveis, nos diferentes tempos, são a semeadura em profundidade e a filtração da amostra através de membrana e deposição do filtro em superfície

de ágar solidificado, utilizando-se a amostra pura ou suas diluições decimais. Outras técnicas mais rápidas como análise da epifluorescência, da impedância, da bioluminescência, da quantificação em espiral laser estão sendo desenvolvidas ²⁸. As alíquotas retiradas para a quantificação do número de microrganismos devem ser muito bem homogeneizadas com o inóculo, e de maneira igual para todas amostras e todos intervalos de tempo ⁹⁸. Escolhida a melhor técnica, esta deve ser mantida durante todo o experimento ¹⁰².

No momento da quantificação da carga microbiana, os sistemas conservantes presentes devem ser inativados, por diluição decimal em solução (salina ou peptona) ou adição de substâncias inativantes específicas (como a lecitina de soja ou polissorbato 80) ^{21, 41}, ou eliminados das amostras, por filtração em membrana de celulose de 0,45 µm.

Os critérios de aceitação foram definidos como valores máximos de carga microbiana que podem estar presentes na amostra, nos determinados tempos da análise. Esses valores diferem dependendo do método de estudo desafio, e do microrganismo em estudo.

AKERS ³ comparou os critérios dos métodos oficiais especificados nas diferentes Farmacopéias. Segundo o autor, a farmacopéia Alemã de 1986 indica que *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* devem apresentar uma redução de 10^3 UFC em 14 dias e novamente 10^3 em 28 dias e a Farmacopéia Italiana de 1985 afirma que as bactérias não devem proliferar em 2 dias, devem reduzir 10^2 UFC em 7 dias, 10^3 em 14 dias e não aumentar mais até 28 dias. Já a Farmacopéia Britânica de 1993 ²¹ considera que as bactérias devem ser reduzidas de 3 ciclos log ou 99,99% em 2 dias, e apresentar contagem zero a partir do 7º dia até 28º dia. A Farmacopéia Americana de 1995 ¹³⁴ considera satisfatória a redução do inóculo inicial para 0,1% no tempo de 14 dias, equivalente a 99,9% ou 3 ciclos log de redução, cujo número deve se manter ou diminuir. O CTFA ³² e farmacopéia Européia ³⁶ consideram adequada a redução de 2 ciclos log ou 99% em 7 dias.

Em relação às leveduras e bolores, como *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, respectivamente, segundo AKERS ³, a Farmacopéia Alemã

de 1986 indica redução de 10^1 em 14 dias e mais 10^1 em 28 dias. A Farmacopéia Italiana de 1985 indica redução de 10^2 em 7 dias e que não ocorra aumento até 28 dias. Já a farmacopéia Britânica e de 1993 ²¹ considera adequado a redução de 10^2 ou 2 ciclos log em 7 dias e que não ocorra aumento até 28 dias. A farmacopéia Americana de 1995 ¹³⁴ indica não aumento da carga inoculada em até 28 dias como satisfatório. O CTFA ³² e farmacopéia Européia ³⁶ consideram adequada a redução de 1 ciclo log ou 90% em 7 dias.

Os critérios de aceitação para os métodos rápidos, isto é os valores de D, devem ser menores ou iguais a 4 horas para bactérias patogênicas e menores ou iguais a 28 horas para bactérias não patogênicas, bolores e leveduras ^{88, 96, 98, 101}. Além disso, as amostras devem apresentar atividade esporostática ou esporicida. Desse modo, um inóculo de 10^6 UFC/mL de bactérias patogênicas deve ser 90% destruída no tempo de 4 (valor de D) x 6 (log da carga microbiana), isto é, 24 horas, e o mesmo inóculo de bactérias não patogênicas, bolores e leveduras deve ser 90% destruída em 28 x 6, isto é, 168 horas, equivalente a 7 dias.

A confiabilidade dos resultados obtidos pelos dos métodos de análise da eficácia dos sistemas conservantes depende ainda da habilidade do analista, que deve ser muito bem treinado para essa função, no sentido de garantir-se a reprodutibilidade dos experimentos.

3.4.3 Testes desafio e de uso efetuados em produtos de higiene e cosméticos

Vários foram os autores que utilizaram estudos desafio em seus experimentos, para avaliação de eficácia de sistemas conservantes de diversos tipos de produtos, como cremes, loções, xampus e cremes rinse.

HALL ⁵⁵ desafiou amostras de 50 g de xampu, creme rinse, emulsão água/óleo e óleo/água, conservados com associação de metilparabeno 0,20% e propilparabeno 0,10%, e também outras amostras contendo essa associação e mais 70% de fenoxietanol. Realizou quantificação das cargas

microbianas nos tempos 0, 2, 4, 8 e 24 horas e 3, 5, 7 e 14 dias. Nas amostras com a primeira associação de conservante, o inóculo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* foram inviabilizados em 12 minutos, 2 horas, 2 horas e 7 dias, respectivamente.

CAGLIANI ²⁴ desafiou emulsões fluidas e xampus conservados com isotiazolinona, metilparabeno, propilparabeno, diazolidinil uréia e dimetoxazolidina, com quantificação das cargas microbianas nos tempos 0, 2, 7 e 28 dias. Os inóculos foram todos inviabilizados, para os xampus, em até 24 horas

MULBERRY, ENTRUP e AGIN ⁸⁸, testando emulsões contendo 0,060% de metilparabeno e 0,012% de propilparabeno, e obtiveram os seguintes valores de D, expressos em horas: menor que 0,5 para *Staphylococcus aureus*, 27,4 para *Escherichia coli*, 9,5 para *Pseudomonas aeruginosa*, 0,4 para *Bacillus subtilis*, 12,5 para *Candida albicans*, 16,7 para *Penicillium luteum*, 192,0 para *Aspergillus niger*. Para a emulsão contendo 0,010% de metilparabeno e 0,002% de propilparabeno, os valores de D: menor que 0,5 para *Staphylococcus aureus*, 19,8 para *Escherichia coli*, 13,4 para *Pseudomonas aeruginosa*, 9,4 para *Bacillus subtilis*, 6,1 para *Candida albicans*, 56,3 para *Penicillium luteum*, 1110,0 para *Aspergillus niger*.

ORTH ⁹⁶ desafiou uma loção e xampu com proteína, adicionados de diferentes concentrações de metilparabeno, propilparabeno, monolaurato de glicerila e formaldeído, frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Comprovou a redução do valor de D com o aumento das concentrações dos conservantes.

O mesmo autor, em 1979, testou 150 amostras de cremes faciais, loções, xampus e condicionadores, variando os sistemas conservantes, meios de cultura e tamanho do inóculo. As cargas microbianas foram quantificadas nos tempos 0, 2, 4 e 24 horas e 3, 5 e 7 dias para bactérias, e nos tempos 0, 4, 8, 24 horas e 2, 3, 5 e 7 dias para bolores e leveduras, ou até se detectar uma carga menor que 10 UFC/mL. Valores de D menores foram observados para as associações de borato de Sódio, metilparabeno a 0,20% e

propilparabeno a 0,10%, seguido de borato de Sódio, metilparabeno a 0,12% propilparabeno a 0,08%; o valor obtido com borato de Sódio isoladamente foi o menor. O xampu e condicionador com proteínas, conservado com formaldeído, resultou em contagem de viáveis totais menor que 500 UFC/mL, somente após 24 horas, devido a inativação do sistema conservante pela proteína.

O'NEIL e MEAD ⁹¹ desafiaram os seguintes produtos com diferentes conservantes: emulsão de óleo mineral, conservada com 0,4% de metilparabeno isolado, e também com este mesmo conservante associado ao etilparabeno; emulsão de óleo vegetal conservada com 0,8% de propilparabeno isolado e também este associado ao butilparabeno; xampus contendo 0,8% de metilparabeno ou 2,5% de propilparabeno; além dos mesmo produtos sem adição de conservante. As amostras foram preparadas sem cuidados especiais para se evitar contaminação bacteriana, desafiadas com 10^5 UFC/mL de bactérias e 10^3 UFC/mL de fungos, e quantificadas nos tempos 0, 1, 3, 4, 7, 14 e 21 dias. Ao final do teste, todos os xampus mantiveram carga microbiana viável. Na emulsão de óleo vegetal a atividade antimicrobiana foi maior com a adição de metilparabeno isolado, enquanto que para a emulsão com óleo mineral, o resultado foi melhor com o conservante associado.

ORTH, BARLOW e GREGORY ¹⁰¹ estudaram xampus em relação ao efeito protetor dos frascos de acondicionamento, ao modo de aplicação do produto e ao efeito da diluição com água. Amostras de xampu normal e xampu diluído a 50% com água, acondicionadas em frascos com tampas tipo válvula protegida, válvula não protegida, tampa fixa de rosca e tampa removível de rosca, foram expostas durante 2 minutos diários a jato de água, durante uma semana, simulando o uso debaixo de chuveiro, e contagem total de microrganismos viáveis. Mostraram que os frascos com tampa de válvula não protegida e os de rosca removível não protegem adequadamente a preparação, ocorrendo contaminação de $2,1 \times 10^7$ UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa* e $1,2 \times 10^5$ UFC/mL de coliformes, mas somente nos xampus diluídos; nos outros frascos, com outros tipos de tampa, não ocorreu

contaminação em nenhum dos xampus. Amostras idênticas àquelas contaminadas foram submetidas ao teste de desafio com *Escherichia coli*. Os autores, considerando que este microrganismo apresenta baixo risco de contaminação ao usuário, quando presente nos produtos de uso externo, definiram o critério de aceitação como valor de D menor ou igual a 28 horas. O valor de D obtido foi de 1,1 horas para as duas amostras, portanto de acordo com as especificações. Este experimento mostra a necessidade do teste do uso ou uso simulado, pois identificou amostras deficientemente conservadas, que o teste de desafio não conseguiu detectar.

4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O material, objeto deste estudo, foi constituído de 32 preparações de xampus, 6 sem adição de conservantes e 26 com conservantes ou ácido salicílico.

4.1.1 Xampus sem conservantes

4.1.1.1 Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas foram: cetoconazol, ácido cítrico, trietanolamina, lauril éter sulfato de sódio (LESS), lauril sulfato de trietanolamina (LSTEA) e dietanolamida de ácido graxo de côco com 90% de amina livre (DAGC-90), todas de grau farmacêutico. Dos dois primeiros tensoativos foram obtidas amostras de três empresas do mercado e do último apenas de 2 empresas. Os nomes comerciais e as empresas fornecedoras dos tensoativos utilizados estão discriminados abaixo.

TABELA V Identificação dos tensoativos

Matéria-prima	Fabricante		
	Aquatec (A)	Henkel (B)	Hoescht (C)
LESS	Surfax [®] EVE (lote 96/10-57)	Texapon [®] HBN (lote 116856180117)	Genapol [®] L Rob BB (lote 970965000)
LSTEA	Surfax [®] 40 (lote 96/0908)	Texapon [®] TB (lote 016755490017)	
DAGC-90	Synotol [®] CN 90 (lote 96/1618)	Comperlan [®] KD (lote 126864690129)	Fomgramid [®] CI (lote 97083)

LESS = lauril éter sulfato de sódio, LSTEA = lauril sulfato de trietanolamina,
DAGC-90 = dietanolamida de ácido graxo de côco com 90% de amina livre

O cetoconazol (potência de 99,6%), o ácido cítrico e a trietanolamina foram adquiridos de distribuidoras. A água utilizada nas preparações foi a destilada.

4.1.1.2 Preparações

Três xampus foram preparados segundo a mesma fórmula básica, abaixo relacionado, diferindo entre si apenas na procedência de matérias primas. Foram também preparados os xampus com a mesma fórmula, sem a adição do cetoconazol.

Fórmula

Cetoconazol	2g
Lauril éter sulfato de sódio	20mL
Lauril sulfato de trietanolamina	5mL
dietanolamida ácido graxo coco 90%	3mL
Solução de ácido cítrico 10% (p/v)	10mL
Solução de trietanolamina 20% (p/v)	10mL
Água destilada qsp	100mL

Em relação aos xampus com cetoconazol, uma amostra foi preparada com todos os tensoativos provenientes do fornecedor A, outra do B e uma terceira, com tensoativos LESS e DAGC-90 provenientes do C e LSTEA do B. Estas preparações foram denominadas de 2, 4 e 6 e as respectivas preparações sem o princípio ativo de 1, 3 e 5.

TABELA VI Composição das preparações de acordo com a procedência dos tensoativos

Matéria-prima	Preparação					
	1	2	3	4	5	6
LESS (A)	X	X				
LESS (B)			X	X		
LESS (C)					X	X
LSTEA (A)	X	X				
LSTEA (B)			X	X	X	X
DAGC-90 (A)	X	X				
DAGC-90 (B)			X	X		
DAGC-90 (C)					X	X
Cetoconazol		X		X		X
Ácido cítrico	X	X	X	X	X	X
Trietanolamina	X	X	X	X	X	X

LESS corresponde a lauril éter sulfato de sódio, LSTEA a lauril sulfato de trietanolamina e DAGC-90 a dietanolamida do ácido graxo de côco com 90% de amina livre.

4.1.2. Conservantes e ácido salicílico

4.1.2.1 Matérias-primas

Os conservantes utilizados e o ácido salicílico foram de grau farmacêutico, identificados pelas letras c1 a c9.

TABELA VII Identificação dos conservantes testados e do ácido salicílico

Nome químico	Nome comercial	Fabricante ou distribuidor	Código	Lote
2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol	Bronopol [®]	Boots BP / Croda	c1	421360
5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano	Bronidox [®] L	Henkel	c2	24291
Imidazolidinil uréia	Germall [®] 115	Sutton / Aquatec	c3	G-613
Diazolidinil uréia	Germall [®] II	Sutton / Aquatec	c4	GT-359
Hidroximetilglicinato de Sódio	Suttocid [®] A	Sutton / Aquatec	c5	SA-210
Metilparabeno	Nipagin	NE / Natural Pharma	c6	97-02-4408
Fenoxietanol+1,2-dibromo-2,4-dicianobutano	Merguard [®] 1200	Calgon / Galena	c7	E7-220-800
Acido salicílico	Acido salicílico	NE / Natural Pharma	c8	032/6
Propilparabeno	Nipazol	NE / Natural Pharma	c9	97-06-4487

NE = Fabricante não especificado pelo fornecedor; Fonte: Brandão, L¹⁸

4.1.2.2 Soluções de conservantes

As soluções aquosas de conservantes testadas foram aquelas preparadas nas concentrações abaixo relacionadas (tabela VIII), equivalentes a metade das concentrações recomendadas pelos fabricantes ou na literatura 12, 13, 20, 22, 55, 77, 111, 118, 126, 127, 138.

TABELA VIII Soluções de conservantes testadas

Solução	Conservante	Concentração testada (%)
Sc1	c1	0,05 (p/v)
Sc2	c2	0,05 (v/v)
Sc3	c3	0,30 (p/v)
Sc4	c4	0,25 (p/v)
Sc5	c5	0,25 (v/v)
Sc6	c6	0,20 (p/v)
Sc7	c7	0,05 (v/v)

4.1.3 Xampus com conservantes ou ácido salicílico

A preparação 2 adicionada dos conservantes c1, c5, c6 e c7 (em 1 a 3 concentrações), de ácido salicílico (em 8 concentrações) e dos conservantes c6 e c9 associados (em duas concentrações), resultou em mais 20 preparações de xampus. A preparação 4 e a 3, respectivamente com e sem cetoconazol, adicionadas dos conservantes c1 e c7 ou ácido salicílico, resultou em mais 6 preparações de xampus. As concentrações dos conservantes nas diferentes preparações encontram-se relacionados abaixo (Tabela IX).

TABELA IX Concentrações dos 3 conservantes e do ácido salicílico adicionados às preparações 2, 3 e 4

Preparação	Conservante	Dose	Concentração %	Preparação utilizada
7	c1	1	0,050 (p/v)	2
8	c1	2	0,025 (p/v)	2
9	c5	1	0,250 (v/v)	2
10	c5	2	0,125 (v/v)	2
11	c5	3	0,500 (v/v)	2
12	c6	1	0,200 (p/v)	2
13	c6	2	0,300 (p/v)	2
14	c6	3	0,400 (p/v)	2
15	c6 + c9	1	0,180 + 0,020 (p/v)	2
16	c6 + c9	2	0,160 + 0,040 (p/v)	2
17	c7	1	0,025 (p/v)	2
18	c7	2	0,050 (p/v)	2
19	c1	2	0,025 (p/v)	3
20	c1	2	0,025 (p/v)	4
21	c7	2	0,050 (p/v)	3
22	c7	2	0,050 (p/v)	4
23	c8	8	2,000 (p/v)	3
24	c8	8	2,000 (p/v)	4
25	c8	1	0,250 (p/v)	2
26	c8	2	0,500 (p/v)	2
27	c8	3	0,750 (p/v)	2
28	c8	4	1,000 (p/v)	2
29	c8	5	1,250 (p/v)	2
30	c8	6	1,500 (p/v)	2
31	c8	7	1,750 (p/v)	2
32	c8	8	2,000 (p/v)	2

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação dos xampus sem conservantes (preparações 1 a 6)

Os xampus foram preparados em dois lotes. No primeiro, foram manipulados aproximadamente 550 mL de cada uma das preparações 1 a 6. No segundo lote preparou-se o mesmo volume apenas das preparações 2, 4 e 6.

Em todas as etapas os volumes foram medidos em provetas, cálices e pipetas graduadas, e utilizou-se balança semi analítica Micronal[®] modelo B400 para a pesagem das matérias-primas em estado sólido.

4.2.1.1 Preparação da solução de ácido cítrico 10% (p/v)

No momento do uso, foram preparadas soluções, dissolvendo-se 40 g e 60 g de ácido cítrico em 400 mL e 600 mL de água destilada, respectivamente.

4.2.1.2 Preparação da solução de trietanolamina 20% (p/v)

Foram preparadas soluções, dissolvendo-se por agitação manual constante, quantidades suficientes de trietanolamina em água destilada, para se obter a concentração de 20% (p/v), sempre no momento do uso.

4.2.1.3 Preparação dos xampus com o cetoconazol a 2% (p/v) (preparações 2, 4 e 6)

Homogeneizaram-se 110 mL de LESS, 27,5 mL de LSTEA e 16,5 mL de DAGC-90 em cálice de 1000 mL, por agitação manual, com auxílio de um bastão de vidro, durante 3 a 5 minutos. Adicionou-se em seguida 275 mL de água destilada. Em um béquer de 100 mL, separadamente, dissolveram-se

11g de cetoconazol em 55 mL de solução de ácido cítrico a 10%, preparado segundo item 4.2.1.1, com aquecimento até aproximadamente 50°C em bico de Bunsen e agitação manual constante durante 3 a 5 minutos. Adicionou-se a solução de cetoconazol ao xampu, com agitação, e em seguida verificou-se o pH com papel indicador. Ajustou-se o pH para aproximadamente 6,5 com solução de trietanolamina, preparada segundo item 4.2.1.2, e adicionou-se volume de água destilada suficiente para se obter 550mL de xampu. Esse procedimento foi repetido para a manipulação das três preparações de xampus com cetoconazol.

4.2.1.4 Preparação dos xampus sem cetoconazol (preparações 1, 3 e 5)

O procedimento utilizado foi o mesmo descrito para a preparação dos xampus com cetoconazol, descrito no item 4.2.1.3, excetuando-se a adição do princípio ativo, que foi substituído por água destilada.

4.2.1.5 Acondicionamento dos xampus

Dos 550 mL de cada uma das preparações 1 a 6 do primeiro lote, separaram-se 8 alíquotas de 50 mL, que foram acondicionadas em frascos de plásticos opacos leitosos, com batoque furado e tampa de rosca, de 120 mL de capacidade, e 1 alíquota de 100 mL que foi acondicionada no mesmo tipo de frasco. O restante do xampu foi descartado. Dos frascos contendo 50 mL, 6 foram utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de desafio e 2 foram retidos para eventual necessidade. Os frascos contendo 100 ml foram utilizados para o doseamento do cetoconazol. Ao final obteve-se 48 frascos com 50 mL de amostra e 6 com 100mL, que foram devidamente rotulados e armazenados a temperatura ambiente.

Dos 550 mL de cada uma das fórmulas 2, 4, e 6 preparadas no segundo lote, separaram-se 5 alíquotas de 100 mL, acondicionadas no mesmo tipo de frasco plástico, e destinadas ao teste do uso. O restante do

volume dos xampus foi descartado. Ao final obtiveram-se 15 frascos que foram devidamente rotulados e armazenados a temperatura ambiente.

4.2.2 Preparação das soluções de conservantes (Sc1 a Sc7)

Foram distribuídas 7 alíquotas de 100 mL de água destilada em frascos de vidro âmbar de 120 mL de capacidade e tampa de rosca sem batoque, e foram submetidos a esterilização em Luferco Lutz Ferrando[®] modelo 393211 durante 15 minutos a 121°C. Obteve-se assim um total de 7 frascos com água destilada estéril.

Os conservantes c1 a c7 foram adicionados nos frascos contendo água destilada estéril, utilizando procedimentos assépticos, em fluxo laminar.

Os conservantes em estado sólido, como o imidazolidinil uréia (c3), diazolidinil uréia (c4), 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (c1) e o metilparabeno (c6) foram inicialmente pesados em balança analítica marca CG[®] modelo Libror 210, e as porcentagens utilizadas representaram relação p/v. Os conservantes em estado líquido, como 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (c2), hidroximetilglicinato de sódio (c5) e o fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (c7), foram medidos em pipetas graduadas de 1mL, e as porcentagens utilizadas representaram relação v/v.

Os conservantes foram facilmente dissolvidos pela simples agitação, durante 2 a 3 minutos, com exceção do metilparabeno (c6) que precisou de aquecimento a 50°C em banho-maria Fanem[®] modelo MA 154 120/2, durante 3 a 5 minutos.

4.2.3 Preparação dos xampus com conservantes ou ácido salicílico (preparações 7 a 32)

Os xampus foram preparados à medida que os testes eram realizados, e sempre no dia anterior, exceto àqueles submetidos ao doseamento, que foram preparados e imediatamente analisados. Durante os testes de eficácia, foram preparados 460 mL dos xampus adicionados dos conservantes c1, c7 e

c9, 690 mL daqueles com c5 e c6 e 1840 mL daqueles contendo ácido salicílico, em porções de 230 mL para cada concentração. Para o teste de uso e o teste de estabilidade, realizados concomitantemente, manipularam-se lotes de 1200 mL para as preparações contendo cetoconazol a 2% e lotes de 400 mL para aquelas sem o princípio ativo.

Em todas as etapas os volumes foram medidos em provetas, cálices e pipetas graduadas e utilizou-se balança semi-analítica Micronal[®] modelo B400 para a pesagem das matérias-primas em estado sólido, e o banho-maria Fanem[®] modelo MA 154 120/2 quando foi necessário o aquecimento.

Os conservantes, hidroximetilglicinato de Sódio (c5) e fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (c7), ambos líquidos, foram medidos em pipetas graduadas.

O 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (c1), metilparabeno (c6), propilparabeno (c9), que são sólidos, foram pesados em balança semi analítica CG[®] modelo Libror 210 e, após adição nos xampus, estes dois últimos foram aquecidos a 50°C em banho-maria Fanem[®] modelo MA 154 120/2, com agitação manual intensa com auxílio de bastão de vidro, durante 3 a 5 minutos, para completa dissolução.

O ácido salicílico (c8), também sólido, foi pesado e colocado em gral de porcelana de 250 mL de capacidade, e dissolvido com quantidade suficiente do xampu utilizando pistilo; após completa dissolução, o xampu com o conservante foi vertido para o béquer com o restante de xampu e homogeneizado com auxílio do bastão de vidro.

O pH dos xampus foi verificado com auxílio de papel indicador universal Merck[®], e ajustado para aproximadamente 6,5 quando necessário, com solução de ácido cítrico 10% ou de trietanolamina 20% ou gotas de trietanolamina pura.

4.2.3.1 Preparo dos xampus utilizando-se da preparação número 2 (preparações 7 a 18 e 25 a 32)

Homogeneizaram-se 100 mL de LESS, 25mL de LSTEA e 15mL de DAGC-90 em cálice graduado de 500 mL de capacidade, por agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Adicionou-se em seguida 250 mL de água destilada. Em um béquer de 100 mL, separadamente, dissolveram-se 10 g de cetozonazol em 50 mL da solução de ácido cítrico, preparado segundo item 4.2.1.1, com aquecimento a cerca de 50°C, em bico de Bunsen, e agitação manual constante, durante 3 a 5 minutos. Adicionou-se a solução do cetozonazol ao xampu, com agitação, e em seguida verificou-se o pH com papel indicador e ajustou-se para aproximadamente 6,5 com volumes de solução de trietanolamina, preparada segundo item 4.2.1.2. Adicionou-se água destilada suficiente para se obter ao final 500 mL de xampu. Este foi dividido em 2 alíquotas de 230 mL em béqueres de 400 mL; adicionaram-se separadamente quantidades de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (c1), com agitação intensa durante 3 a 5 minutos, para obter concentrações de 0,050 e 0,025% (p/v), constituindo as preparações 7 e 8, respectivamente.

O procedimento anterior foi repetido, utilizando-se metilparabeno associado ao propilparabeno (c9), nas concentrações de 0,18 com 0,02% (p/v) e 0,16 com 0,04% (p/v), constituindo as preparações 15 e 16, respectivamente. O mesmo foi efetuado com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (c7), nas concentrações de 0,050 e 0,025% (v/v), obtendo-se as preparações 17 e 18.

Em cálice graduado de 1000 mL de capacidade, utilizando-se 150 mL de LESS, 37,5 mL de LSTEA, 22,5 mL de DAGC-90, 15 g de cetozonazol, 75 mL de solução de ácido cítrico 10%, 375 mL de água e depois completando-se o volume para 750 mL também com água, obedecendo-se a seqüência da técnica de preparo e correção do pH descrita no início deste tópico.

O volume de xampu obtido, 750mL, foi dividido em 3 alíquotas de 230 mL em béqueres de 400 mL. A estas alíquotas adicionaram-se quantidades de hidroximetilglicinato de Sódio (c5), suficientes para se obter concentrações

de 0,250, 0,125 e 0,500% (v/v), constituindo as preparações 9, 10 e 11. Este procedimento foi repetido com metilparabeno (c3), nas concentrações de 0,200, 0,300 e 0,400% (p/v), obtendo-se as preparações 12, 13 e 14.

Prepararam-se 2000 mL de xampu em cálice graduado de mesmo volume de capacidade, utilizando-se 400 mL de LESS, 100 mL de LSTEA, 60 mL de DAGC-90, 40 g de cetozonazol, 200 mL de solução de ácido cítrico 10%, 1000 mL de água e depois completando-se o volume para 2000 mL também com água; a seqüência da técnica de preparo foi a mesma descrita no início deste tópico. Este volume foi dividido em 8 alíquotas de 230 mL, em béqueres de 400 mL, as quais adicionou-se ácido salicílico (c8), em quantidade suficientes para se obter concentrações de 0,250, 0,500, 0,750, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750 e 2,000% (p/v); o pH foi então corrigido novamente, para aproximadamente 6,5, com gotas de trietanolamina pura, constituindo as preparações 25 a 32, respectivamente.

4.2.3.2 Preparo dos xampus utilizando-se da preparação número 3 e 4 (preparações 19 a 24)

Em recipiente de aço inoxidável com capacidade para 6000 mL adicionaram-se 1000 mL de LESS, 250 mL de LSTEA, 150 mL de DAGC-90 e 2500 mL de água destilada, com agitação constante com auxílio de um bastão de vidro, obtendo-se uma solução de aproximadamente 3900 mL (correspondente a 78% da fórmula de xampu, isto é, sem o cetozonazol e volumes da solução de ácido cítrico e trietanolamina). Esta solução foi separada em 3 alíquotas de 936 mL, em cálices de vidro de 2000 mL de capacidade, e mais 3 alíquotas de 312 mL, em cálices de 500 mL (representando 78% dos volumes finais de 1200 e 400 mL de xampu, respectivamente), e o restante foi descartado. Em todas as alíquotas, separadamente, adicionaram-se quantidades de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (c1) para se obter a concentração de 0,025% (p/v); fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (c7) para se obter a concentração

de 0,050% (v/v) e ácido salicílico (c8) para se obter a concentração de 2,0% (p/v).

Às alíquotas de 936 mL adicionaram-se 24 g de cetoconazol dissolvido à quente, utilizando bico de Bunsen, em 120mL de solução de ácido cítrico preparada, segundo o item 4.2.1.1, ajustou-se o pH para próximo de 6,5 com solução de trietanolamina preparada, segundo o item 4.2.1.1, e completou-se o volume para 1200 mL com água destilada. Estas constituíram a preparação 4 (xampu com cetoconazol 2%) adicionada dos conservantes c1 a 0,025% (p/v), c7 a 0,05% (v/v) e c8 a 2,0% (p/v), e que passaram a ser identificadas como preparação 20, 22 e 24, respectivamente. Para o conservante c8, efetuou-se nova correção de pH, para aproximadamente 6,5, com gotas de trietanolamina pura.

Às alíquotas de 312 mL adicionaram-se 8 mL de água destilada, 40 mL de solução de ácido cítrico, preparada segundo o item 4.2.1.1, ajustou-se o pH para próximo de 6,5 com solução de trietanolamina, preparada segundo o item 4.2.1.1. e completou-se o volume para 400 mL com água destilada Estas constituíram os xampus controle sem cetoconazol (preparação 3) com conservantes c1 a 0,025%, c7 a 0,05% e c8 a 2,0%, e que passaram a ser identificadas como preparação 19, 21 e 23, respectivamente.

4.2.3.3 Acondicionamento dos xampus

As porções de 230 mL das preparações 7 a 18 e 25 a 32 foram divididas em volumes de 50 mL e acondicionadas em frascos plásticos opacos leitosos, com batoque furado e tampa de rosca, com capacidade de 120 mL, e o restante de xampu foi descartado. Foram obtidos ao final 4 frascos de cada preparação, dois deles destinados aos testes microbiológicos e dois para retenção. Obtiveram-se no final 80 frascos, que foram devidamente rotulados e armazenados a temperatura ambiente. Como estes não foram submetidos ao doseamento, não foram preparados xampus sem o princípio ativo.

As porções de 1200 mL das preparações 20, 22 e 24 e as porções de 400 mL das preparações 19, 21 e 23 foram divididas em volumes de 100 mL e acondicionadas em frascos plásticos opacos leitosos, com batoque furado e tampa de rosca, com capacidade de 120mL. Foram obtidos 11 frascos de xampu para cada preparação 20, 22 ou 24, sendo 6 deles destinados ao teste de uso, 4 aos testes de estabilidade e 1 para retenção, e 3 frascos das preparações 19, 21 e 23, sendo 2 deles destinados aos testes de estabilidade, e 1 para retenção. Obtiveram-se no final 42 frascos, devidamente rotulados e armazenados, segundo às condições dos testes aos quais foram submetidos.

4.2.4 Análise físico-química dos xampus

As preparações de xampus com o cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6) e as respectivas preparações sem o princípio ativo (preparações 1, 3 e 5) foram submetidas a determinação do valor de pH. Nas preparações contendo o cetoconazol, foram efetuadas as determinações do teor de princípio ativo.

Os xampus adicionados de conservantes e o cetoconazol, referentes às preparações 20, 22 e 24, foram efetuadas as determinações do teor de princípio ativo durante o teste de estabilidade de 180 dias.

4.2.4.1 pH

Os valores de pH dos xampus foram determinados em potenciômetro de marca Digimed[®] modelo TE 901, à temperatura de 25 °C, imediatamente após o término das preparações 1 a 6.

4.2.4.2 Doseamento do cetoconazol por espectrofotometria⁹⁰

O doseamento do cetoconazol nas preparações de xampu 2, 4, 6, 20, 22, e 24 foi efetuado pelo método espectrofotométrico. Para as 3 primeiras

preparações, referentes aos xampus sem conservante, os doseamentos foram repetidos após 7, 14, 21 e 28 dias, e para outras preparações, adicionadas de conservantes, após 30, 60 e 180 dias.

4.2.4.2.1 Preparação da solução padrão de cetoconazol 2% (p/v)

Pesaram-se exatamente cerca de 100 mg de cetoconazol (matéria prima com teor de 99,6%), em balança analítica marca CG[®] modelo Libror 210, que foi transferido para balão volumétrico de 100 mL de capacidade, dissolvida em ácido clorídrico 0,01N SR³⁹, e o volume completado com o mesmo ácido. Uma alíquota de 5 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com a mesma solução ácida, obtendo-se uma solução padrão de cetoconazol de 0,2 mg/mL (p/v).

4.2.4.2.2 Preparação da solução da amostra e do controle (branco)

Logo após o término da preparação dos xampu segundo o item 4.2.1, uma tomada de 5 mL de cada amostra foi transferida para balão volumétrico de 100 mL de capacidade e o volume foi completado com ácido clorídrico 0,01N SR. Uma alíquota de 5 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com a mesma solução ácida. Esse procedimento foi utilizado para as amostras de xampu com cetoconazol (preparações 2, 4, 6, 20, 22 e 24) e também para aquelas sem o princípio ativo (1, 3, 5, 19, 21 e 23), que se constituíram em soluções controle ou branco. Todas as soluções das amostras foram preparadas em duplicatas.

4.2.4.2.3 Preparo do aparelho e leitura das absorvâncias

Foi empregado o espectrofotômetro marca Micronal[®] modelo B382, com cubetas de quartzo de 10 mm para leitura em ultravioleta. As leituras das absorvâncias das soluções padrão e amostra foram efetuadas no comprimento de onda de 269 nm, a 25 °C. O valor 100% de transmissão da escala do aparelho foi acertado com uma solução aquosa de ácido clorídrico 0,01 N SR, 15 minutos após o aparelho ter sido ligado.

4.2.4.2.4 Cálculos

Utilizaram-se as médias dos valores de absorvância e subtraíram-se os valores médios de absorvância obtidos com a leitura dos correspondentes xampus sem o princípio ativo. Estes valores foram aplicados na fórmula abaixo, determinando-se as concentrações em g/mL de cetoconazol nos xampus.

$$C = (A_a \times C_p) / (A_p \times 10) \quad (1)$$

C - concentração de cetoconazol na amostra (g/mL)

A_a - Absorvância média da amostra de xampu

A_p - Absorvância média da solução padrão de cetoconazol

C_p - concentração da solução padrão de cetoconazol (mg/mL)

4.2.4.3 Teste de estabilidade do cetoconazol

Os frascos correspondentes às preparações 19 a 24 foram armazenados a temperatura ambiente, em balcão de laboratório (cerca de 25°C), durante 180 dias. Como para as determinações do teor de princípio ativo utilizaram-se amostras em duplicatas, foram submetidos 4 frascos de cada preparação com cetoconazol (preparações 20, 22 e 24) e 2 frascos de

cada uma daquelas sem o princípio ativo (preparações 19, 21 e 23). No total, submeteram-se 18 frascos ao teste de estabilidade.

As amostras 20, 22 e 24 foram submetidas à determinação do teor de princípio ativo logo após o preparo, e durante o teste, nos tempos 30, 60 e 180 dias após, segundo o procedimento descrito no item 4.2.4.2.

4.2.5 Avaliações microbiológicas

4.2.5.1 Preparação dos meios de cultura

Utilizaram-se os meios de cultura ágar caseína-soja, ágar Sabouraud-dextrose e ágar Sabouraud-dextrose modificado pela adição de 1% (p/v) de polissorbatato 40 (Atlas) antes da esterilização. Todos os meios de cultura foram preparados a partir da mistura complexa desidratada, distribuídos em diferentes volumes, dependendo do tipo de análise em que seriam utilizados, e esterilizados em autoclave Luferto Lutz Ferrando[®] modelo 39211, obedecendo-se as instruções do fabricante (Difco).

Os meios foram preparados em quantidade suficiente e distribuídos de diferentes maneiras, conforme o uso a que se destinavam. Os meios para a contagem de microrganismos viáveis pelo método de semeadura em profundidade foram distribuídos em volumes de 200 mL para balões de vidro. Aqueles utilizados para a manutenção dos microrganismos foram distribuídos em volumes de 8mL para tubos de vidro de 15 x 2cm, esterilizados e mantidos em posição inclinada até a solidificação do meio. Para a contagem de microrganismos viáveis pela técnica de filtragem, na qual a membrana é depositada na superfície do meio de cultura solidificado, estes foram preparados vertendo-se volumes de cerca de 15 ml do meio de cultura após esterilização para placas de Petri, previamente esterilizadas por calor seco, em estufa marca Fanem[®] modelo 315 SE; este procedimento foi efetuado em capela de fluxo laminar, seguindo-se técnicas assépticas; as placas foram mantidas em posição horizontal até a solidificação do meio.

A esterilidade dos meios foi comprovada pela incubação em estufa Fanem[®] 002 CB, à temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2 dias para os meios caseína-soja e à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias para os meios Sabouraud-dextrose e Sabouraud-dextrose modificado. Foram também comprovados quanto a eficiência pela inoculação e incubação com os respectivos microrganismos a que se destinavam.

O armazenamento dos meios de cultura ocorreu sob refrigeração a cerca de 10°C , e meia hora antes do momento ficaram expostos à temperatura ambiente.

Antes do uso estes foram fundidos em forno de microondas Sharp[®] modelo Carrousel II, inicialmente submetidos à potência máxima durante dois minutos, seguido de agitação, depois diminuindo-se o tempo de exposição à mesma potência, gradativamente até a total fusão, com cuidado de se evitar a ebulição do meio. Os meios fundidos foram mantidos a 48°C em banho de água quente até o momento do uso.

4.2.5.2 Preparação das soluções

4.2.5.2.1 Solução fisiológica

A solução fisiológica foi preparada pela dissolução de cloreto de sódio P.A. (Merck) 0,9% (p/v) em água destilada. Aliquotas de 9 mL e 50 mL foram distribuídas em tubos de ensaio de vidro de 15 x 2cm e frascos âmbar de 50 mL, respectivamente, e submetidas a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.2.5.2.2 Solução fisiológica com 1% (p/v) de polissorbato 80

Esta solução foi preparada segundo procedimento anterior, adicionando-se o polissorbato 80 (Atlas) a 1% (p/v) antes da esterilização.

4.2.5.2.3 Solução cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 1% (p/v)⁸²

Uma tomada de 1 g de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio PA (CTT) (Sigma) foi dissolvida em 100mL de água destilada estéril e mantida em frasco âmbar.

4.2.5.3 Manutenção dos microrganismos^{21, 134}

4.2.5.3.1 Bactérias

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas cepacia* ATCC 17759 foram semeados em estrias sobre a superfície do ágar caseína-soja inclinado, preparado conforme item 4.2.5.1 e incubadas em estufa a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas para as duas primeiras e durante 48 horas para *Pseudomonas cepacia*. A bactéria *Serratia marcescens*, que foi isolada de um dos xampus contaminados no teste de uso, foi mantida da mesma forma, após incubação de 24 horas nas mesmas condições.

4.2.5.3.2 Leveduras e bolores

Candida albicans ATCC 10321 e *Aspergillus niger* ATCC 16404 foram semeadas em ágar Sabouraud-dextrose e o *Malassezia furfur* ATCC 14521 em meio de ágar Sabouraud-dextrose modificado. Os meios de cultura foram preparados conforme o item 4.2.5.1. Os tubos com cultura de *Candida albicans* foram incubados em estufa a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias, e aqueles com os outros dois microrganismos foram incubados nas mesmas condições durante 7 dias.

4.2.5.4 Determinação da carga microbiana viável ^{21, 134}

4.2.5.4.1 Técnica da semeadura em profundidade

Alíquotas de 0,5 e 1,0 mL de diferentes diluições decimais seriadas do material em análise (suspensão microbiana ou amostra) foram transferidas para placas de Petri, previamente esterilizadas por calor seco, homogeneizadas com aproximadamente 15mL de meio de cultura específico, previamente fundido e mantido a temperatura de cerca de 48°C. Este procedimento foi efetuado em capela de fluxo laminar horizontal marca Veco[®] modelo HLFS 12 série FL 1431 e modelo VLFS 09 série FL 1511, seguindo-se técnicas assépticas, e, após solidificação, as placas foram incubadas em estufa. O meio de cultura utilizado foi o ágar caseína-soja para as bactérias, Sabouraud-dextrose para *Candida albicans* e *Aspergillus niger* e Sabouraud-dextrose modificado para *Malassezia furfur*. As bactérias foram incubadas a 36±1°C durante 48 horas e os fungos a 25±2°C durante 5 a 7 dias. A condição asséptica da capela de fluxo laminar foi monitorada pela exposição de uma placa contendo o mesmo meio de cultura do teste.

A contagem das colônias foi efetuada visualmente com auxílio de uma lupa em contador de colônias marca Phoenix[®] modelo CP 600.

4.2.5.4.2 Técnica da filtração por membrana de ésteres de celulose ²¹

Em capela de fluxo laminar horizontal, seguindo-se técnicas assépticas, alíquotas de 1,0 mL de diferentes diluições decimais seriadas da amostra em análise (suspensão microbiana ou amostra) foram filtradas em membrana de éster de celulose de porosidade 0,45 µm Millipore[®], auxiliadas por vácuo, através de bomba marca Primar[®] modelo 141, com potência máxima de 76 cm de Hg. Utilizaram-se sistemas filtrantes em unidades individuais Millipore[®] previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. As membranas foram previamente umedecidas com água destilada

estéril, submetidas a vácuo por aproximadamente 30 segundos, e após a filtração da amostra, lavadas com 10ml de água destilada estéril. A membrana foi retirada do sistema, com auxílio de uma pinça estéril, e depositada na superfície do meio de cultura solidificado em placa de Petri, que foi incubada em estufa. O meio de cultura e as condições de incubação foram específicos ao microrganismo em estudo, definidas no item anterior (4.2.5.1 e 4.2.5.3). A condição asséptica do fluxo laminar foi monitorada pela exposição de uma placa contendo o mesmo meio de cultura do teste.

Após incubação a membrana foi retirada da superfície do meio de cultura e depositada sobre papel absorvente embebido em solução de CTT 1%. Após cerca de 30 minutos foi efetuada a contagem do número de colônias de coloração vermelha, com auxílio de uma lupa, em contador de colônias.

4.2.5.4.3 Cálculo da carga microbiana

As placas com 30 a 300 colônias para bactérias ou 50 a 150 para bolores e leveduras, e as membranas com 50 a 150 colônias foram consideradas para o cálculo da UFC nas amostras. O valor médio do número de colônias multiplicado pelo fator de diluição forneceu a carga microbiana presente na amostra em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

4.2.5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras pelo teste de desafio ^{21, 32, 96, 97, 98, 99, 129, 130, 134}

4.2.5.5.1 Preparo e padronização das suspensões microbianas

A partir das culturas de manutenção, os microrganismos foram semeados em meio de cultura inclinado e incubados a temperatura e tempo

específicos, segundo o item 4.2.5.3. A massa celular resultante do crescimento de bactérias e de *Candida albicans* foi recolhida em 9 mL de solução fisiológica estéril e aquelas obtidas do crescimento de *Malassezia furfur* e *Aspergillus niger* foram recolhidas com solução fisiológica com 1% de polissorbato 80. As suspensões obtidas foram agitadas manualmente e uma gota foi transferida para outro tubo contendo 9 mL de solução fisiológica estéril. A suspensão contendo a gota da suspensão microbiana foi submetida à contagem de microrganismos viáveis pela técnica de semeadura em profundidade, segundo item 4.2.5.4.1, utilizando-se as diluições decimais seriadas 10^{-3} a 10^{-6} para as bactérias e 10^{-2} a 10^{-4} para os fungos. Determinou-se o número de UFC/ml da suspensão inicial, segundo o procedimento descrito no item 4.2.5.4. As suspensões concentradas foram mantidas em refrigerador. As suspensões bacterianas foram utilizadas em até 24 horas, a de *Candida albicans* até 5 dias e os outros microrganismos até 30 dias.

4.2.5.5.2 Teste de desafio das amostras com microrganismos

Os frascos contendo determinado volume de amostras foram limpos externamente com algodão embebido em etanol 70% (p/v), e homogeneizados mediante agitação manual. Em capela de fluxo laminar horizontal, seguindo-se técnicas assépticas, cada uma das amostras e o mesmo volume de solução fisiológica foram inoculadas com a suspensão padronizada do microrganismo, que foi preparada segundo o item 4.2.5.5.1, para obter-se a concentração celular de 10^5 a 10^6 UFC/ml de bactérias e 10^4 a 10^5 de fungos, respeitando-se a relação entre o volume do inóculo e da amostra como sendo menor que 1% (v/v). Imediatamente após homogeneização manual durante 5 segundos, representando o tempo T_{zero} , a carga microbiana foi quantificada. As amostras inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente e foram submetidas novamente a determinação do número de microrganismos sobreviventes após 2, 4, 8 e 24 horas da

inoculação inicial, e também decorridos 2, 7, 14, e 21 dias, desde que na última avaliação anterior tivesse microrganismos sobreviventes. Esses tempos foram denominados $T_{2\text{horas}}$, $T_{4\text{horas}}$, $T_{8\text{horas}}$, $T_{24\text{horas}}$, $T_{2\text{dias}}$, $T_{7\text{dias}}$, $T_{14\text{dias}}$ e $T_{21\text{dias}}$. Todas as amostra foram analisadas quando decorridos 28 dias da inoculação inicial, representando o tempo $T_{28\text{dias}}$.

As técnicas de quantificação da carga microbiana viável utilizadas seguiram os procedimentos descritos no item 4.2.5.4, respectivamente para bactérias e fungos. A escolha da técnica de semeadura em profundidade ou a de filtração em membrana e as diluições decimais seriadas utilizadas dependeu do tipo de microrganismo inoculado, da amostra em análise e do tempo decorrido desde a inoculação inicial.

4.2.5.5.3 Interpretação dos resultados

Calculou-se a média aritmética do número de microrganismos viáveis em cada tempo de análise. Os valores obtidos foram transformados em logaritmo decimal, e o menor valor de contagem microbiana obtido foi indicado como $< 1,0$. Os resultados obtidos foram dispostos em tabelas (vide Apêndice) e também em gráficos de logaritmo do número de microrganismos viáveis em função do tempo, denominados curvas de morte microbiana.

Pelos resultados obtidos nos intervalos de tempo T_{zero} , $T_{2\text{horas}}$, $T_{4\text{horas}}$, $T_{8\text{horas}}$, $T_{24\text{horas}}$ e $T_{2\text{dias}}$ calcularam-se as equações das retas utilizando como último ponto o logaritmo do número de sobreviventes anterior aquele que resultou em $< 1,0$. As retas com coeficientes de correlação que resultaram em valores entre $-0,900$ e $-1,000$ tiveram os valores de D calculados (valor de redução decimal). Estes foram obtidos por meio do coeficiente angular das retas, e foram comparados aos critérios de aceitação do método de regressão linear.

4.2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos xampus sem conservante

4.2.6.1 Teste do desafio com bactérias

Alíquotas de 50mL das preparações de xampu 1 a 6 e também o mesmo volume de solução fisiológica, foram inoculadas com suspensões padronizadas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas cepacia*, separadamente, seguindo os procedimentos descritos no item 4.2.5.5.1 e 4.2.5.5.3.

As soluções de controle do crescimento microbiano tiveram sua carga microbiana viável quantificada de maneira similar para as 3 bactérias desafiadas, através da técnica de semeadura em profundidade. Utilizaram-se 0,5 e 1,0 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , para todos os intervalos de tempo, para *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas cepacia*. Para o *Staphylococcus aureus* utilizaram-se as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} até o tempo $T_{2\text{dias}}$, e 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} a partir desse tempo até o final do teste.

4.2.6.1.1 *Staphylococcus aureus*

A quantificação da carga microbiana viável das preparações 1 a 6 foi executada utilizando os mesmos procedimentos. Para o tempo T_{zero} e $T_{2\text{horas}}$, alíquotas de 0,5 e 1,0 mL das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram quantificadas pela técnica de semeadura em profundidade. No tempo $T_{4\text{horas}}$ procedeu-se a quantificação pela técnica de filtração por membrana utilizando-se 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} e pela técnica de semeadura em profundidade, com 0,5 e 1,0mL da diluição 10^{-4} . Nos tempos $T_{8\text{horas}}$, $T_{24\text{horas}}$, $T_{2\text{dias}}$ até o tempo $T_{28\text{dias}}$, procedeu-se somente pela técnica da filtração por membrana utilizando-se 1mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} nos dois primeiros tempos e 1mL do próprio xampu no tempo $T_{2\text{dias}}$ até o tempo $T_{28\text{dias}}$.

4.2.6.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

A carga microbiana viável foi quantificada pela técnica de filtração por membrana utilizando as mesmas diluições para todas as preparações de xampu, diferindo somente em relação ao tempo T_{zero} , quando filtrou-se 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} para preparações 2, 4 e 6 e 1 mL das diluições 10^{-3} e 10^{-4} para as preparações 1, 3 e 5. No tempo $T_{2\text{horas}}$ utilizou-se 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} e a partir do tempo $T_{4\text{horas}}$ até o tempo $T_{2\text{dias}}$, 1 mL do próprio xampu.

4.2.6.1.3 *Pseudomonas cepacia*

Procedeu-se da mesma maneira para a quantificação da carga microbiana viável de todas as preparações de xampu. No tempo T_{zero} , 0,5 e 1,0 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram submetidas a semeadura em profundidade. Nos tempos $T_{2\text{horas}}$, $T_{4\text{horas}}$ e $T_{8\text{horas}}$, semearam-se 0,5 e 1,0 mL das diluições 10^{-3} e 10^{-4} pela mesma técnica anterior. Nos tempos $T_{24\text{horas}}$ e $T_{2\text{dias}}$ utilizou-se a filtração em membrana para 1,0 mL da diluição 10^{-1} e a inoculação em profundidade para 0,5 e 1,0 mL da diluição 10^{-2} . A partir do tempo $T_{7\text{dias}}$ até o tempo $T_{28\text{dias}}$, utilizou-se apenas a filtração por membrana de 1 mL do próprio xampu.

4.2.6.2 Teste do desafio com leveduras e bolores

As preparações 1 a 6, além da solução fisiológica estéril, foram inoculadas com gotas de suspensão padronizada de levedura *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Malassezia furfur*, seguindo os procedimentos descritos no item 4.2.5.5.1 e 4.2.5.5.3.

A quantificação da carga microbiana viável foi realizada seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para as bactérias. A técnica de semeadura e as diluições utilizadas para cada microrganismo constam na tabela X.

TABELA IX Técnicas e diluição utilizadas para a quantificação de fungos nas preparações 1 a 6, nos diferentes intervalos de tempo

Amostra	Microorganismo	Tempo	Semeadura em Profundidade (0,5 – 1,0 mL)	Filtração em membrana (1,0 mL)
SF	<i>C. albicans</i>	T _{zero} a T _{28dias}	10 ⁻³ e 10 ⁻⁴	
SF	<i>M. furfur</i>	T _{zero} a T _{28dias}	10 ⁻³ e 10 ⁻⁴	
SF	<i>A. niger</i>	T _{zero} a T _{28dias}	10 ⁻³ e 10 ⁻⁴	
Prep 1, 3 e 5	<i>C. albicans</i>	T _{zero}	10 ⁻³ e 10 ⁻⁴	
Prep 1, 3 e 5	<i>C. albicans</i>	T _{2horas} e T _{4horas}	10 ⁻² e 10 ⁻³	
Prep 1, 3 e 5	<i>C. albicans</i>	T _{8horas} a T _{2dias}		10 ⁻¹ a 10 ⁻³
Prep 2, 4 e 6	<i>C. albicans</i>	T _{zero}	10 ⁻⁴	10 ⁻¹ a 10 ⁻³
Prep 2, 4 e 6	<i>C. albicans</i>	T _{2horas}		10 ⁻¹ a 10 ⁻³
Prep 2, 4 e 6	<i>C. albicans</i>	T _{4horas} a T _{2dias}		10 ⁻¹ e 10 ⁻²
Prep 1 a 6	<i>C. albicans</i>	T _{7dias} a T _{28dias}		sem diluição
Prep 1, 3 e 5	<i>M. furfur</i>	T _{zero} e T _{2horas}	10 ⁻³ e 10 ⁻⁴	
Prep 1, 3 e 5	<i>M. furfur</i>	T _{4horas}	10 ⁻² e 10 ⁻³	
Prep 1, 3 e 5	<i>M. furfur</i>	T _{8horas} a T _{2dias}	10 ⁻²	10 ⁻¹
Prep 2, 4 e 6	<i>M. furfur</i>	T _{zero}		10 ⁻² e 10 ⁻³
Prep 2, 4 e 6	<i>M. furfur</i>	T _{2horas} a T _{2dias}		10 ⁻¹ e 10 ⁻²
Prep 1 a 6	<i>M. furfur</i>	T _{7dias} a T _{28dias}		sem diluição
Prep 1 a 6	<i>A. niger</i>	T _{zero}	10 ⁻³ e 10 ⁻⁴	
Prep 1 a 6	<i>A. niger</i>	T _{2horas} e T _{4horas}		10 ⁻³ e 10 ⁻⁴
Prep 1 a 6	<i>A. niger</i>	T _{8horas} a T _{2dias}		10 ⁻² e 10 ⁻³
Prep 1 a 6	<i>A. niger</i>	T _{7dias} a T _{28dias}		sem diluição

SF - solução fisiológica, Prep - Preparações

4.2.6.3 Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados foi realizada da maneira descrita no item 4.2.5.5.4 .

4.2.7 Avaliação da atividade intrínseca das soluções aquosas de conservantes pelo teste de desafio ^{21, 32}

4.2.7.1. Teste de desafio

Os microrganismos empregados para o teste de desafio das soluções aquosas dos conservantes foram *Pseudomonas cepacia* e *Serratia marcescens*.

As soluções Sc1, Sc2, Sc3, Sc4, Sc5, Sc6, Sc7 além da solução fisiológica foram inoculadas com as suspensões bacterianas, seguindo-se a técnica descrita no item 4.2.5.5.

A carga microbiana viável da solução fisiológica foi quantificada de maneira similar para as 2 bactérias desafiadas, através da técnica da semeadura em profundidade. Utilizou-se 0,5 e 1,0 mL das diluições 10^{-3} a 10^{-5} para todos os intervalos de tempo.

O método de quantificação da carga microbiana de *Pseudomonas cepacia* foi diferente do utilizado para *Serratia marcescens*, dependendo do tempo de análise.

As técnicas e as diluições utilizadas para a quantificação de bactérias nas soluções de conservante, nos diferentes intervalos de tempo, estão na tabela XI.

TABELA XI Técnicas e diluição utilizadas para a quantificação de bactérias viáveis nas soluções de conservantes (Sc1 a Sc7) nos diferentes intervalos de tempo

Microrganismo	Tempo	Semeadura em Profundidade (0,5 – 1,0 mL)	Filtração em membrana (1,0 mL)
<i>P. cepacia</i>	T _{zero}	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	—
<i>P. cepacia</i>	T _{2horas} e T _{4horas}	10 ⁻² a 10 ⁻⁵	10 ⁻¹
<i>P. cepacia</i>	T _{8horas} a T _{2dias}	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	sem diluição
<i>P. cepacia</i>	T _{7dias} a T _{28dias}	*	sem diluição
<i>S. marcescens</i>	T _{zero}	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵	—
<i>S. marcescens</i>	T _{2horas} e T _{4horas}	10 ⁻² a 10 ⁻⁵	10 ⁻¹
<i>S. marcescens</i>	T _{8horas}	10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵	sem diluição
<i>S. marcescens</i>	T _{24horas} a T _{28dias}	*	sem diluição

* Baseadas nos resultados do tempo anterior, utilizaram-se diluições em que ocorreram crescimento microbiano, — = não testada

4.2.7.2 Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados procedeu da maneira descrita no item 4.2.5.5.4.

4.2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana dos xampus adicionados de conservante ou ácido salicílico pelo teste de desafio

4.2.8.1 Teste de desafio

Os xampus com os conservantes c1, c5, c6, c7 e c6 associado ao c9, referentes às preparações 7 a 18, e aqueles com o ácido salicílico (c8),

referente às preparações 25 a 32, foram testados contra *Pseudomonas cepacia* e *Serratia marcescens*.

Os xampus e a solução fisiológica foram inoculadas separadamente com a suspensão de *Pseudomonas cepacia* e *Serratia marcescens* seguindo-se a técnica descrita no item 4.2.5.5.3.

As soluções fisiológicas de controle do crescimento microbiano tiveram sua carga microbiana viável quantificada de maneira similar para as 2 bactérias desafiadas, empregando-se a técnica da semeadura em profundidade. Utilizaram-se 0,5 e 1,0 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} durante para todos os intervalos de tempo.

As técnicas e as diluições empregadas para a quantificação do número de bactérias viáveis nas preparações de xampu nos diferentes intervalos de tempo são as mesmas descritas anteriormente na tabela XI.

4.2.8.2 Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados procedeu da maneira descrita no item 4.2.5.5.4.

4.2.9 Teste do uso ¹⁰¹

4.2.9.1 Amostras utilizadas

Este teste foi efetuado em duas etapas, sendo que na primeira utilizaram-se as preparações 2, 4 e 6, referentes aos xampus com cetoconazol 2% (p/v) sem sistema conservantes, e na segunda as preparações 20, 22 e 24, referentes aos xampus obtidos a partir da preparação 4 adicionadas de sistema conservante ou ácido salicílico.

Na primeira etapa foram utilizadas cinco amostras de 100 mL de cada uma das preparações acondicionadas em frascos plásticos leitosos de 120 mL, com batoque furado e tampa de rosca, totalizando 15 frascos, e na segunda etapa, 6 amostras de cada preparação, totalizando de 18 frascos.

4.2.9.2 Seleção e procedimento dos usuários

Os xampus foram distribuídos para indivíduos que diziam apresentar caspa, num total de 15 voluntários, 5 para cada preparação, no caso dos xampus sem sistema conservantes e, além desses, mais 3 voluntários, para os xampus adicionado de sistema conservante. Orientou-se os voluntários para aplicar o xampu, massageando o couro cabeludo durante 2 minutos, enxaguar abundantemente, e repetir esse procedimento 3 vezes por semana. Recomendou-se o armazenamento dos frascos em lugares normalmente utilizados para este fim em suas residências. Os voluntários utilizaram o produto até que restasse cerca de 10 mL no frasco, quando foram devolvidos e submetidos a avaliações microbiológicas.

4.2.9.3 Avaliações microbiológicas

Todos os frascos devolvidos foram limpos externamente com etanol 70% (v/v) antes das análises. Foram submetidos à contagem de bactérias viáveis, leveduras e bolores e também, os microrganismos contaminantes isolados à identificação.

4.2.9.3.1 Contagem de bactérias viáveis

Utilizou-se o método da filtração por membrana com deposição em superfície de ágar solidificado, seguindo-se os procedimentos do item 4.2.5.4.2. para contagem de bactérias, filtrando-se 1,0 mL do xampu sem diluição e o mesmo volume da diluição 10^{-1} . As amostras que apresentaram contagem de sobreviventes maior que 150 UFC por membrana filtrante foram reanalisadas pelo método de semeadura em profundidade, seguindo-se a técnica do item 4.2.5.4.1, para bactérias, utilizando-se 0,5 e 1,0 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-6} .

4.2.9.3.2 Contagem de leveduras e bolores viáveis

Repetiu-se os procedimentos descritos no item anterior para bactérias, diferindo apenas no tocante aos meios de cultura e condições de incubação, que seguiram as instruções descritas no item 4.2.5.3.2 para análise de leveduras e bolores.

4.2.9.3.3 Identificação dos microrganismos contaminantes

As amostras com microrganismos contaminantes foram submetidas às técnicas de isolamento, segundo métodos farmacopêicos. A identificação foi efetuada pelo sistema automatizado Vitek®.

4.2.9.4 Interpretação dos resultados

A carga microbiana contaminante apresentada por amostras de xampus foram comparada aos valores limites permitidos pelas especificações da Farmacopéia Britânica de 1993²¹ e do CTFA³².

5 RESULTADOS

5.1 XAMPUS SEM CONSERVANTE

5.1.1 Análise físico-química dos xampus

5.1.1.1 pH

Os valores de pH das preparações de 1 a 6 de xampus foram:

Preparação	1	2	3	4	5	6
pH	6,80	6,70	6,50	6,60	6,40	6,50

5.1.1.2 Doseamento

As concentrações de cetoconazol nas preparações 2, 4 e 6, nos diferentes tempos, encontram-se na tabela XII.

TABELA XII Concentração de cetoconazol das preparações 2, 4 e 6 de xampu, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após o preparo, armazenados à temperatura ambiente

Tempo (dias)	Concentração (g/100 mL)		
	2	4	6
0	1,81 ($\pm 0,007$)	1,94 ($\pm 0,007$)	1,94 ($\pm 0,021$)
7	1,85 ($\pm 0,007$)	1,95 ($\pm 0,014$)	1,90
14	1,83 ($\pm 0,007$)	1,93 ($\pm 0,021$)	1,99 ($\pm 0,035$)
21	1,81 ($\pm 0,035$)	1,93	2,00 ($\pm 0,007$)
28	1,92 ($\pm 0,007$)	1,96	1,90 ($\pm 0,055$)

Anova com $p = 0,983$

5.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.1.2.1 Teste de desafio pelo método da regressão linear

As figuras seguintes representam os gráficos das curvas de morte dos microrganismos desafiados, em relação ao tempo. As cargas microbianas presentes estão indicadas em UFC/mL de amostra, e os intervalos de tempo em horas, desde T_{zero} até $T_{48horas}$ ou T_{2dias} . Em todas as figuras, as siglas Prep 2, Prep 4 e Prep 6 representam os xampus com cetoconazol; as siglas Prep 1, Prep 3 e Prep 5, os xampus sem o princípio ativo.

Foram apresentados os gráficos comparativos das preparações dos xampus com e sem cetoconazol, para cada microrganismo. Em seguida, os gráficos comparativos apenas das preparações de xampus com cetoconazol.

Para cada desafio de microrganismo em cada preparação são apresentados dois gráficos: primeiro o da curva de morte e, ao lado, o da reta de redução, obtida por regressão linear. Neste último gráfico, estão apresentados os valores dos coeficientes de correlação (R), e quando estes forem entre - 0,900 e - 1,000, os valores de D, em unidade de horas.

Inicialmente, seguem os gráficos obtidos do desafio dos xampus sem conservantes (preparações 1 a 6) com *Staphylococcus aureus* pelo método rápido da regressão linear, sendo que cada figura apresenta duas curvas de morte ou duas retas, dependendo do tipo de gráfico, equivalente à preparação sem princípio ativo (preparações 1, 3 ou 5) e a sua correspondente preparação com cetoconazol (preparações 2, 4 ou 6).

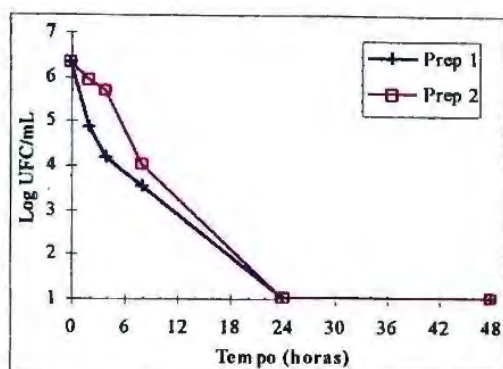


FIGURA 14 Curva de morte de *S. aureus* nos xampus sem conservante (preparações 1 e 2)

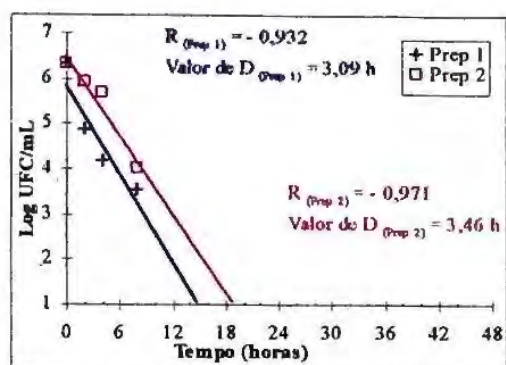


FIGURA 15 Retas de redução de *S. aureus* nos xampus sem conservantes (preparações 1 e 2)

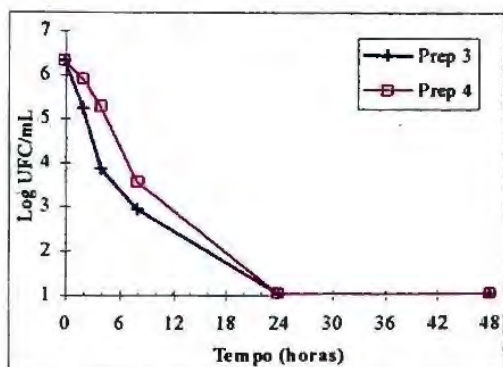


FIGURA 16 Curva de morte de *S. aureus* nos xampus sem conservante (preparações 3 e 4)

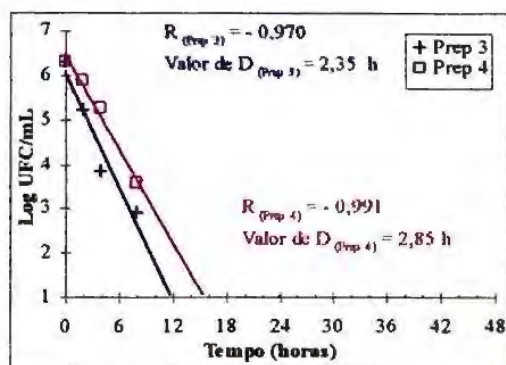


FIGURA 17 Retas de redução de *S. aureus* nos xampus sem conservantes (preparações 3 e 4)

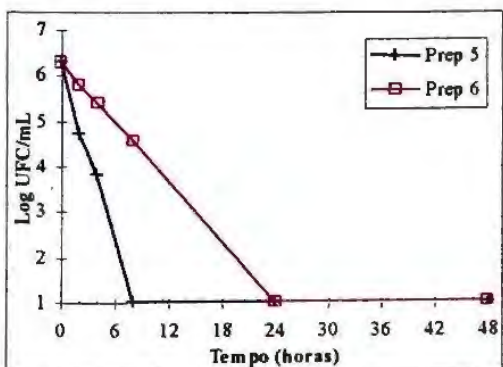


FIGURA 18 Curva de morte de *S. aureus* nos xampus sem conservante (preparações 5 e 6)

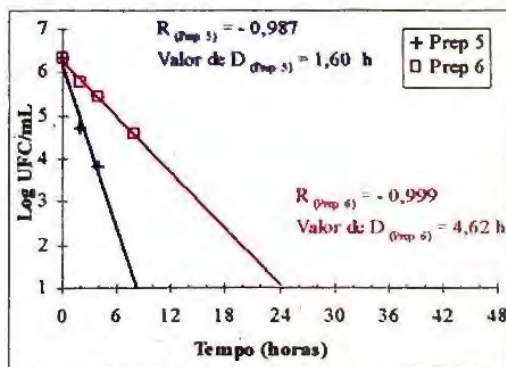


FIGURA 19 Retas de redução de *S. aureus* nos xampus sem conservantes (preparações 5 e 6)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus sem conservantes (preparações 1 a 6) com *Pseudomonas aeruginosa* pelo método rápido da regressão linear ⁹⁸.

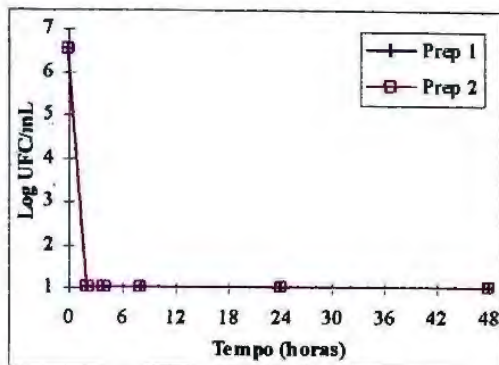


FIGURA 20 Curva de morte de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservante (preparações 1 e 2)

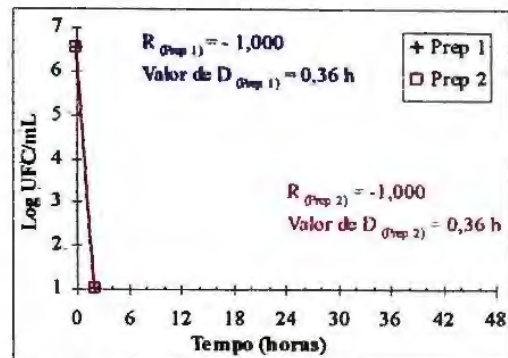


FIGURA 21 Retas de redução de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservantes (preparações 1 e 2)

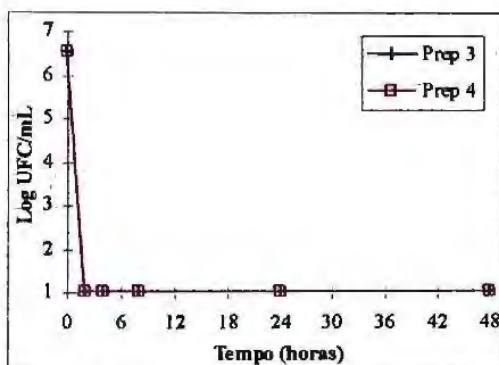


FIGURA 22 Curva de morte de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservante (preparações 3 e 4)

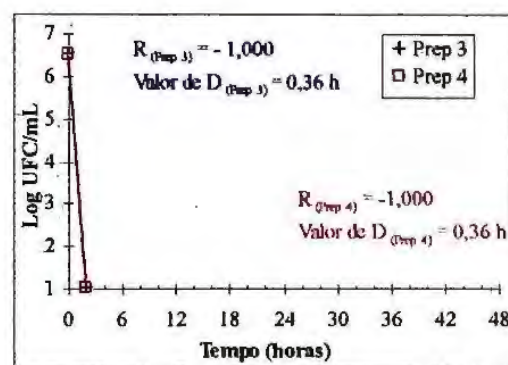


FIGURA 23 Retas de redução de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservantes (preparações 3 e 4)

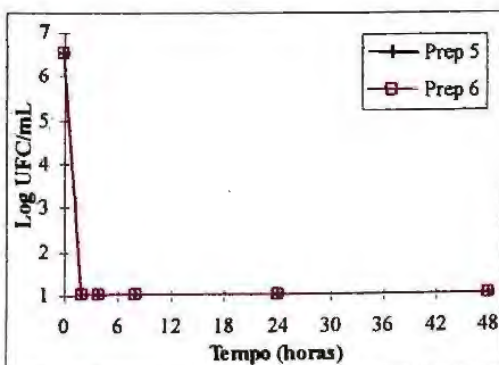


FIGURA 24 Curva de morte de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservantes (preparações 5 e 6)

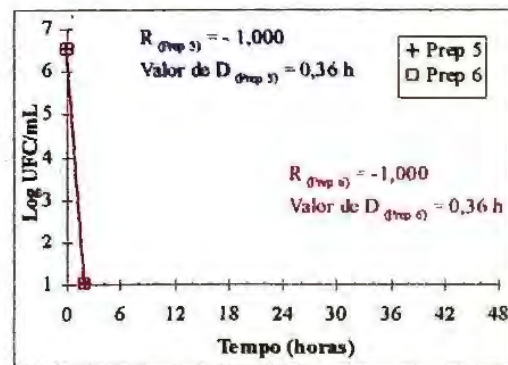


FIGURA 25 Retas de redução de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservantes (preparações 5 e 6)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus sem conservantes (preparações 1a 6) com *Pseudomonas cepacia* pelo método rápido da regressão linear⁹⁸.

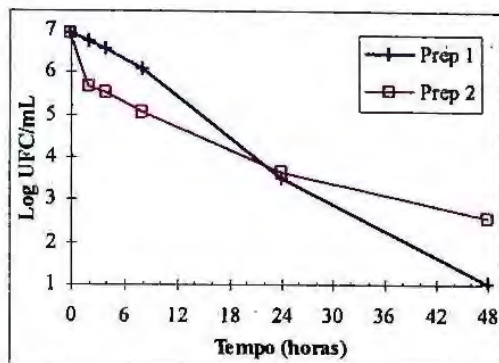


FIGURA 26 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus sem conservante (preparações 1 e 2)

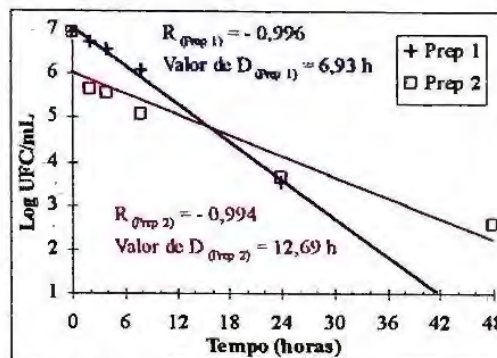


FIGURA 27 Retas de redução de *P. cepacia* nos xampus sem conservantes (preparações 1 e 2)

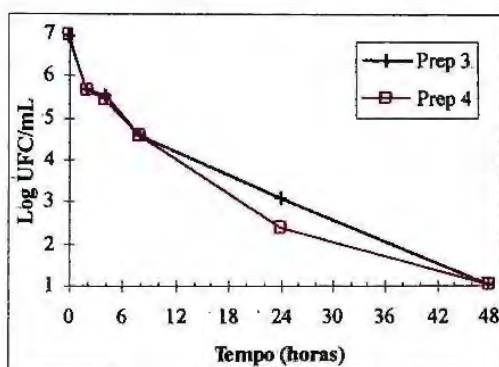


FIGURA 28 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus sem conservante (preparações 3 e 4)

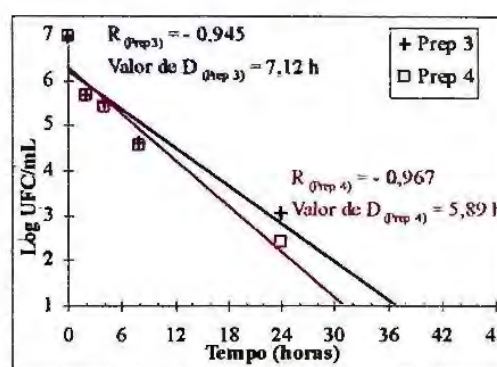


FIGURA 29 Retas de redução de *P. cepacia* nos xampus sem conservantes (preparações 3 e 4)

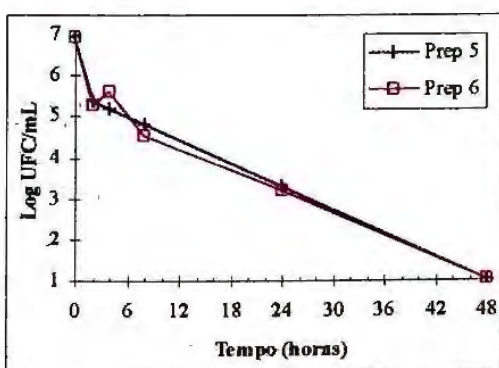


FIGURA 30 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus sem conservante (preparações 5 e 6)

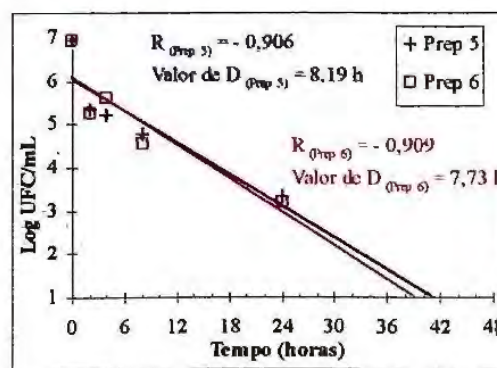


FIGURA 31 Retas de redução de *P. cepacia* nos xampus sem conservantes (preparações 5 e 6)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus sem conservantes (preparações 1a 6) com *Candida albicans* pelo método rápido da regressão linear ⁹⁸.

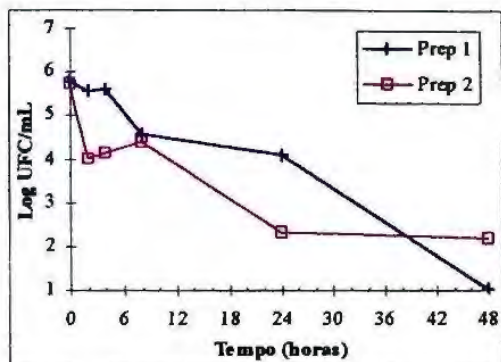


FIGURA 32 Curva de morte de *C. albicans* nos xampus sem conservante (preparações 1 e 2)

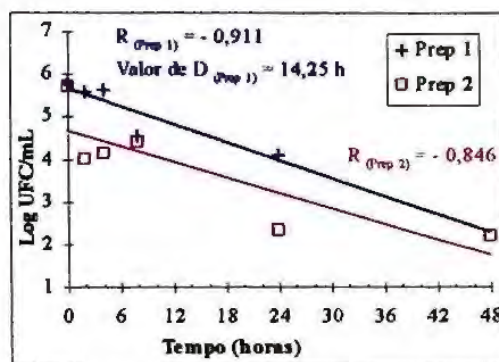


FIGURA 33 Reta de redução de *C. albicans* nos xampus sem conservantes (preparações 1 e 2)

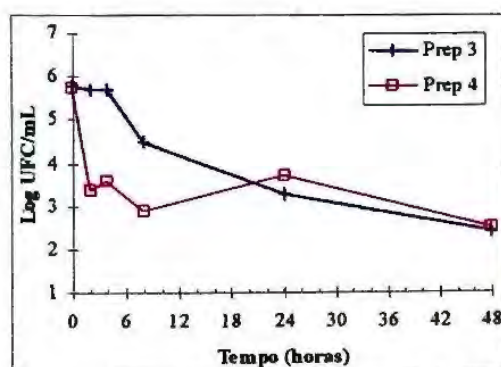


FIGURA 34 Curva de morte de *C. albicans* nos xampus sem conservante (preparações 3 e 4)

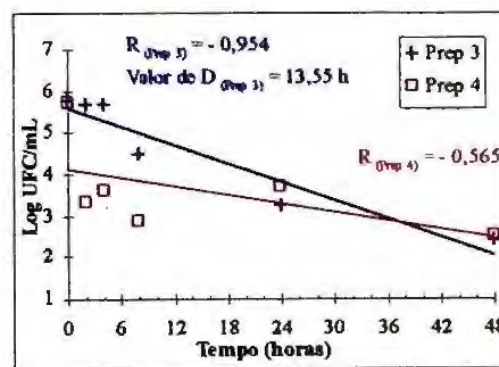


FIGURA 35 Reta de redução de *C. albicans* nos xampus sem conservantes (preparações 3 e 4)

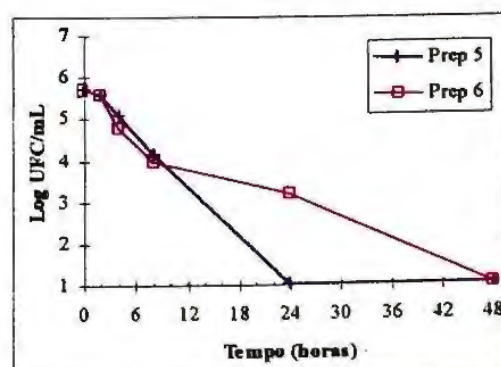


FIGURA 36 Curva de morte de *C. albicans* nos xampus sem conservante (preparações 5 e 6)

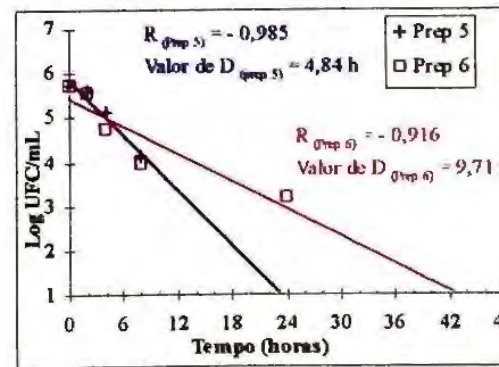


FIGURA 37 Reta de redução de *C. albicans* nos xampus sem conservantes (preparações 5 e 6)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus sem conservantes (preparações 1a 6) com *Aspergillus niger* pelo método rápido da regressão linear ⁹⁸.

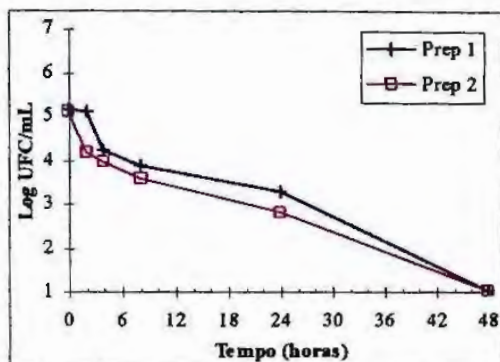


FIGURA 38 Curva de morte de *A. niger* nos xampus sem conservante (preparações 1 e 2)

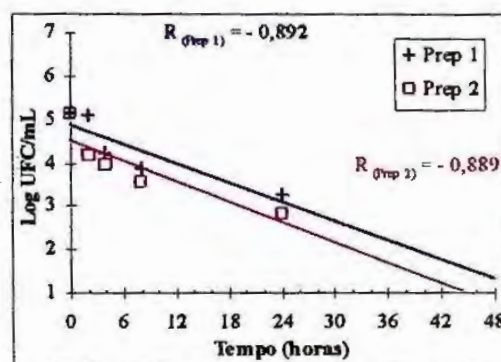


FIGURA 39 Reta de redução de *A. niger* nos xampus sem conservantes (preparações 1 e 2)

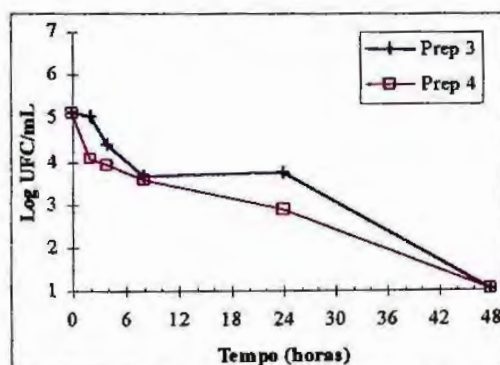


FIGURA 40 Curva de morte de *A. niger* nos xampus sem conservante (preparações 3 e 4)

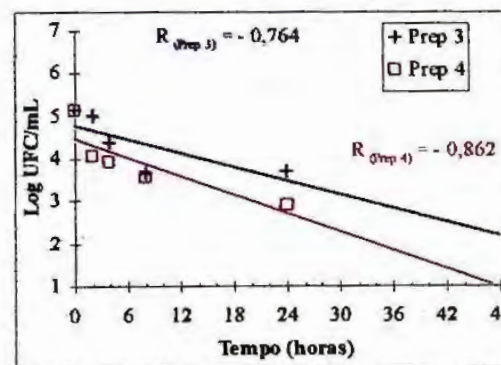


FIGURA 41 Reta de redução de *A. niger* nos xampus sem conservantes (preparações 3 e 4)

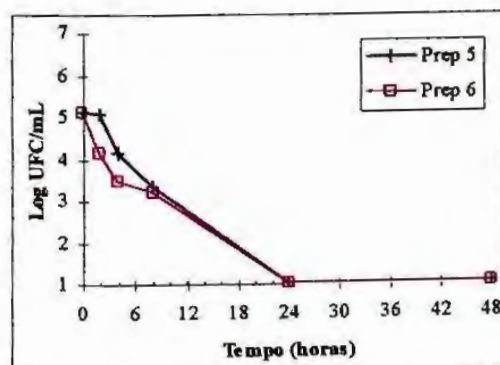


FIGURA 42 Curva de morte de *A. niger* nos xampus sem conservante (preparações 5 e 6)

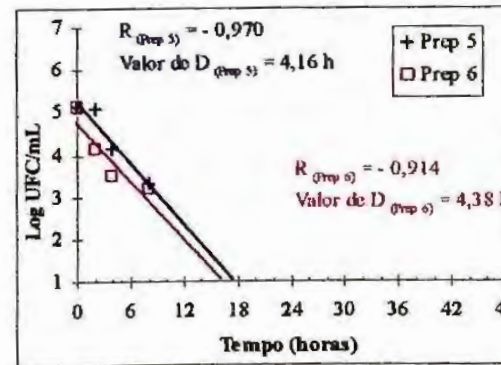


FIGURA 43 Reta de redução de *A. niger* nos xampus sem conservantes (preparações 5 e 6)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus sem conservantes (preparações 1a 6) com *Malassezia furfur* pelo método rápido da regressão linear ⁹⁸.

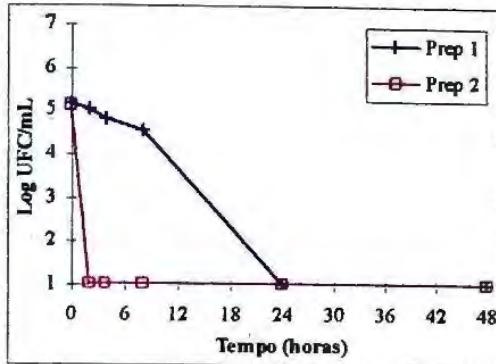


FIGURA 44 Curva de morte de *M. furfur* nos xampus sem conservante (preparações 1 e 2)

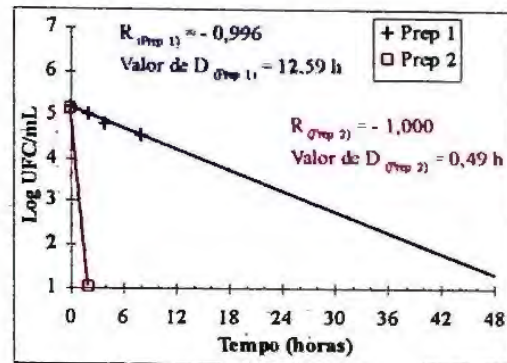


FIGURA 45 Reta de redução de *M. furfur* nos xampus sem conservantes (preparações 1 e 2)

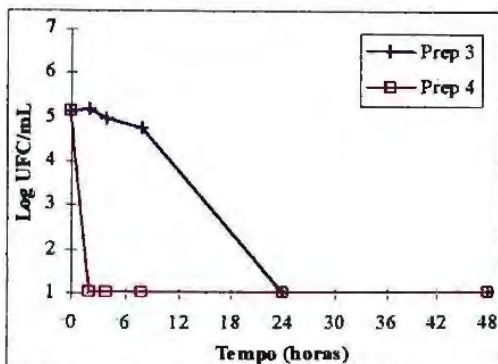


FIGURA 46 Curva de morte de *M. furfur* nos xampus sem conservante (preparações 3 e 4)

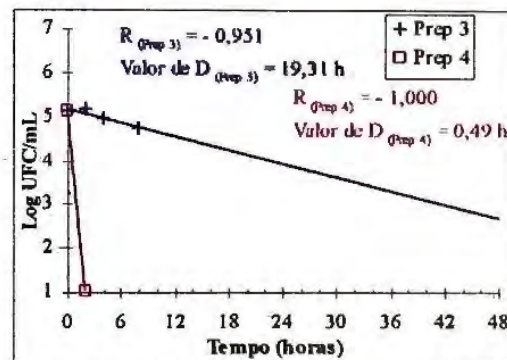


FIGURA 47 Reta de redução de *M. furfur* nos xampus sem conservantes (preparações 3 e 4)

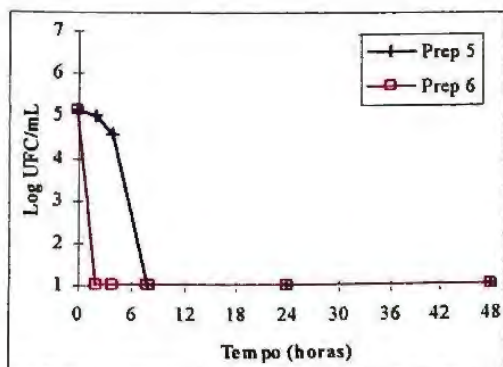


FIGURA 48 Curva de morte de *M. furfur* nos xampus sem conservante (preparações 5 e 6)

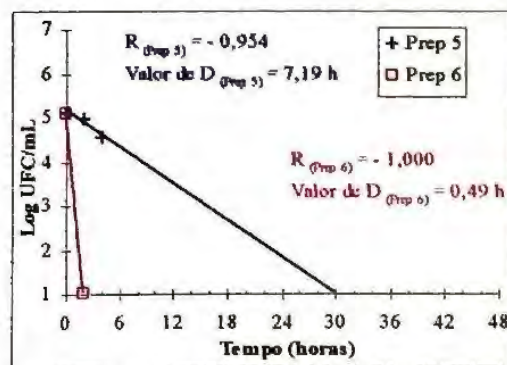


FIGURA 49 Reta de redução de *M. furfur* nos xampus sem conservantes (preparações 5 e 6)

Para comparação, os resultados obtidos nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6) desafiados com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Malassezia furfur*, estão dispostos nos gráficos abaixo.

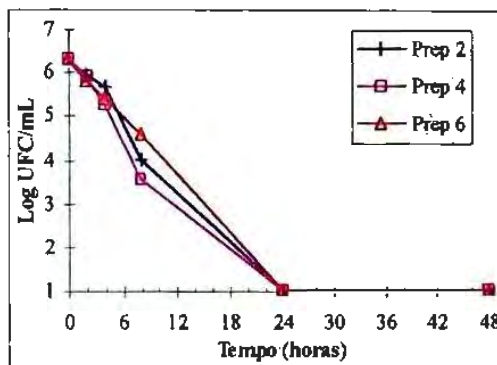


FIGURA 50 Curva de morte de *S. aureus* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

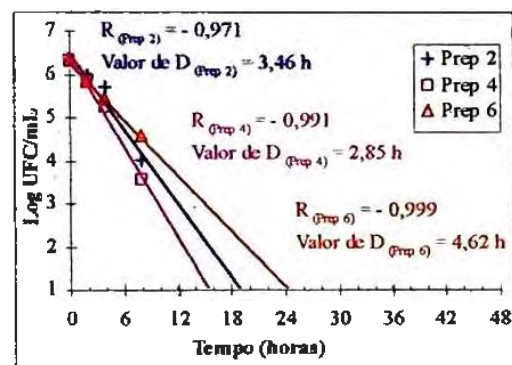


FIGURA 51 Reta de redução de *S. aureus* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

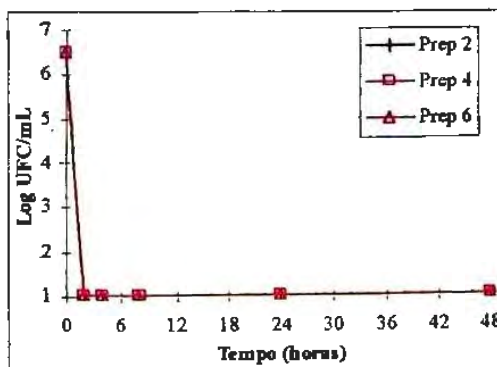


FIGURA 52 Curva de morte de *P. aeruginosa* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

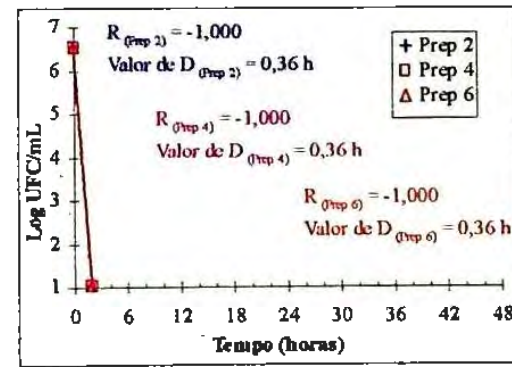


FIGURA 53 Reta de redução de *P. aeruginosa* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

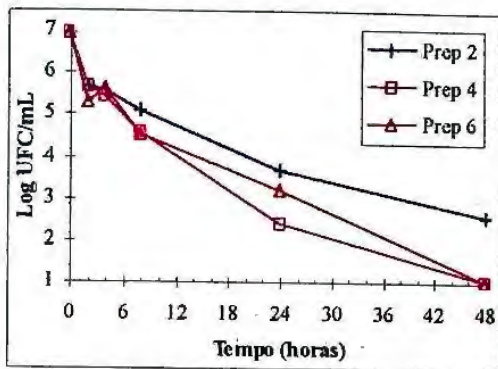


FIGURA 54 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

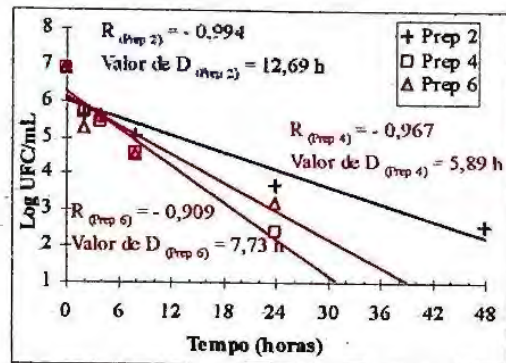


FIGURA 55 Retas de redução de *P. cepacia* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

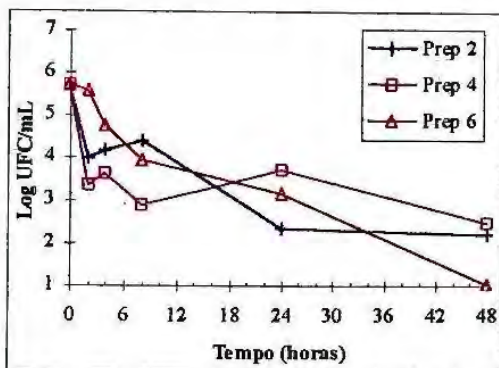


FIGURA 56 Curva de morte de *C. albicans* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

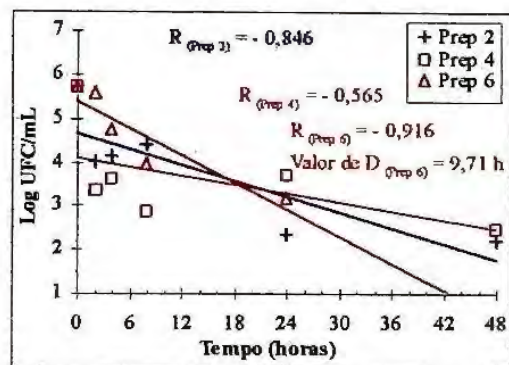


FIGURA 57 Retas de redução de *C. albicans* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

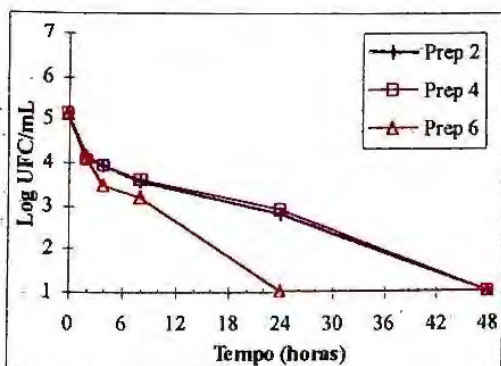


FIGURA 58 Curva de morte de *A. niger* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

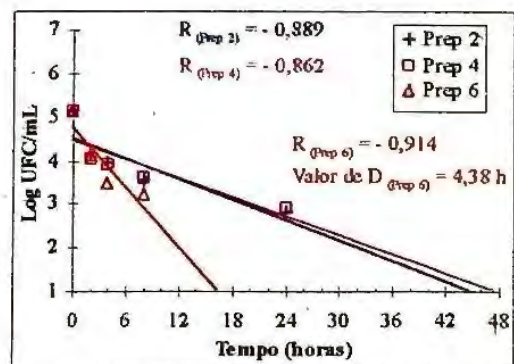


FIGURA 59 Retas de redução de *A. niger* nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

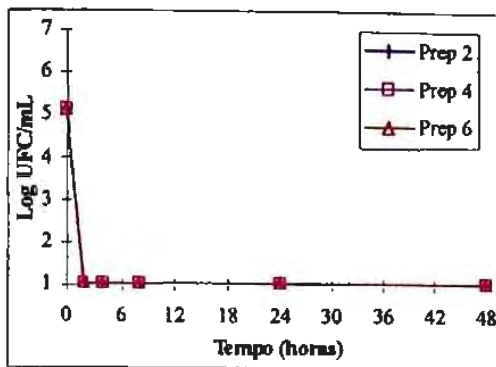


FIGURA 60 Curva de morte de *M. furfur* nos xampus com cetozonazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

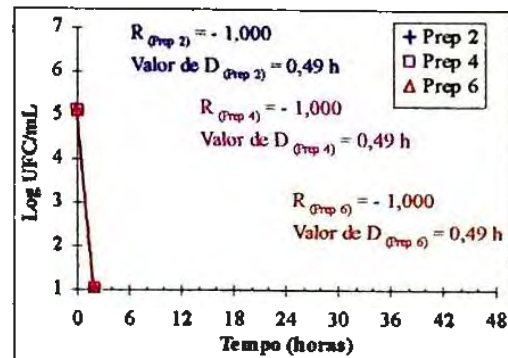


FIGURA 61 Reta de redução de *M. furfur* nos xampus com cetozonazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6)

5.1.2.2 Teste de desafio pelo método oficial

As figuras seguintes representam os gráficos das curvas de morte dos microrganismos desafiados, em relação ao tempo. As cargas microbianas presentes estão indicadas em UFC/mL de amostra, e os intervalos de tempo em horas, desde T_{zero} até T_{29dias} .

Foram apresentados os gráficos comparativos das preparações dos xampus com e sem cetozonazol, para cada microrganismo. Em seguida, os gráficos comparativos apenas das preparações de xampu com cetozonazol.

Inicialmente, seguem os gráficos obtidos do desafio dos xampus sem conservantes (preparações 1 a 6) com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Malassezia furfur*.

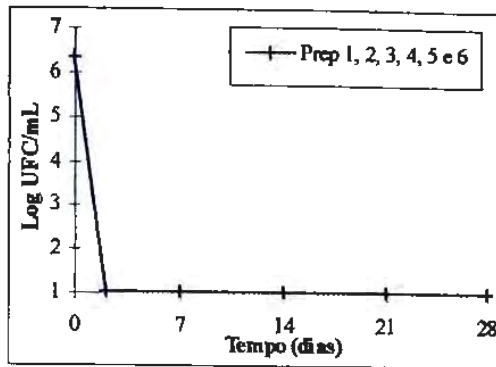


FIGURA 62 Curva de morte de *S. aureus* nos xampus sem conservante (preparações 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

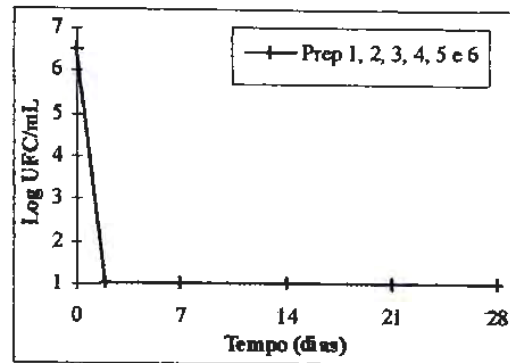


FIGURA 63 Curva de morte de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservante (preparações 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

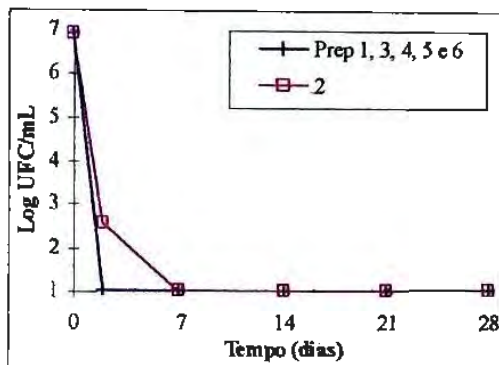


FIGURA 64 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus sem conservante (preparações 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

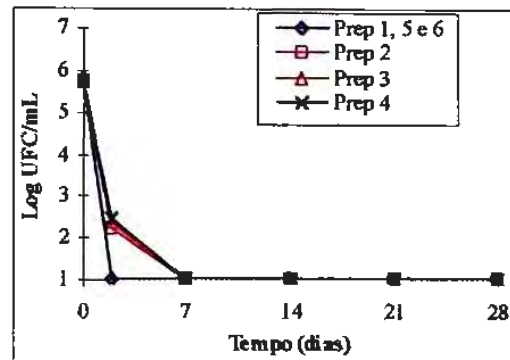


FIGURA 65 Curva de morte de *C. albicans* nos xampus sem conservante (preparações 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

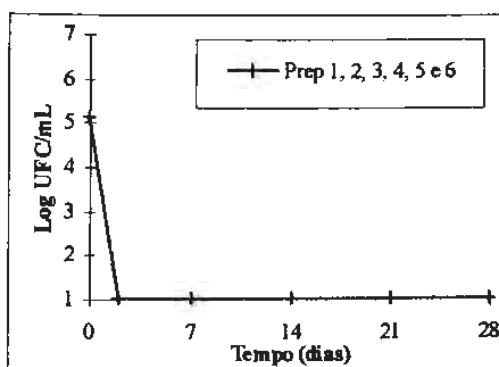


FIGURA 66 Curva de morte de *A. niger* nos xampus sem conservante (preparações 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

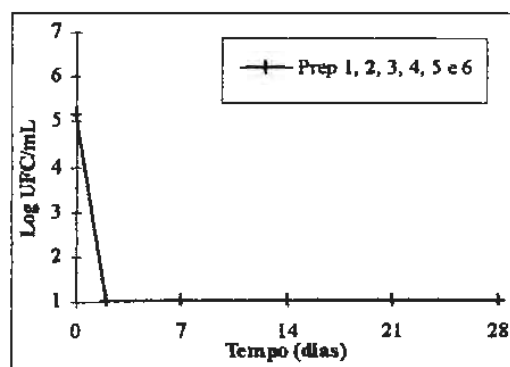


FIGURA 67 Curva de morte de *M. furfur* nos xampus sem conservante (preparações 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

Os dados obtidos nos xampus com cetoconazol e sem conservantes (preparações 2, 4 e 6) desafiados com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Malassezia furfur* pelo método oficial da BP93²¹ e do CTFA³² estão ilustrados abaixo, para comparação.

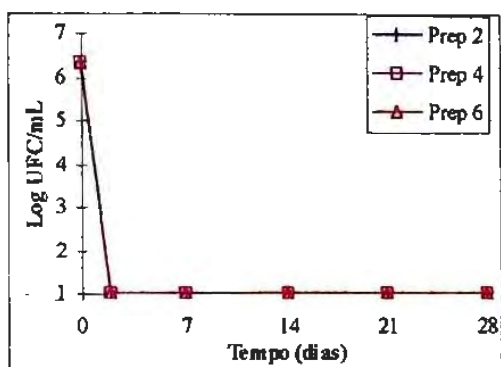


FIGURA 68 Curva de morte de *S. aureus* nos xampus sem conservante (preparações 2, 4 e 6)

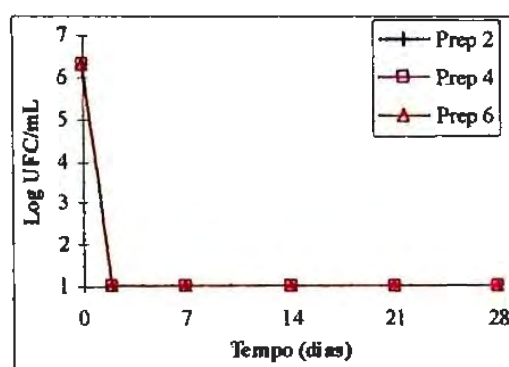


FIGURA 69 Curva de morte de *P. aeruginosa* nos xampus sem conservante (preparações 2, 4 e 6)

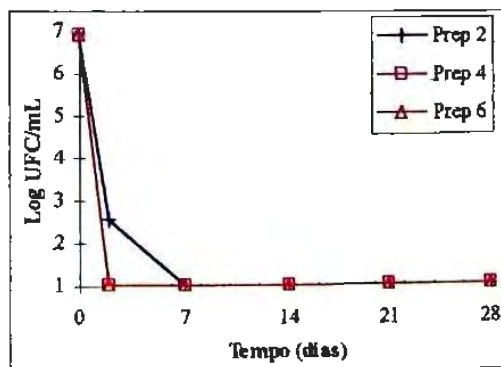


FIGURA 70 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus sem conservante (preparações 2, 4 e 6)

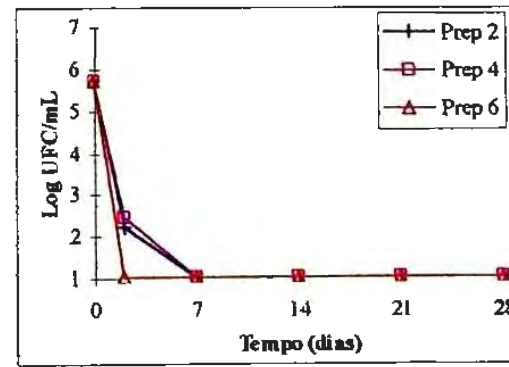


FIGURA 71 Curva de morte de *C. albicans* nos xampus sem conservante (preparações 2, 4 e 6)

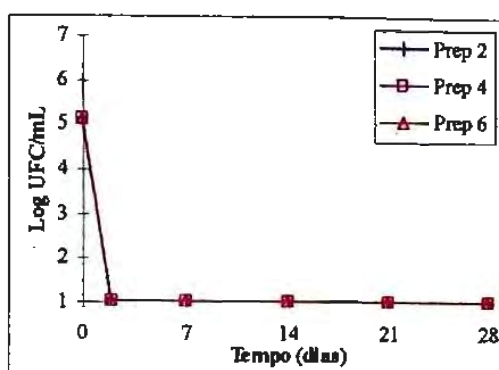


FIGURA 72 Curva de morte de *A. niger* nos xampus sem conservante (preparações 2, 4 e 6)

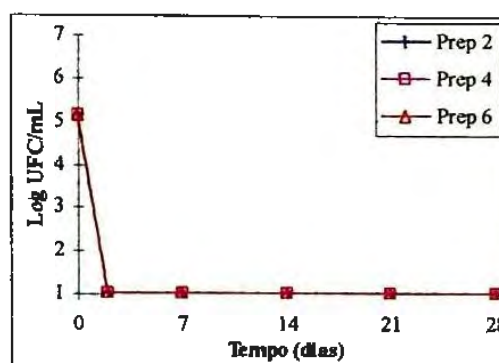


FIGURA 73 Curva de morte de *M. furfur* nos xampus sem conservante (preparações 2, 4 e 6)

5.1.2.3 Teste do uso

5.1.2.3.1 Quantificação da carga contaminante

A preparação 2 de xampu apresentou uma carga contaminante de microrganismos viáveis de $1,08 \times 10^8$ UFC/mL.

5.1.2.3.2 Identificação do microrganismo contaminante

O microrganismo foi identificado como *Serratia marcescens*.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE CONSERVANTES

5.2.1 Teste de desafio pelo método da regressão linear

As figuras seguintes representam os gráficos das curvas de morte dos microrganismos em relação ao tempo, desafiados pelo método da regressão linear ⁹⁸. As cargas microbianas presentes estão indicadas em UFC/mL de amostra, e os intervalos de tempo em horas, desde T_{zero} até $T_{48horas}$ ou T_{2dias} . Em todas as figuras Sc1 = 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol 0,050%, Sc2 = 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano 0,050%, Sc3 = imidazolidinil uréia 0,300%, Sc4 = diazolidinil uréia 0,250%, Sc5 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,250%, Sc6 = metilparabeno 0,200%, Sc7 = Fenoxietanol associado a 1,2dibromo-2,4-dicianobutano 0,050%.

Os desafios das soluções aquosas dos conservantes com os microrganismos *Pseudomonas cepacia* e *Serratia marcescens* foram apresentados na forma de pares de gráficos, representando a curva de morte e a reta de redução, obtida por regressão linear. Neste último tipo, apresentando-se valores dos coeficientes de correlação (R), e quando estes forem entre - 0,900 e - 1,000, os valores de D, em unidade de horas.

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio das soluções aquosas de conservantes (Sc1 a Sc7) com *Pseudomonas cepacia* pelo método rápido da regressão linear ⁹⁸.

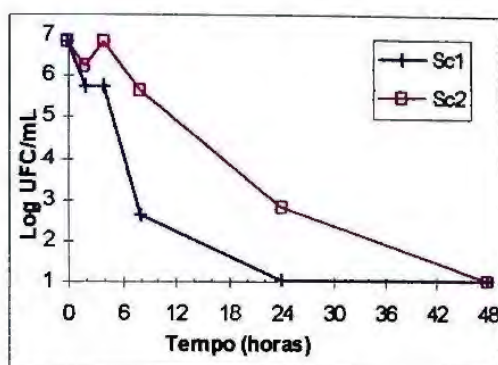


FIGURA 74 Curva de morte de *P. cepacia* nas soluções de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Sc1) e 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05% (Sc2)

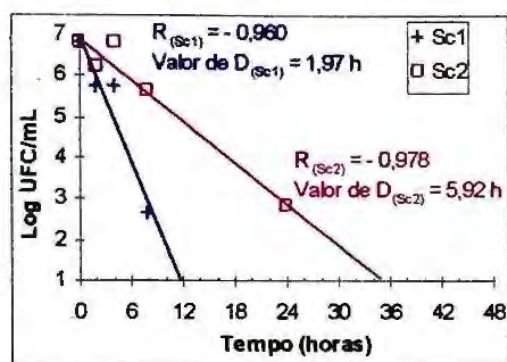


FIGURA 75 Reta de redução de *P. cepacia* nas soluções de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Sc1) e 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05% (Sc2)

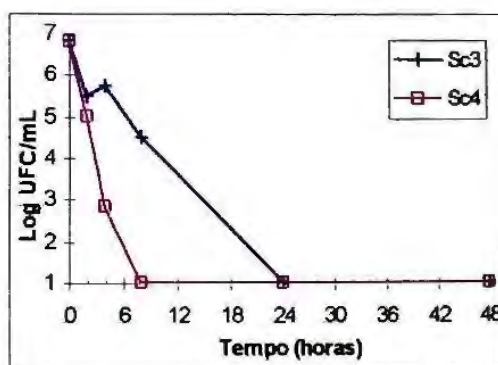


FIGURA 76 Curva de morte de *P. cepacia* nas soluções de imidazolidinil uréia a 0,30% (Sc3) e diazolidinil uréia a 0,25% (Sc4)

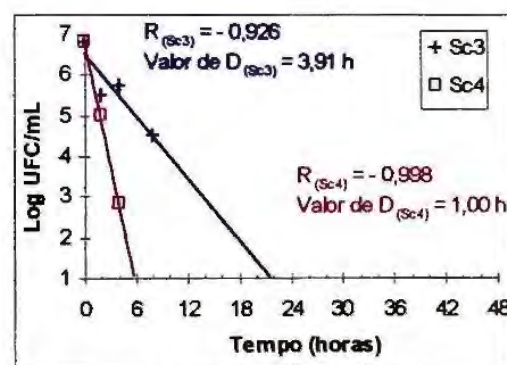


FIGURA 77 Reta de redução de *P. cepacia* nas soluções de imidazolidinil uréia a 0,30% (Sc3) e diazolidinil uréia a 0,25% (Sc4)

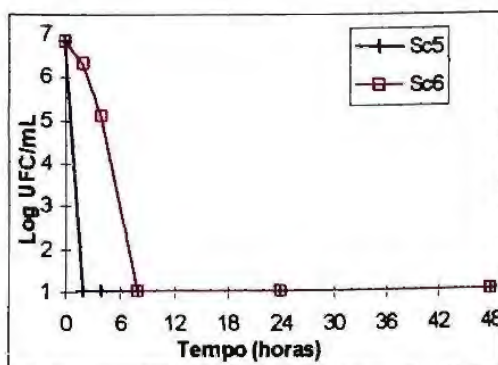


FIGURA 78 Curva de morte de *P. cepacia* nas soluções de hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Sc5) e metilparabeno a 0,20% (Sc6)

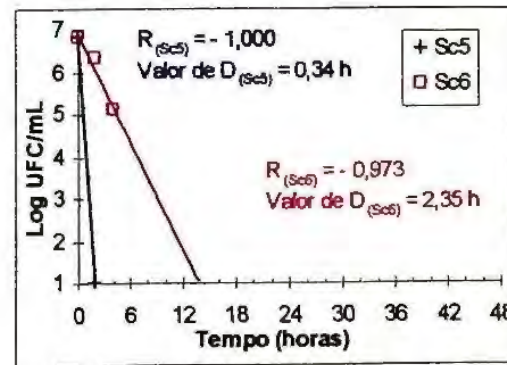


FIGURA 79 Reta de redução de *P. cepacia* nas soluções de hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Sc5) e metilparabeno a 0,20% (Sc6)

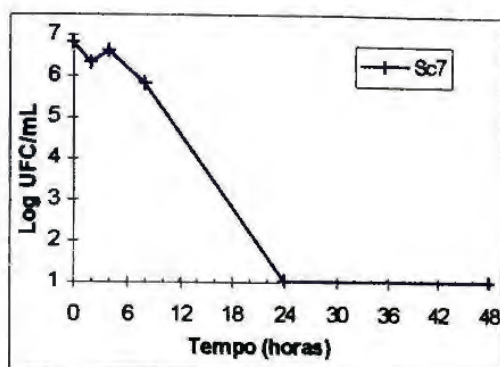


FIGURA 80 Curva de morte de *P. cepacia* na solução de fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Sc7)

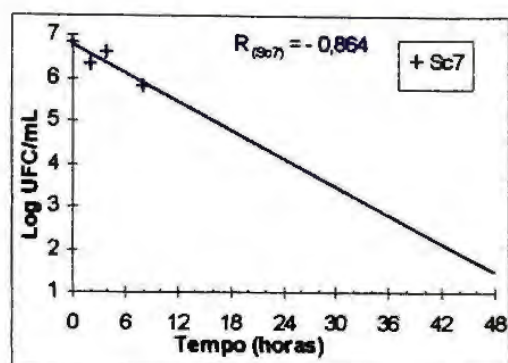


FIGURA 81 Reta de redução de *P. cepacia* na solução de fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Sc7)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio das soluções aquosas de conservantes (Sc1 a Sc7) com *Serratia marcescens* pelo método rápido da regressão Linear ⁹⁸.

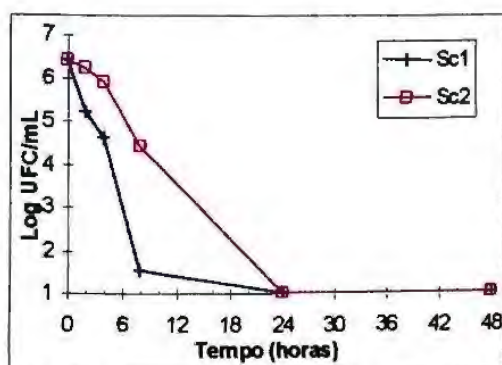


FIGURA 82 Curva de morte de *Serratia marcescens* nas soluções de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Sc1) e 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05% (Sc2)

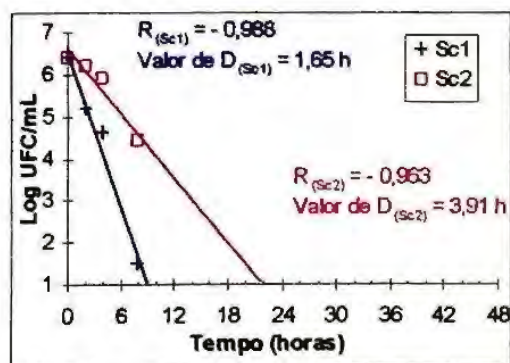


FIGURA 83 Reta de redução de *Serratia marcescens* nas soluções de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Sc1) e 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05% (Sc2)

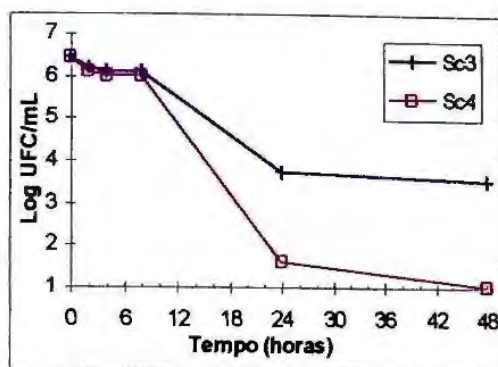


FIGURA 84 Curva de morte de *Serratia marcescens* nas soluções de imidazolidinil uréia a 0,30% (Sc3) e diazolidinil uréia a 0,25% (Sc4)

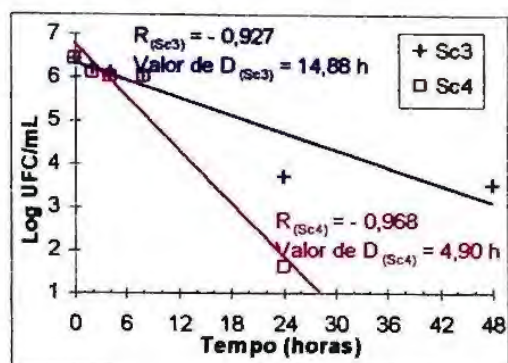


FIGURA 85 Retas de redução de *Serratia marcescens* nas soluções de imidazolidinil uréia a 0,30% (Sc3) e diazolidinil uréia a 0,25% (Sc4)

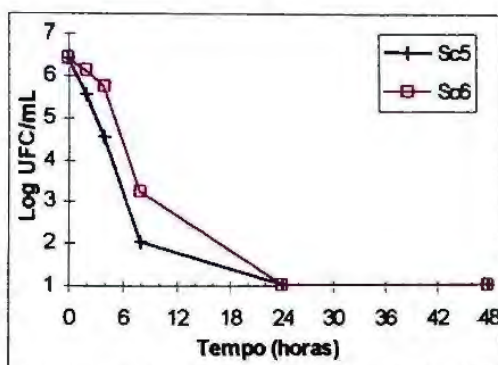


FIGURA 86 Curva de morte de *Serratia marcescens* nas soluções de hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Sc5) e metilparabeno a 0,20% (Sc6)

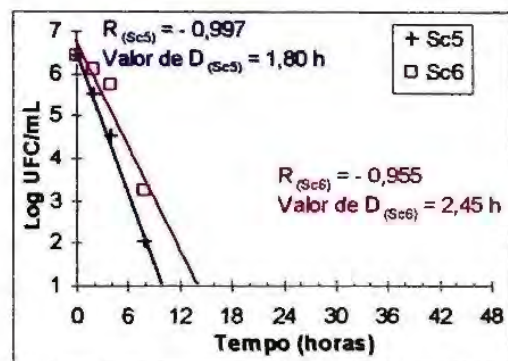


FIGURA 87 Retas de redução de *Serratia marcescens* nas soluções de hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Sc5) e metilparabeno a 0,20% (Sc6)

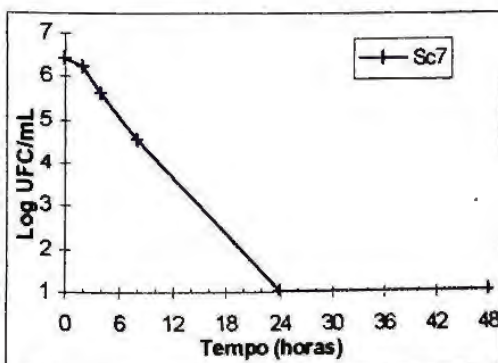


FIGURA 88 Curva de morte de *Serratia marcescens* na solução de fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Sc7)

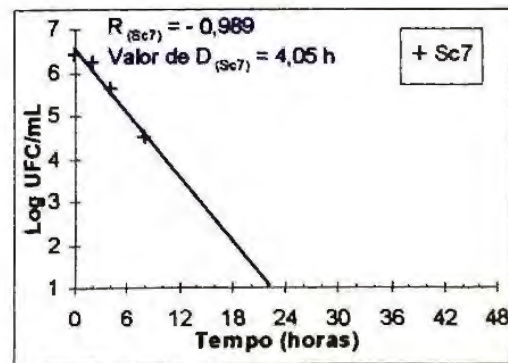


FIGURA 89 Retas de redução de *Serratia marcescens* na solução de fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Sc7)

5.2.2 Teste de desafio pelo método oficial

As figuras seguintes representam os gráficos das curvas de morte dos microrganismos desafiados, em relação ao tempo. As cargas microbianas presentes estão indicadas em UFC/mL de amostra, e os intervalos de tempo em horas, desde T_{zero} até T_{28dias} . Em todas as figuras Sc1 = 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol 0,050%, Sc2 = 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano 0,050%, Sc3 = imidazolidinil uréia 0,300%, Sc4 = diazolidinil uréia 0,250%, Sc5 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,250%, Sc6 = metilparabeno 0,200%, Sc7 = Fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,050%.

Seguem abaixo os gráficos do desafio das soluções aquosas de conservantes (Sc1 a Sc7) com *Pseudomonas cepacia* e *Serratia marcescens* pelo método oficial da BP93²¹ e do CTFA³².

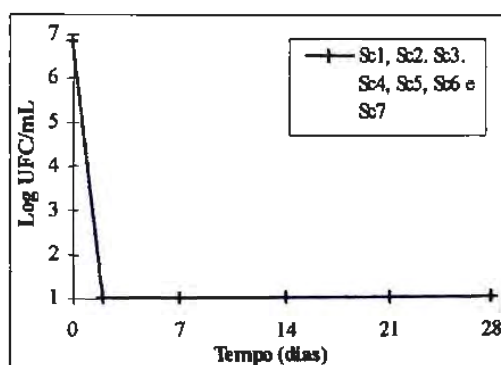


FIGURA 90 Curva de morte de *P. cepacia* nas soluções de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Sc1), 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05% (Sc2), imidazolidinil uréia a 0,30% (Sc3), diazolidinil uréia a 0,25% (Sc4), hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Sc5), metilparabeno a 0,20% (Sc6) e fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Sc7)

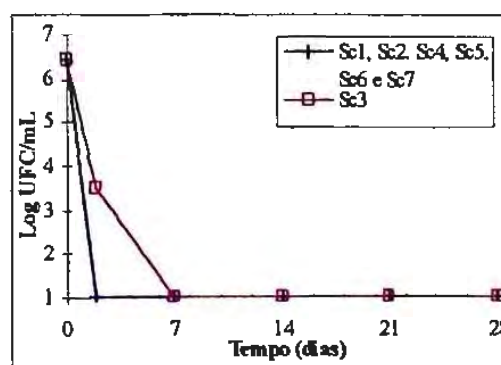


FIGURA 91 Curva de morte de *S. marcescens* nas soluções de 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Sc1), 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05% (Sc2), imidazolidinil uréia a 0,30% (Sc3), diazolidinil uréia a 0,25% (Sc4), hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Sc5), metilparabeno a 0,20% (Sc6) e fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Sc7)

5.3 XAMPUS ADICIONADOS DE CONSERVANTES OU ÁCIDO SALICÍLICO

5.3.1 Análise físico-química dos xampus

As concentrações de cetoconazol nas preparações 20, 22 e 24, nos diferentes tempos, encontram-se na tabela XIII.

TABELA XIII Concentração de cetoconazol das preparações 20, 22 e 24 de xampu, nos tempos 0, 30, 60, e 180 dias após o preparo, armazenados à temperatura ambiente

Tempo (dias)	Concentração (g/100 mL)		
	20	22	24
0	1,850 ($\pm 0,012$)	2,000 ($\pm 0,007$)	1,888 ($\pm 0,031$)
30	1,988 ($\pm 0,037$)	2,090 ($\pm 0,034$)	1,878 ($\pm 0,003$)
60	2,097 ($\pm 0,066$)	2,178 ($\pm 0,019$)	1,989 ($\pm 0,084$)
180	2,102 ($\pm 0,031$)	2,042 ($\pm 0,055$)	1,885 ($\pm 0,057$)

Anova com $p = 0,236$

5.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.3.2.1 Teste de desafio pelo método da regressão linear

As figuras seguintes representam os gráficos das curvas de morte dos microrganismos desafiados, em relação ao tempo. As cargas microbianas presentes estão indicadas em UFC/mL de amostra, e os intervalos de tempo em horas, desde T_{zero} até $T_{48horas}$ ou T_{2dias} . Em todas as figuras, as preparações analisadas correspondem ao xampu da preparação 2 adicionada de várias concentrações de conservantes ou ácido salicílico, recebendo a seguinte identificação: Prep 7 = 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol 0,050%, Prep 8 = 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol 0,025%, Prep 9 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,250%, Prep 10 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,125%, Prep 11 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,500%, Prep 12 = metilparabeno 0,200%, Prep 13 = metilparabeno 0,300%, Prep 14 = metilparabeno 0,400%, Prep 15 = metilparabeno 0,180% associado a propilparabeno 0,020%, Prep 16 = metilparabeno 0,16% associado a propilparabeno 0,04%, Prep 17 = fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,050%, Prep 18 = fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,025%, Prep 25 = ácido salicílico 0,25%, Prep 26 = ácido salicílico 0,50%, Prep 27 = ácido salicílico 0,75%, Prep 28 = ácido salicílico 1,00%, Prep 29 = ácido salicílico 1,25%, Prep 30 = ácido salicílico 1,50%, Prep 31 = ácido salicílico 1,75%, Prep 32 = ácido salicílico 2,00%.

Foram apresentados os gráficos comparativos das preparações de xampus adicionados dos conservantes c1, c5, c6, c6+c9, c7 e ácido salicílico em várias concentrações para cada microrganismo.

Para cada desafio de microrganismo em cada preparação são apresentados dois gráficos: primeiro o da curva de morte e, ao lado, o da reta de redução, obtida por regressão linear. Neste último gráfico, estão apresentados os valores dos coeficientes de correlação (R), e quando estes maiores que -0,90, os valores de D, em unidade de horas.

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus adicionados de conservantes (preparações 7 a 10, 12, 15 a 18 e 25 a 32) com *Pseudomonas cepacia* pelo método rápido da regressão linear⁹⁸.

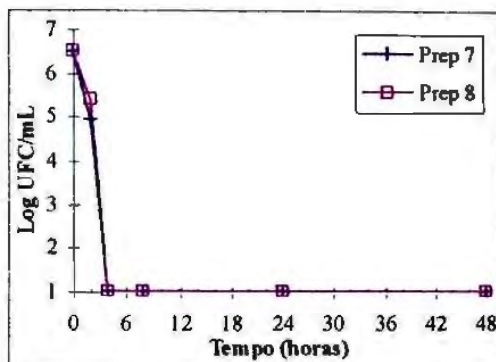


FIGURA 92 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Prep 7) e a 0,025% (Prep 8)

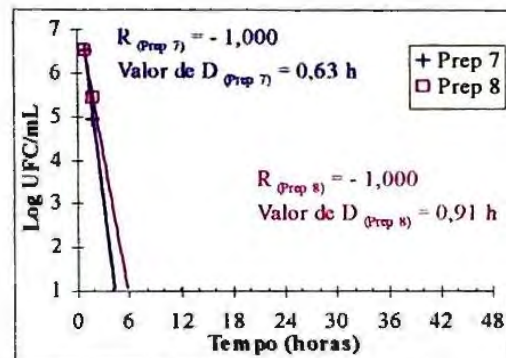


FIGURA 93 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Prep 7) e a 0,025% (Prep 8)

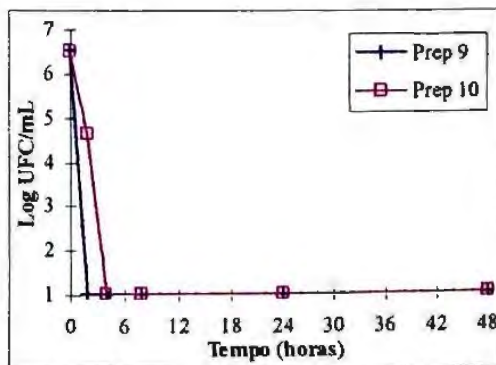


FIGURA 94 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Prep 9) e a 0,125% (Prep 10)

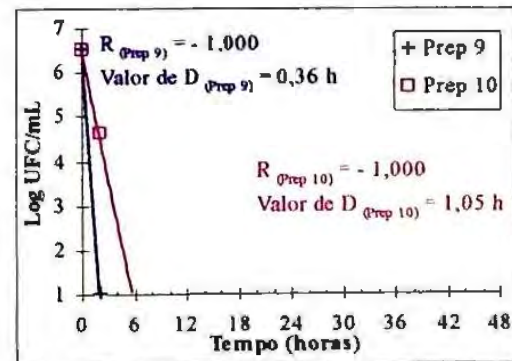


FIGURA 95 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Prep 9) e a 0,125% (Prep 10)

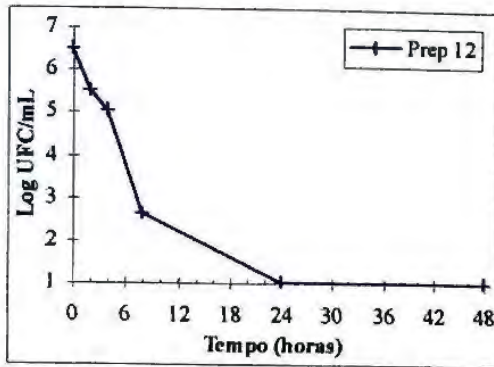


FIGURA 96 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com metilparabeno a 0,20% (Prep 12)

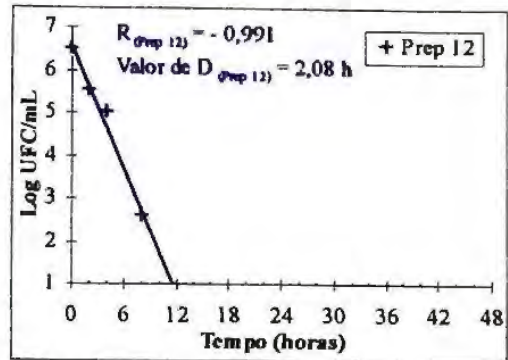


FIGURA 97 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com metilparabeno a 0,20% (Prep 12)

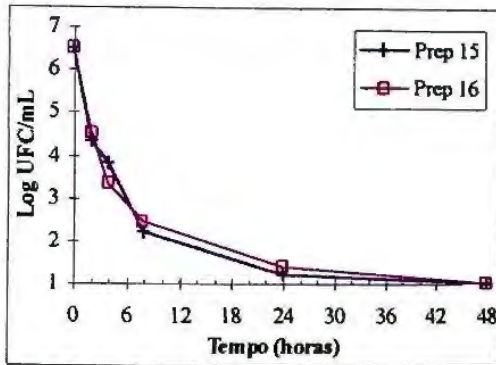


FIGURA 98 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com metilparabeno a 0,18% e a 0,16% associado ao propilparabeno a 0,02% e a 0,04% (Prep 15 e 16)

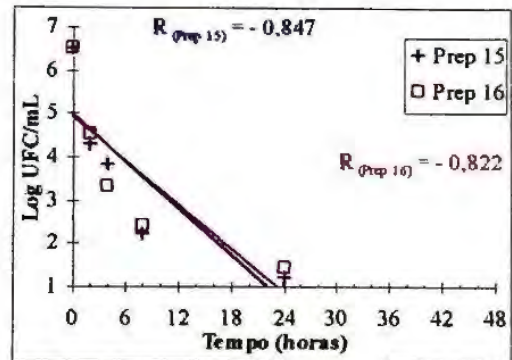


FIGURA 99 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com metilparabeno a 0,18% e a 0,16% associado ao propilparabeno a 0,02% e a 0,04% (Prep 15 e 16)

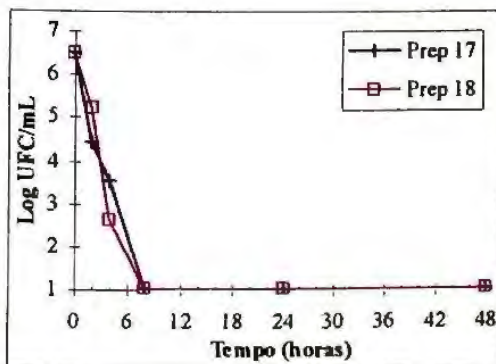


FIGURA 100 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Prep 17) e a 0,025% (Prep 18)

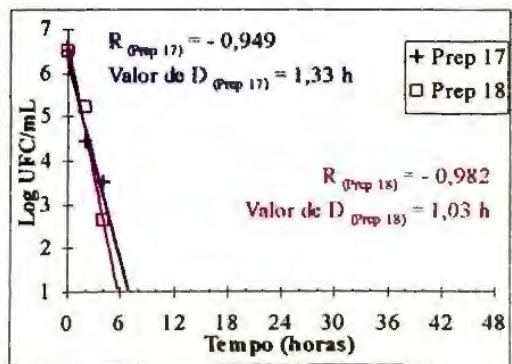


FIGURA 101 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Prep 17) e a 0,025% (Prep 18)

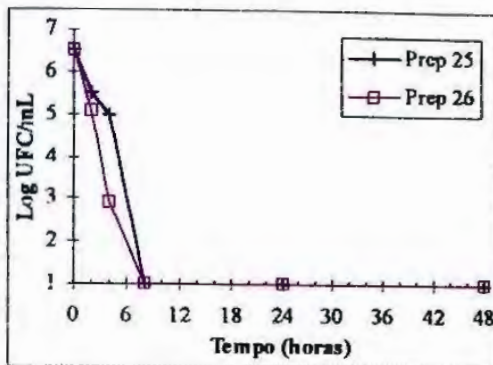


FIGURA 102 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 0,25% (Prep 25) e 0,50% (Prep 26)

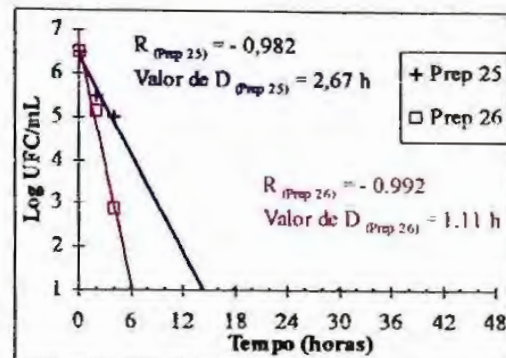


FIGURA 103 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 0,25% (Prep 25) e 0,50% (Prep 26)

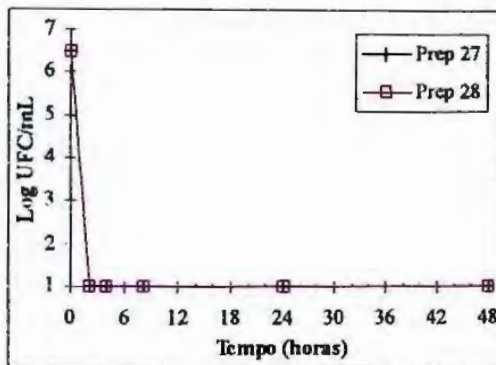


FIGURA 104 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 0,75% (Prep 27) e 1,00% (Prep 28)

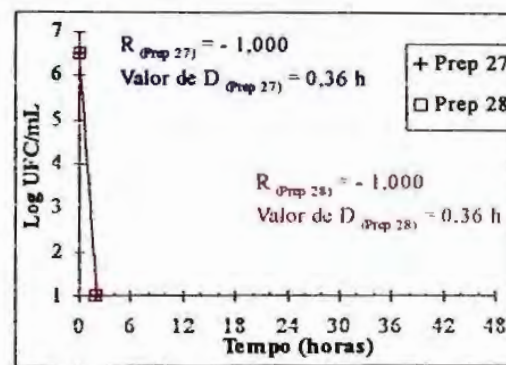


FIGURA 105 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 0,75% (Prep 27) e 1,00% (Prep 28)

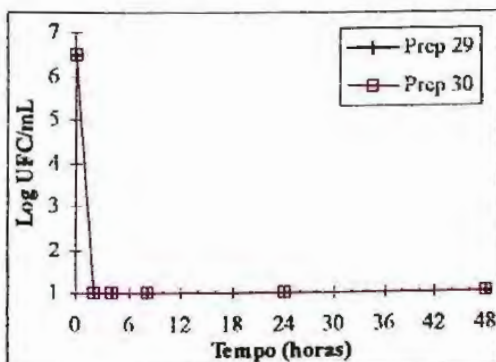


FIGURA 106 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 1,25% (Prep 29) e 1,50% (Prep 30)

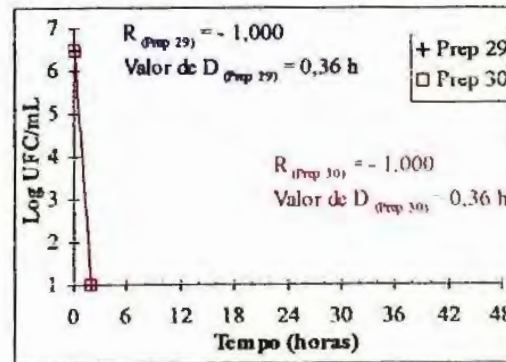


FIGURA 107 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 1,25% (Prep 29) e 1,50% (Prep 30)

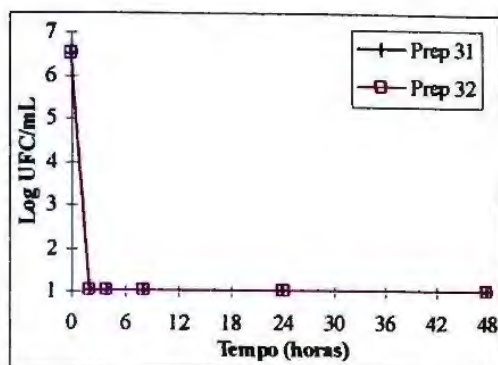


FIGURA 108 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 1,75% (Prep 31) e 2,00% (Prep 32)

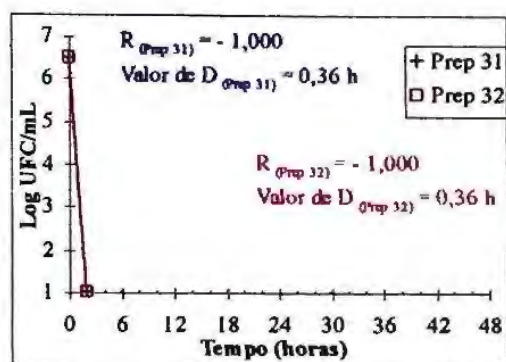


FIGURA 109 Reta de redução de *P. cepacia* nos xampus com ácido salicílico a 1,75% (Prep 31) e 2,00% (Prep 32)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus adicionados de conservantes (preparações 7 a 18 e 25 a 32) com *Serratia marcescens* pelo método rápido⁹⁸.

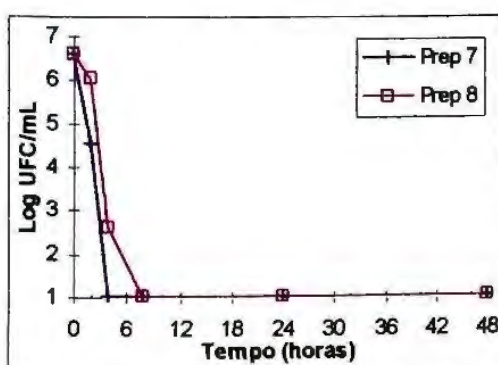


FIGURA 110 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Prep 7) e a 0,025% (Prep 8)

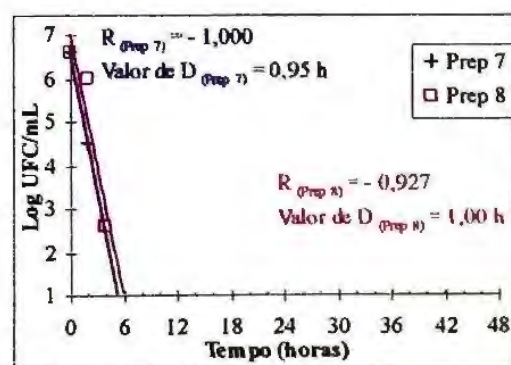


FIGURA 111 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Prep 7) e a 0,025% (Prep 8)

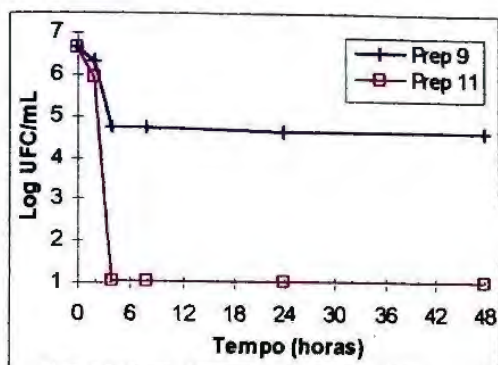


FIGURA 112 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Prep 9) e a 0,50% (Prep 11)

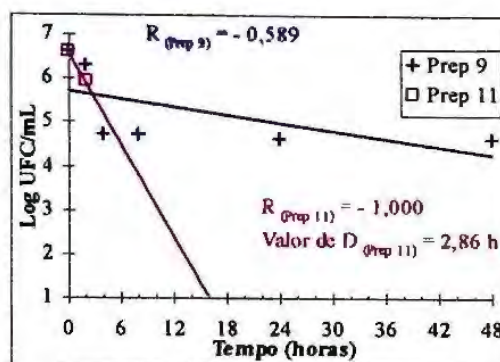


FIGURA 113 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Prep 9) e a 0,50% (Prep 11)

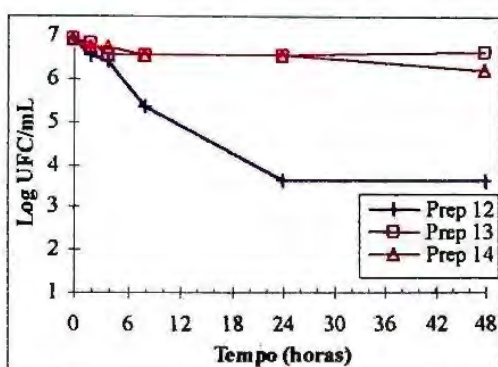


FIGURA 114 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com metilparabeno a 0,20% (Prep 12), a 0,30% (Prep 13) e a 0,40% (Prep 14)

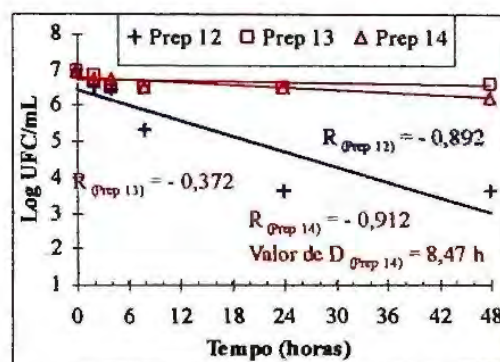


FIGURA 115 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com metilparabeno a 0,20% (Prep 12), a 0,30% (Prep 13) e a 0,40% (Prep 14)

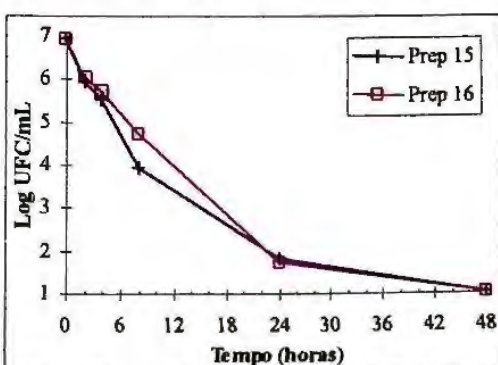


FIGURA 116 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com metilparabeno a 0,18% e a 0,16% associado ao propilparabeno a 0,02% e a 0,04% (Prep 15 e 16)

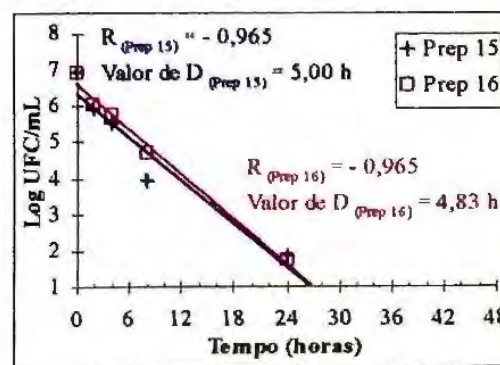


FIGURA 117 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com metilparabeno a 0,18% e a 0,16% associado ao propilparabeno a 0,02% e a 0,04% (Prep 15 e 16)

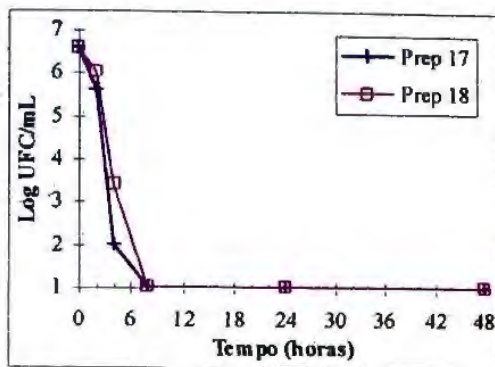


FIGURA 118 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Prep 17) e a 0,025% (Prep 18)

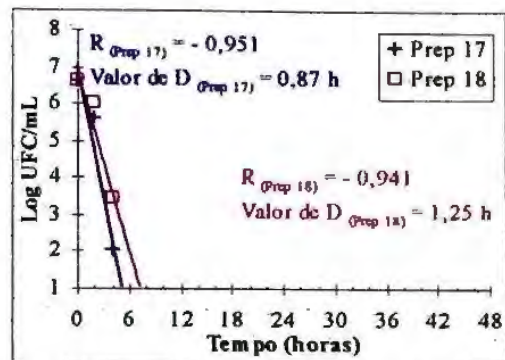


FIGURA 119 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Prep 17) e a 0,025% (Prep 18)

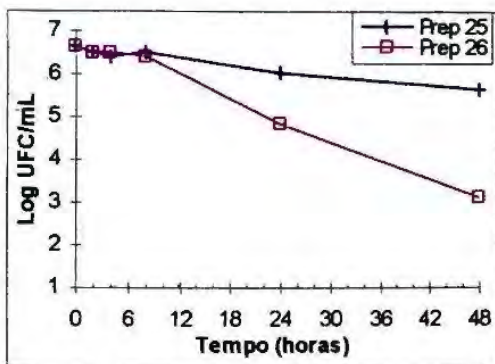


FIGURA 120 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 0,25% (Prep 25) e 0,50% (Prep 26)

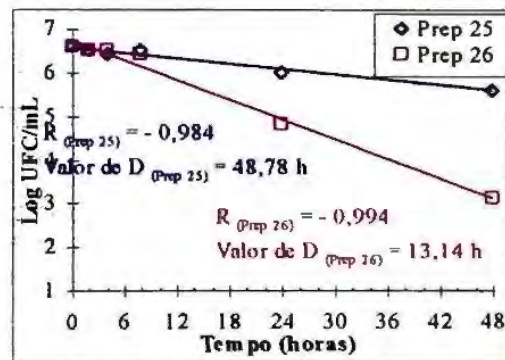


FIGURA 121 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 0,25% (Prep 25) e 0,50% (Prep 26)

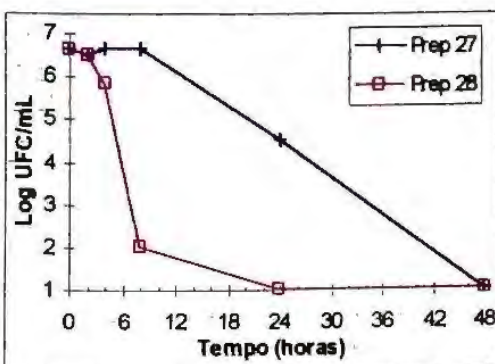


FIGURA 122 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 0,75% (Prep 27) e 1,00% (Prep 28)

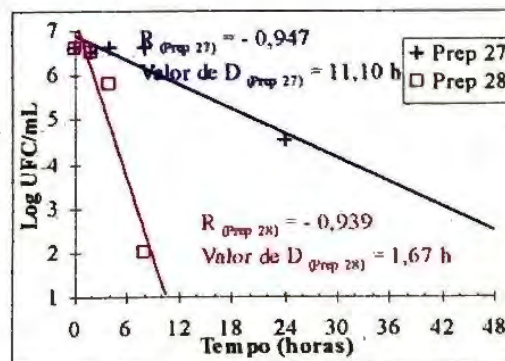


FIGURA 123 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 0,75% (Prep 27) e 1,00% (Prep 28)

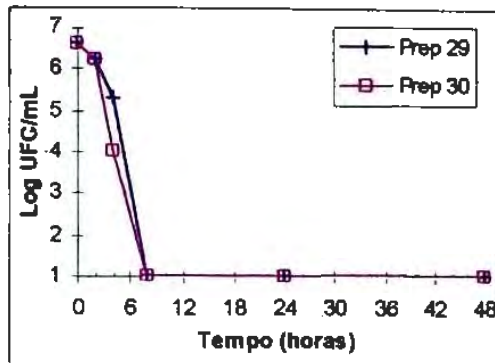


FIGURA 124 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 1,25% (Prep 29) e 1,50% (Prep 30)

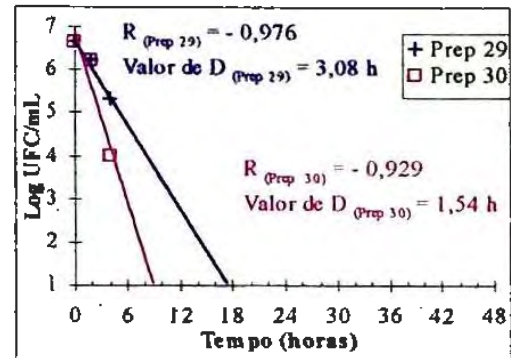


FIGURA 125 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 1,25% (Prep 29) e 1,50% (Prep 30)

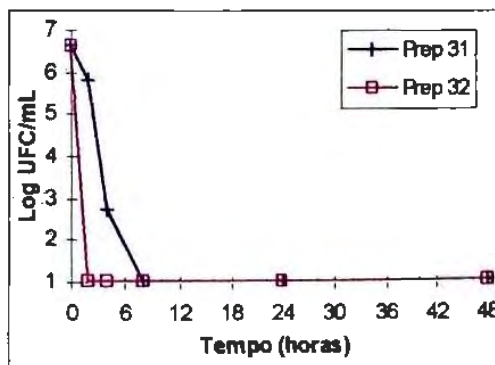


FIGURA 126 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 1,75% (Prep 31) e 2,00% (Prep 32)

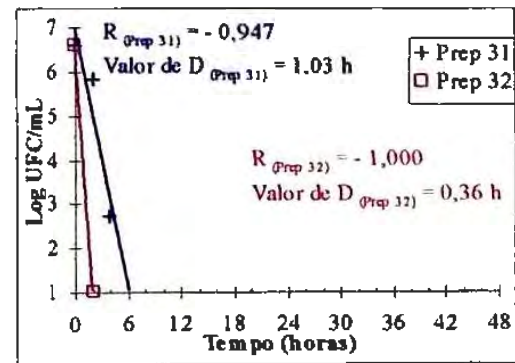


FIGURA 127 Reta de redução de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 1,75% (Prep 31) e 2,00% (Prep 32)

5.3.2.2 Teste de desafio pelo método oficial

As figuras seguintes representam os gráficos das curvas de morte dos microrganismos desafiados, em relação ao tempo. As cargas microbianas presentes estão indicadas em UFC/mL de amostra, e os intervalos de tempo em horas, desde T_{zero} até $T_{28\text{dias}}$. Em todas as figuras, as preparações analisadas correspondem a preparação 2 adicionada de várias concentrações de conservantes ou ácido salicílico, recebendo a seguinte identificação: Prep 7 = 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol 0,050%, Prep 8 = 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol 0,025%, Prep 9 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,250%, Prep 10 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,125%, Prep 11 = hidroximetilglicinato de Sódio 0,500%, Prep 12 = metilparabeno 0,200%, Prep 13 = metilparabeno 0,300%, Prep 14 = metilparabeno 0,400%, Prep 15 = metilparabeno 0,180% associado a propilparabeno 0,020%, Prep 16 = metilparabeno 0,16% associado a propilparabeno 0,04%, Prep 17 = fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,050%, Prep 18 = fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,025%, Prep 25 = ácido salicílico 0,25%, Prep 26 = ácido salicílico 0,50%, Prep 27 = ácido salicílico 0,75%, Prep 28 = ácido salicílico 1,00%, Prep 29 = ácido salicílico 1,25%, Prep 30 = ácido salicílico 1,50%, Prep 31 = ácido salicílico 1,75%, Prep 32 = ácido salicílico 2,00%.

Foram apresentados os gráficos comparativos das preparações de xampus adicionados dos conservantes c1, c5, c6, c6+c9, c7 e ácido salicílico em várias concentrações para cada microrganismo.

O gráfico abaixo representa o comportamento, no teste de desafio, de todos os xampus adicionados de conservantes (preparações 7 a 10, 12, 15 a 18 e 25 a 32) frente a *Pseudomonas cepacia*, pelo método oficial da BP93²¹ e do CTFA³².

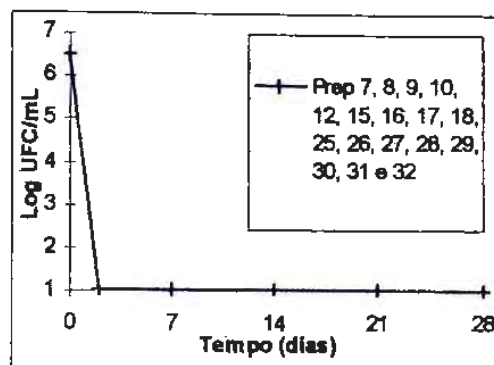


FIGURA 128 Curva de morte de *P. cepacia* nos xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Prep 7) e a 0,025% (Prep 8), hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Prep 9) e a 0,125% (Prep 10), metilparabeno a 0,20% (Prep 12), metilparabeno a 0,18% e 0,16% + propilparabeno 0,02% e 0,04% (Prep 15 e 16), fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Prep 17) e a 0,025% (Prep 18), ácido salicílico a 0,25% (Prep 25), a 0,50% (Prep 26), a 0,75% (Prep 27), a 1,00% (Prep 28), a 1,25% (Prep 29), a 1,50% (Prep 30), a 1,75% (Prep 31) e a 2,00% (Prep 32)

Seguem abaixo os gráficos obtidos do desafio dos xampus adicionados de conservantes (preparações 7 a 18 e 25 a 32) com *Serratia marcescens* pelo método oficial da BP93²¹ e do CTFA³².

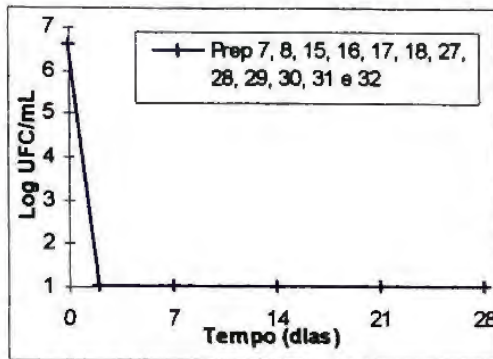


FIGURA 129 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Prep 7) e a 0,025% (Prep 8), metilparabeno a 0,18% e 0,16% + propilparabeno 0,02% e 0,04% (Prep 15 e 16), fenoxietanol + 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% (Prep 17) e a 0,025% (Prep 18), ácido salicílico a 0,75% (Prep 27), a 1,00% (Prep 28), a 1,25% (Prep 29), a 1,50% (Prep 30), a 1,75% (Prep 31) e a 2,00% (Prep 32)

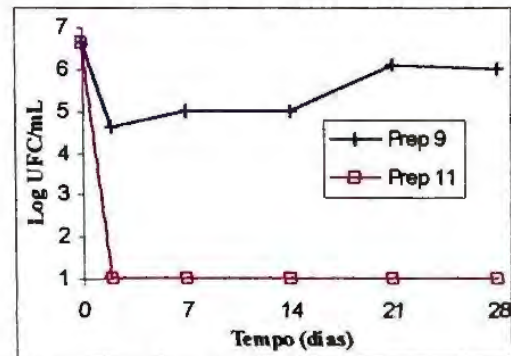


FIGURA 130 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Prep 9) e a 0,5% (Prep 11)

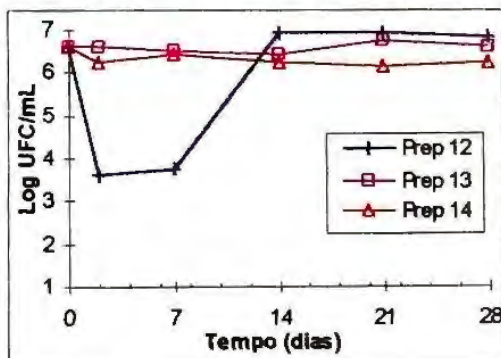


FIGURA 131 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com metilparabeno a 0,20% (Prep 12), a 0,30% (Prep 13) e a 0,40% (Prep 14)

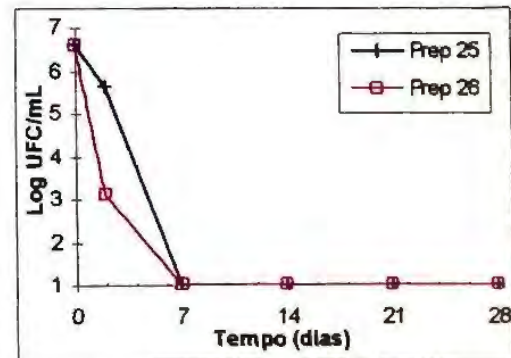


FIGURA 132 Curva de morte de *S. marcescens* nos xampus com ácido salicílico a 0,25% (Prep 25) e a 0,50% (Prep 26)

5.3.2.3 Teste do uso

As preparações 20, 22 e 24 de xampu não sofreram contaminação de microrganismos no teste.

6 DISCUSSÃO

6.1 FORMULAÇÃO DO XAMPUS

O cetoconazol é utilizado para o tratamento da caspa, geralmente, incorporado ao xampu. Na concentração de até 1% é considerado cosmético e a 2% como medicamento²⁰. Existem no mercado, xampus contendo esse princípio ativo a 2% produzido por indústrias farmacêuticas, entretanto, a solicitação de produto manipulado é muito freqüente.

A fórmula base do xampu proposto para o estudo foi a convencional, contendo dois tensoativos detergentes e um sobregordurante. A função do dois primeiros tensoativos é remover a gordura, sebo oxidado e sujeira do couro cabeludo, como restos celulares e as próprias escamas soltas da caspa^{57, 16}, sem contudo tornar o cabelo ressecado. A associação do lauril éter sulfato de sódio (LESS) e lauril sulfato de trietanolamina (LSTEA), que apresentam respectivamente alto e baixo poder de detergência visou a obtenção de xampu quimicamente menos agressivo. A função do sobregordurante é fornecer uma nova camada de gordura para envolver o fio de cabelo, evitando assim o seu ressecamento.

O cetoconazol é pouco solúvel em água, razão pela qual foi dissolvido em solução aquosa de ácido cítrico 10% à temperatura de 50 °C, com agitação constante, antes de ser adicionado a mistura de tensoativos. O ácido cítrico auxilia a dissolução pois o cetoconazol é uma base fraca²⁵.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS XAMPUS SEM CONSERVANTE

6.2.1 Teste do desafio

Algumas matérias-primas de uso farmacêutico ou cosmético podem conter conservantes.

Ao lado de conservantes presentes nas matérias-primas, princípios ativos antimicrobianos, além de outros componentes como por exemplo o álcool, glicerina e propilenoglicol, também favorecem a proteção do produto contra a contaminação microbiana. A somatória da atividade destas substâncias constitui o sistema conservante do produto. Conseqüentemente, na formulação de qualquer produto antes da inclusão de conservante deve-se avaliar a sua real necessidade. Para isto, a avaliação da atividade antimicrobiana prévia do produto é recomendável antes do estudo que definirá qual o conservante e a concentração mais adequada.

No caso de xampus, os tensoativos são as matérias-primas que geralmente contém conservantes. Entretanto, não são declaradas a identidade e nem a concentração destas substâncias. Segundo informação de um fornecedor, geralmente, o formaldeído na concentração de 0,2% é utilizado para essa finalidade. Esta informação pode ser confirmada pelo trabalho de ROSEN e McFARLAND ¹¹⁷ que detectou formaldeído em concentrações acima de 0,0005% em xampus, que segundo os autores pode ser proveniente de matérias-primas ou são compostos resultantes da hidrólise de conservantes. WALLHAUSSER ¹³⁸ citou o uso desse conservante nas concentrações de 0,1 a 0,2%.

Supondo-se que a informação do fornecedor seja verdadeira, a proporção de formaldeído nos xampus preparados neste trabalho é de cerca de 0,056%, considerando a proporção de tensoativos e sobrenegordurantes na fórmula como de 28%. Esta concentração equivale a 4 vezes a

concentração mínima inibitória (MIC) determinada contra *Pseudomonas cepacia*¹³⁸.

Tendo em vista que a ação desses conservantes presentes nas matérias-primas contribui para a atividade antimicrobiana do produto formulado, inicialmente, foram preparadas amostras de xampu base sem o princípio ativo, utilizando os mesmos tensoativos, porém de diferentes fornecedores. Empregaram-se aqueles disponíveis no mercado.

A atividade antimicrobiana destas amostras foi avaliada pelo teste de desafio frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Malassezia furfur*. Estes, com exceção de *Pseudomonas cepacia* e *Malassezia furfur*, são os microrganismos recomendados pelos códigos oficiais para a execução do teste, em produtos de uso tópico. As duas bactérias, representando Gram positivas e negativas, uma levedura e um bolor. No caso de xampus, a inclusão de *Pseudomonas aeruginosa* no estudo é fundamental, uma vez que o produto pode entrar em contato com os olhos, e sabe-se que este microrganismo está associado à infecções graves nos olhos^{78, 81}, além da capacidade de sobrevivência em meios agressivos e pobres em nutrientes^{44, 81}. O *Pseudomonas cepacia* foi incluído no estudo pela alta resistência desta bactéria a substâncias conservantes, e também pelo fato de ter sido isolado freqüentemente em produtos farmacêuticos e cosméticos^{81, 142}. Justifica-se a inclusão de *Malassezia furfur* por ser o agente associado a caspa, e como o produto em estudo é um anticaspa, supõe-se que o usuário do produto é portador do microrganismo, podendo, portanto, contaminar o produto com este durante o uso. Além disso, os dados deste estudo forneceria informações sobre a ação da base do xampu sobre o próprio microrganismo associado a caspa, agindo assim em sinergismo com o princípio ativo.

Pelos dados obtidos do teste de desafio das 3 amostras sem cetozonazol, preparações 1, 3 e 5, analisados pelo valor de D, verifica-se que a ação contra bactérias são semelhantes para as 3 preparações

(Figuras 21, 23, 25, 27, 29 e 31), com exceção da 5, frente a *Staphylococcus aureus* que resultou em valor de 1,60, enquanto as outras duas de 3,09 e 2,35 horas (Figuras 15, 17, 19). A mesma preparação também diferiu quanto a ação fungistática que foi maior que as outras preparações. Os valores de D para *Candida albicans* e *Malassezia furfur* foram respectivamente para as três preparações: 14,25 e 12,59 (preparação 1, nas Figuras 33 e 45); 13,55 e 19,31 (preparação 3, nas Figuras 35 e 47); 4,84 e 7,19 (preparação 5, nas Figuras 37 e 49). O comportamento do *Aspergillus niger* não pode ser comparado nas 3 preparações pelo valor de D, pois esses não foram calculados nas preparações 1 e 3 (coeficiente de correlação da reta menor que [0,9]. Entretanto, a comparação das curvas de morte (Figura 38, 40 e 42) mostra que são semelhantes nas preparações 1 e 3, com redução do número de viáveis para menor que 10UFC/ml em 48 horas, enquanto que na preparação 5 a redução foi mais rápida, obtendo-se o mesmo dado em 24 horas. Estes dados mostram que os tensoativos dos dois primeiros fornecedores (A e B) apresentam atividade antimicrobiana semelhante. Pode-se deduzir que essas matérias-primas contém o mesmo tipo de conservante e em concentrações próximas ou que a atividade antimicrobiana observada é decorrente da própria agressividade da preparação, podendo não se ter a presença de conservantes nessas matérias primas.

Os dados obtidos da preparação 5, formulada com tensoativos do terceiro fornecedor, mostram que há a inclusão de substâncias antifúngicas nessas matérias-primas.

Estas dados foram confirmados pelos testes efetuados com as mesmas preparações adicionadas de cetoconazol (preparações 2, 4 e 6).

A análise das curvas de morte de *Candida albicans* e *Aspergillus niger* nas preparações 2 e 4 mostra que a redução da carga inoculada após 48 e 24 horas, para o primeiro e segundo microrganismo, respectivamente, foi maior na preparação 6 pois o número de viáveis foi menor que 10

UFC/ml, condição não obtida nas outras duas preparações (Figuras 32, 34 e 36 e 38, 40 e 42).

Como foi mencionado, além de conservantes, princípios ativos antimicrobianos também favorecem a proteção contra a contaminação microbiana. No caso dos xampus estudados, o cetoconazol, que é a substância anticaspa, apresenta ação antimicrobiana que visa o combate ao *Malassezia furfur*, microrganismo associado à caspa.

A comparação dos resultados dos testes de desafio obtidos das preparações base com as mesmas adicionadas de cetoconazol, verifica-se que este princípio ativo não apresenta atividade contra bactérias e nem mesmo contra os fungos testados, evidentemente excluindo o *Malassezia furfur*. A análise pelos valores de D ou pelas curvas de morte mostra que as preparações contendo o princípio ativo não foram mais efetivas que as preparações bases correspondentes. Os valores de D não foram menores naqueles contendo o princípio ativo para as bactérias (Figuras 15, 17, 19, 27 e 29) e nem para o *Aspergillus niger* (Figura 43). Também não se verificou sinergismo contra *Candida albicans* (Figura 37).

O cetoconazol é um antifúngico e esperava-se pelo menos atividade maior das preparações com o princípio ativo contra esses microrganismos. Entretanto, não se verificou aumento de atividade contra *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. A comparação dos dados obtidos com a literatura, verifica-se que há concordância quanto ao comportamento do *Aspergillus niger*⁷². Também citam que o cetoconazol é pouco ativo contra este bolor. Entretanto, o resultado obtido com *Candida albicans* não foi concordante. Segundo alguns autores este fármaco é muito ativo contra esse microrganismo. Possivelmente essa diferença pode ser explicada pela origem das cepas testadas que podem apresentar comportamentos diferentes. Além disso, o cetoconazol é ativo contra esse microrganismo em pH neutro. Em produtos com pH menor que 6,6 a sua atividade diminui de 500 vezes³⁵. O pH dos xampus estudados é de 6,5, podendo ser outro fator para a ineficácia do produto contra *Candida albicans*.

Os dados obtidos confirmam a necessidade de se efetuar o teste de eficácia de sistemas conservantes no produto final, pois a presença de substâncias antimicrobianas não assegura a eficácia contra microrganismos que podem contaminar o produto.

Diferença de atividade não foi observada nas 3 preparações (2, 4 e 6) nos testes com *Malassezia furfur*. Justifica-se esse resultado considerando-se que o princípio ativo, o cetoconazol, é ativo contra esse microrganismo. Não se observou células viáveis em nenhuma das 3 preparações após 2 horas de contato, na diluição 10^{-1} (Figura 60). Este resultado era esperado pois a concentração do cetoconazol nas preparações representa cerca de 50 a 100 mil vezes a concentração mínima inibitória deste fármaco contra *Malassezia furfur*⁷⁹. Na análise efetuada do comportamento nos intervalos de tempo especificados pelos códigos oficiais, ou seja, 2, 7, 14, 21 e 28 dias, não se verifica diferença entre as 3 preparações (Figura 68 a 73).

A análise da atividade antimicrobiana das preparações contendo cetoconazol (2, 4 e 6) frente às especificações do método de regressão linear para avaliação da eficácia de sistemas conservantes, que preconiza valor de D menor ou igual a 4 horas para bactérias patogênicas e menor que 28 horas para não patogênicas e fungos, verifica-se que: todas as 3 preparações estão adequadamente conservadas se consideradas os valores de D obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* e *Malassezia furfur*, que foram de 0,36 e 0,49 horas (Figuras 53 e 61), respectivamente; em relação à *Staphylococcus aureus*, o valor obtido foi superior para a preparação 6 (D de 4,62 horas; Figura 51); para *Pseudomonas cepacia*, todas as preparações atenderam ao critério de aceitação (Figura 55); para o fungo *Aspergillus niger* e a levedura *Candida albicans*, apesar de valores de D não terem sido calculados para as preparações 2 e 4, como mencionado anteriormente, as curvas de morte mostraram que o tempo para a redução de 1 ciclo logarítmico de microrganismos foi menor que 28 horas, pois na avaliação de 24 horas verifica-se redução de mais de 2 ciclos para todas as

amostras (Figuras 56 e 58), portanto de acordo com a especificação que exige valor de D menor que 28 horas para fungos.

A análise dos dados efetuada segundo os critérios oficiais, como a da farmacopéia Britânica ²¹ e a Européia ³⁶, para produtos de uso tópico, e a do CTFA ³² para cosméticos, conclui-se que as 3 preparações estão adequadamente conservadas, pois após 2 e 14 dias, todas as preparações atenderam ao requisito de redução de 3 ciclos logarítmicos para bactérias (Figuras 62 a 64) e de 2 ciclos logarítmicos para leveduras e bolores, (Figuras 65 a 67), respectivamente, que são as especificações da Farmacopéia Britânica. Considerando que as especificações da Farmacopéia Européia e do CTFA são mais tolerantes pois exigem redução de 2 ciclos log em 7 dias para bactérias e 1 ciclo para fungos em 7 dias, as preparações também estão de acordo com estas especificações.

6.2.2 Teste do uso

Frente aos resultados obtidos nos testes de desafio, decidiu-se submeter as 3 preparações ao teste de uso. Dos 15 frascos testados, 5 para cada preparação, 1 correspondente a preparação 2, resultou em contaminação de 10^8 UFC/ml e o microrganismo foi identificado como *Serratia marcescens*. Esse limite é superior a especificação do número máximo de microrganismos contaminantes tolerado para medicamentos de uso tópico e mesmo para cosméticos. Segundo as monografias farmacopêicas, como da USP XXIII ¹³⁴, os limites especificados para preparações de uso tópico são geralmente de 100 UFC/ml ou g. Além do número elevado, o microrganismo identificado foi um Gram negativo.

Os microrganismos identificados por YABLONSKI e GOLDMAN ¹⁴² em xampus, que retornaram após o uso, foram também enterobactérias, além de bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Os resultados do estudo de avaliação da eficácia antimicrobiana *in vitro* estão de acordo com as especificações tanto de códigos oficiais como

do método da regressão linear para todas as preparações, com exceção da 6 para *Staphylococcus aureus*. Entretanto, mesmo essa preparação apresentou o valor de 4,62 horas que pode ser considerada próxima de 4.

Frente ao resultado obtido no teste de uso poder-se-ia considerar discutível a validade dos testes de desafio *in vitro*, entretanto, deve-se considerar que estas especificações não prevêm abusos durante a utilização do medicamento ou cosmético. Entretanto, merece discussão, no caso da especificação do método de regressão linear que estabelece valor de D menor que 4 horas apenas para as bactérias patogênicas e para outras menor que 28 horas. No caso específico de xampus e condicionadores de cabelos, que são aplicados durante o banho, portanto em ambiente úmido e propício a multiplicação de microrganismos, sujeitos também a diluição pela entrada de água no frasco, o sistema conservante deve ser mais efetivo que em outros tipos de preparações. Confirma esse dado a informação do voluntário, que utilizou a amostra que retornou com contaminação por *Serratia marcescens*. Segundo a informação o xampu não era armazenado em local apropriado mas sim em cima do box, sujeito a quedas e conseqüente contato com o chão do banheiro, que propiciou a contaminação pela água do chão, além da diluição.

Segundo ORTH ¹⁰¹, nesses produtos o valor de D requerido deve considerar a segurança que o frasco de acondicionamento oferece além do uso e abuso pelo consumidor. O valor de D passa a ser dividido pela representação numérica desses fatores. Para produtos com a tampa protegida, o autor sugere o valor 1 e em relação ao abuso o valor 10. Portanto o valor de D para bactérias patogênicas de menor ou igual a 4 horas passa a ser menor ou igual a 0,4 horas e para as não patogênicas de 28 horas para menor ou igual a 2,8 horas. Segundo essa especificação, nenhum dos xampus testados pode ser considerado adequadamente conservado, pois o valores de D obtidos foram muito superiores (exceto para a *Pseudomonas aeruginosa*).

O teste de uso confirma que a utilização do valor de D de menor ou igual a 28 horas para bactérias não patogênicas nesse tipo de produto não é adequado.

O resultado do teste de uso definiu a necessidade de adição de conservantes na fórmula.

Os dados obtidos neste trabalho e também os obtidos por outros autores mostram a necessidade de incorporação de conservantes eficazes contra enterobactérias¹⁰¹ e também contra *Pseudomonas sp.*^{19, 85, 118, 125}, que são microrganismos encontrados em banheiros, em produtos como xampus. Frente a este resultado *Pseudomonas cepacia* e *Serratia marcescens*, isolada de uma amostra, foram selecionadas para os estudos de conservantes.

Outros microrganismos não foram testados, pois mesmo o xampu sem conservante mostrou estar adequadamente conservado contra fungos e bactérias Gram positivas.

A preparação selecionada para o prosseguimento do estudo foi a 2, baseada não somente no fato de ter sido a que foi contaminada no teste de uso, mas também confirmada pelos testes *in vitro* que mostraram valor de D para *Pseudomonas cepacia* (12,69 horas) maior que os obtidos nas outras preparações (preparação 4, D de 7,12 e preparação 6 D, de 7,73 horas; Figura 55).

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CONSERVANTES EM SOLUÇÃO AQUOSA PELO TESTE DO DESAFIO

Inicialmente, foram testadas soluções de conservantes mais utilizados em cosméticos e em concentrações que representam a metade da máxima normalmente recomendada, pelos fabricantes ou literatura ^{12, 13, 20, 22, 55, 77, 111, 118, 126, 127, 138}.

Estes testes foram efetuados frente a *Pseudomonas cepacia* ATCC 17759 e *Serratia marcescens* isolada do xampu contaminado, considerando que estes microrganismos são resistentes ao sistema antimicrobiano da preparação em estudo.

Sabe-se que a atividade do conservante é dependente do produto, que mesmo conservantes com alta atividade intrínseca podem ser inativados por componentes do produto. Entretanto, para a seleção dos conservantes a serem testados, o conhecimento da atividade intrínseca desses conservantes foi adotado como uma primeira triagem.

A atividade intrínseca de substâncias antimicrobianas pode ser definida pelo seu valor de concentração mínima inibitória (MIC), frente a diferentes microrganismos. Apesar de alguns desses valores constarem na literatura, optou-se pelo estudo utilizando o método da regressão linear, simulando as condições as quais o conservante será submetido quando incorporado à formula do xampu, e testado. Segundo esse método, o tempo de avaliação da amostra frente às bactérias é de 48 horas. As soluções foram mantidas e avaliadas até 28 dias, pois uma das críticas ao método é a não detecção da multiplicação de microrganismos resistentes que pode ocorrer após período de tempo maior.

Em relação aos critérios de aceitação para o método da regressão linear, o valor de D considerado é menor ou igual a 28 horas para bactérias não patogênicas. Entretanto, nesse estudo decidiu-se adotar um critério mais rígido, pois sistemas que resultaram em valores de D de 12,69, 5,89 e 8,19 horas frente a *Pseudomonas cepacia* (Figuras 55 e 31) não se

mostraram adequadamente conservadas frente a bactérias Gram negativas, no teste de uso. Como foi citado anteriormente, ORTH¹⁰¹, em função de maior risco de contaminação do produto, sugere valor de D de menor ou igual a 0,4 para bactérias patogênicas e menor ou igual a 2,8 horas para as não patogênicas. Neste trabalho, optou-se como limite o valor de D de 4 horas para todas as bactérias e não a sugerida pelo autor pois para se atingir D de 0,4 e 2,8 horas poderia haver a necessidade de adição de grandes quantidades de conservantes. Justifica-se a adoção deste valor baseada na frequência de uso do produto, que supõe-se a cada 48 horas. Um sistema com D de 4 horas, teoricamente, eliminaria a carga inoculada de até 10^6 em 24 horas.

Pela comparação dos valores D ou das curvas de redução de microrganismos viáveis obtidos nos testes das soluções desafiadas com *Pseudomonas cepacia*, pode-se notar que a maior atividade foi apresentada por hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25% (Sc5) com valor de D de 0,34 horas, seguida de diazolidinil uréia a 0,25% (Sc4) e sucessivamente, 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% (Sc1), metilparabeno a 0,2% (Sc6), imidazolidinil uréia 0,3% (Sc3), e 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05% (Sc2). Com exceção da última solução, com valor de D de 5,92 horas, todas as outras apresentaram atividade antimicrobiana satisfatória no teste, com valores de D entre 0,34 e 3,91 horas (Figuras 75, 77, 79 e 81). Em relação a solução de fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (Sc7), embora sem o cálculo do valor de D, a sua curva de redução foi semelhante a da Sc3, cujo valor de D foi de 3,91 horas (Figuras 76, 77, 80 e 81).

No desafio com *Serratia marcescens*, pela análise dos valores de D obtidos, a ordem decrescente de atividade das soluções foram: Sc1, Sc5, Sc6 e Sc2, todas com atividade satisfatória pois resultaram valores de D menores de 4 horas (Figuras 83 e 87). As outras soluções não apresentaram eficácia adequada, segundo esse mesmo critério (Figuras 85 e 89).

De acordo com os dados obtidos, as soluções de hidroximetilglicinato de Sódio, diazolidinil uréia e 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol foram as que apresentaram maior atividade contra *Pseudomonas cepacia*. Por outro lado frente a *Serratia marcescens*, a solução de diazolidiniluréia foi pouco efetiva (D de 4,9 horas), enquanto as outras duas soluções foram igualmente ativas contra esse microrganismo. O diazolidiniluréia é utilizado principalmente em cosméticos visando proteção contra Gram negativos, principalmente do gênero *Pseudomonas*, que é um dos contaminantes mais freqüentes. Os dados obtidos no teste com *Pseudomonas cepacia* comprovaram a eficácia do conservante. A ineficácia contra *Serratia marcescens*, apesar de ser Gram negativa, pode ser explicada pelo fato de este microrganismo apresentar características diferentes da *Pseudomonas cepacia*, que é uma bactéria aeróbia não fermentadora, enquanto a *Serratia marcescens* é uma enterobactéria.

As soluções avaliadas durante 28 dias, com contagens efetuadas 2, 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação, mostraram que todas as soluções, com exceção da Sc3, após 2 dias apresentavam carga microbiana menor que 10 UFC/ml, para os dois microrganismos testados (Figuras 90 e 91). Na avaliação durante o decorrer dos 28 dias do teste também não se verificou aumento da carga em nenhuma das soluções, indicando a ausência de resistentes.

A seleção dos conservantes a serem incorporados no xampu foi definida pelos dados obtidos pelo método da regressão, uma vez que pelo oficial, ou seja, avaliação após 2 dias, apenas a solução Sc3 mostrou-se menos ativa contra *Serratia marcescens*. Em relação às outras soluções não se pode verificar diferença de atividade. A grande vantagem do método da regressão linear é a possibilidade de verificar diferenças menores de atividade entre conservantes. No método oficial, que especifica a primeira contagem após 2 dias, quando os resultados obtidos são iguais, como ocorreu nos testes executados com as soluções, essa diferenciação não é

possível. O método oficial proporcionou a diferenciação apenas da solução Sc3.

A *Serratia marcescens* foi o microrganismo que mais resistiu às soluções de conservantes, praticamente definindo a escolha dos melhores conservantes para serem incorporados nos xampus.

Foi definido no início do experimento que somente as soluções de conservante que obedecessem aos critérios de aceitação nos teste pelos dois métodos e para os dois microrganismos, concomitantemente, seriam utilizadas para incorporação nas preparações de xampu.

Desse modo, os conservantes selecionados foram: 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (c1), hidroximetilglicinato de Sódio (c5), metilparabeno (c6) e fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-diciano-butano (c7). Optou-se por testar os 4 conservantes, e não apenas c1 e c5, que mostraram maior atividade, pois a atividade do conservante pode ser alterada por outros componentes da fórmula, podendo o c1 e o c5 não serem os mais adequados.

6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS XAMPUS ADICIONADOS DE CONSERVANTES OU ÁCIDO SALICÍLICO

6.4.1 Teste do desafio

Os conservantes selecionados, considerando os dados do teste em solução, foram: 2-Bromo-2-nitropropano-1,3,-diol (c1), hidroximetilglicinato de Sódio (c5), metilparabeno (c6) e fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (c7). Além desses, foram também testados o propilparabeno (c9) e o ácido salicílico (c8), não incluídos no teste anterior por apresentarem baixa solubilidade em água nas concentrações normalmente utilizadas. Justifica-se a inclusão do propilparabeno o fato de se obter sinergismo de ação quando associado a metilparabeno. O ácido salicílico foi incluído pois, além de ser utilizado como conservante na concentração de até 0,5%, apresenta efeito queratolítico e em xampus anticaspa permite-se a utilização de concentração maiores, de 2% a 3%, exceto para produtos de uso infantil, nos quais seu uso é proibido^{20, 82}.

Os conservantes selecionados foram adicionados à preparação 2, inicialmente nas mesmas concentrações àquelas testadas em soluções aquosas. Posteriormente foram preparadas amostras com concentrações maiores daqueles em que se verificou redução da atividade no xampu, procurando adequar a concentração que resultasse em valor de D menor que 4 horas. Das amostras em que se verificou atividade muito intensa, foram testadas preparações com quantidades menores do conservante, visando obter-se uma concentração mínima com atividade antimicrobiana eficaz, em referência aos critérios de aceitação pois, como já foi mencionado, conservantes são substâncias tóxicas, além de influir no custo do produto.

As preparações foram testadas pelo método de regressão linear e também pelo método oficial.

Os testes segundo método oficial foram realizados visando a complementação do teste de regressão linear pois, como foi citado, o período curto de avaliação deste método impossibilita a detecção de microrganismos sobreviventes resistentes, que podem multiplicar-se no decorrer de maior tempo.

6.4.1.1 Xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol

O 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (c1) apresentou atividade em solução aquosa, com valor D 1,97 horas para *Pseudomonas cepacia* e 1,65 contra *Serratia marcescens* (Figuras 75 e 83). Após incorporado ao xampu, na mesma concentração de 0,05% (p/v) (preparação 7), a atividade contra os dois microrganismos desafiados foi maior, apresentando valores D de 0,63 e 0,95 horas (Figuras 93 e 111). Considerando-se que esses valores são muito abaixo, indicando atividade muito intensa, a concentração do conservante foi reduzida a metade, 0,025% (p/v), na preparação 8. Esta concentração é equivalente a 8 vezes o valor de MIC contra *Pseudomonas cepacia*, que é 0,003%¹³⁸. No desafio com *Serratia marcescens*, o tempo para a redução da carga microbiana para menor que 10 UFC/mL passou de 4 para 8 horas (Figura 110) e para *Pseudomonas cepacia* manteve-se inalterado (Figura 92), mas a redução da carga após 2 horas foi menor, indicando menor atividade. Os valores de D passaram a 0,91 e 1,00 horas, respectivamente para os dois microrganismos (Figuras 93 e 111). A redução da atividade antimicrobiana obtida foi muito pequena, podendo-se reduzir ainda mais a concentração do conservante pois os valores de D são muito inferiores ao limite adotado de 4 horas. Entretanto, se considerarmos a especificação sugerida por ORTH¹⁰¹ para produtos como xampus mesmo a preparação com 0,025% pode ser considerada adequadamente conservada, pois os valores obtidos são próximos de 2,8 horas, ainda que concentrações menores devessem ser testadas para se estabelecer a concentração mínima no xampu que ainda atendesse a essa especificação.

A análise dos dados obtidos no teste oficial, segundo especificação da Farmacopéia Britânica ²¹, a preparação contendo menor concentração do conservante pode ser considerada adequadamente conservada, pois verificou-se a redução da carga de 2 ciclos logarítmicos em 2 dias e não ocorreu aumento, no decorrer dos 28 dias do teste (Figuras 128 e 129).

6.4.1.2 Xampus com hidroximetilglicinato de Sódio

O hidroximetilglicinato de Sódio (c5), foi incorporado nos xampus na concentração de 0,25% (p/v) (preparação 9), a mesma testada em solução aquosa. No desafio com *Pseudomonas cepacia*, não ocorreu alteração da atividade antimicrobiana, sendo que o tempo de redução de carga microbiana para menor que 10 UFC/mL foi o mesmo, de 2 horas (Figuras 78 e 94), e o D de 0,36 horas (Figura 95), valor muito próximo daquele obtido no teste com a solução, que foi de 0,34 (Figura 79). Para se obter uma preparação menos ativa, mas dentro dos critérios de aceitação, o conservante foi incorporado ao xampu, na concentração de 0,125% (p/v) (preparação 10). Obteve-se no desafio com o mesmo microrganismo, o tempo para a redução da carga microbiana para menor que 10 UFC/mL em 4 horas (Figura 94) e o valor D 1,05 horas (Figura 95).

No teste da preparação 9, com 0,025% do conservante, contra *Serratia marcescens*, ocorreu a redução de 2 ciclos log em 4 horas (Figura 112), entretanto essa carga manteve-se até o tempo de 48 horas. Esta carga resistiu até mesmo na avaliação de 28 dias, tempo máximo do teste. A curva de morte desse microrganismo no decorrer do teste formou uma reta paralela ao eixo x (Figura 112). Esta preparação não está adequadamente conservada, mesmo pela especificação da Farmacopéia Britânica ²¹ para produtos de uso tópico que preconiza redução de 3 ciclos logarítmicos em 48 horas e redução até não detecção de viáveis em 7 dias, mantendo esta condição até 28 dias. Mesmo a análise segundo a especificação do CTFA ³², mais tolerante, que considera adequadamente conservado o produto com

redução de 3 ciclos logarítmicos em 7 dias e manutenção da carga até 28 dias, resultou em xampu com sistema conservante não efetivo. Desse modo, aumentou-se a concentração para 0,5% (p/v) (preparação 11), obtendo-se no teste diminuição da carga microbiana para menor que 10 UFC/ml em 4 horas (Figura 112) e o valor de D igual a 2,86 horas (Figura 113). Esta concentração pode ser considerada alta, havendo a necessidade também para esse conservante de se estabelecer a concentração mínima que atendesse a especificação, que se situa entre maior que 0,25 e menor que 0,5%.

6.4.1.3 Xampus com metilparabeno isolado ou em associação com propilparabeno

O metilparabeno, na concentração de 0,2% no xampu (preparação 12), que equivale ao dobro de seu MIC sobre *Pseudomonas cepacia* (0,1%)¹³⁸, apresentou a mesma atividade verificada em solução aquosa sobre esse microrganismo (Figuras 78 e 96), com os valores de D muito próximos, de 2,35 e 2,08 horas (Figuras 79 e 97). Já frente a *Serratia marcescens*, a atividade foi muito menor, não se conseguindo qualquer redução do inóculo nem mesmo em 28 dias (Figura 114), que era obtido em 24 horas na solução aquosa (Figura 86). O aumento da concentração do conservante para 0,3 e 0,4% (p/v) (preparações 13 e 14), não resultou em melhores efeitos. Pelo gráfico da figura 115 (método rápido), e a figura 131 (método oficial), pode-se notar que as curvas de morte são praticamente paralelas ao eixo x. Isso pode ter ocorrido devido a inativação do conservante por algum componente da formulação. Além disso, deve-se citar o fato da possibilidade de a *Serratia marcescens* ter desenvolvido resistência a esse conservante. Esse fato foi observado por O'NEIL e MEAD⁹¹, frente a esse microrganismo e outros, em xampu conservado com 0,8% de metilparabeno.

A associação de parabenos para aumentar a atividade é clássica.¹³⁸ O metil e propilparabeno (c6 e c9) foram adicionados no xampu em duas

combinações de diferentes concentrações, 0,18 e 0,12 e 0,16 e 0,04%, respectivamente (preparações 15 e 16). As concentrações de propilparabeno equivalem e metade e a mesma daquela definida em seu MIC para *Pseudomonas cepacia* (0,04%)¹³⁶. O teste de desafio dos dois xampus com os mesmos microrganismos, resultou na diminuição da carga microbiana viável para menos de 10 UFC em 48 horas (Figura 98 e 116). Para *Pseudomonas cepacia*, verificou-se que não houve aumento da atividade das preparações 15 e 16 (Figuras 98) em relação a 12 (Figura 96), contendo apenas metilparabeno. Frente a *Serratia marcescens*, ocorreu aumento de atividade, e o metilparabeno isolado, que não mostrou ação antimicrobiana nas concentrações de até 0,4%, nas preparações 12, 13 e 14 (Figura 114), associado ao propilparabeno, foi eficaz em concentrações menores, de 0,18 e 0,16% (Figura 116). O valor D, quando isolado, na concentração de 0,4%, de 8,47 horas (Figura 115), passou a 5,0 e 4,83, nas concentrações de 0,18 e 0,16%, respectivamente, associado a 0,02 e 0,04% de propilparabeno (Figura 117). O aumento da proporção do propilparabeno, mantendo a concentração dos parabenos associados de 0,2%, influiu pouco na atividade.

6.4.1.4 Xampus com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano

A atividade do fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (c7), nos xampus, na mesma concentração que aquela testada em solução aquosa (preparação 17), isto é, 0,05% (p/v), foi maior quando comparada a observada em solução. O tempo de redução da carga microbiana dos dois microrganismos para menor que 10 UFC/mL passou de 24 horas (Figura 80 e 88) para 8 horas (Figuras 100 e 118) e o valor de D de 4,05 (Figura 89) para *Serratia marcescens*, foi reduzido para 0,87 (Figura 119). O valor de D para *Pseudomonas cepacia*, não calculado na solução aquosa, foi de 1,33 horas na preparação 17 (Figura 101). Desse modo,

diminuiu-se a concentração para 0,025% (p/v) (preparação 18). Como resultado, dos testes de desafio, não houve aumento no tempo de redução da carga microbiana para menor que 10 UFC/ml (Figuras 100 e 118) e o aumento nos valores de D foram muito pequenos, resultando em 1,03 para *Pseudomonas cepacia* (Figura 101) e 1,25 horas para *Serratia marcescens* (Figura 119).

Os dados do teste no decorrer de 28 dias mostram que não ocorre a multiplicação de nenhum dos dois microrganismos, indicando ausência de resistentes (Figuras 128 e 129).

6.4.1.5 Xampus com ácido salicílico

O ácido salicílico (c8), que não foi testado em solução aquosa, foi incorporado no xampu, inicialmente, na concentração de 0,25% (p/v) (preparação 25), que é igual ao valor do MIC frente a *Pseudomonas cepacia*¹³⁸.

No teste de desafio frente a esse microrganismo, o tempo para a redução da carga microbiana para menor que 10 UFC/ml foi de 8 horas (Figura 102) e o valor de D obtido de 2,67 h (Figura 103). O xampu com o dobro da concentração (preparação 26) resultou em aumento da atividade (D de 1,11 h). Na concentração de 0,75% (p/v) (preparação 27) o valor D foi reduzido para 0,36 horas (Figura 105). Os valores obtidos em xampus com concentrações maiores de ácido salicílico (1,0% preparação 28, 1,25% preparação 29, 1,5% preparação 30, 1,75% preparação 31 e 2,0% preparação 32) não foram diferentes, entretanto esse resultado é decorrente da limitação do método utilizado (Figuras 105 a 109). O teste preconiza a primeira avaliação da carga microbiana sobrevivente após 2 horas e neste tempo todas as preparações apresentaram carga residual menor que 10 UFC/ml, tornando assim a constituição da reta do gráfico de apenas dois pontos. Para a diferenciação entre as preparações, contendo diferentes concentrações do ácido salicílico, seria necessário a quantificação da carga

viável microbiana em intervalos de tempo menores, entre 0 e 2 horas. Como o D de 0,36 h já é considerado pequeno, não se justifica outros estudos para diferenciação de atividade, uma vez que serão menores que o valor obtido.

No desafio com *Serratia marcescens* do xampu com 0,25% de ácido salicílico (preparação 25), o tempo de redução da carga microbiana para menor que 10 UFC/ml foi de 7 dias (Figura 132), e o valor de D 48,78 horas (Figura 121). O aumento para 0,5% (preparação 26), que é a concentração máxima permitida como conservante²⁰, não foi efetiva pois resultou em mesmo tempo para redução da carga microbiana viável para menor que 10 UFC/mL, e o valor D apesar de menor, igual a 13,14 horas, está muito acima do especificado de 4 horas. Concentrações maiores foram testadas, considerando-se que o xampu é um anticaspa, portanto sendo permitido a adição de concentrações maiores. A preparação 27, com 0,75% (p/v) de ácido salicílico foi mais efetiva, pois o tempo para a redução da carga foi de 48 horas (Figura 122) e valor D 11,1 horas (Figura 123), entretanto esse valor continua acima do especificado. Na preparação 28, com 1,0% do conservante, o tempo para a redução da carga para menor que 10 UFC/ml foi de 24 horas e o valor D de 1,67. Nas preparações com concentrações de 1,25, 1,50 e 1,75% (p/v) da mesma substância (preparações 29, 30 e 31) os resultados obtidos foram semelhantes; o tempo de inativação da carga microbiana foi de 8 horas (Figuras 124 e 126), e os valores D de 3,08, 1,54 e 1,03 horas, respectivamente (Figuras 125 e 127). Verifica-se que o valor de D obtido com a preparação 29 é maior que aquele obtido com a preparação 28 que contém a metade do ácido salicílico (Figura 123 e 125). Entretanto pela curva de morte verifica-se que enquanto na preparação 28 a redução até menor que 10 UFC/ml foi obtida somente após 24 horas (Figura 122), verificando-se ainda carga residual de 10^2 UFC/ml no tempo de 8 horas, na preparação 29 esta redução foi verificada após 8 horas (Figura 124). Portanto, neste caso, os valores de D não estão representando o efeito real. Explica-se esta falha o método utilizado para o seu cálculo que

se convencionou de utilizar-se dados até a última avaliação antes da redução até menor que 10 UFC/ml. Optou-se por esse método em razão de não se conhecer o tempo real para a obtenção de carga menor que 10 UFC/ml, uma vez que a contagem de microrganismos sobreviventes é efetuada em tempos preestabelecidos. No caso da preparação 28, foram utilizados 4 pontos para o cálculo da regressão, com a carga de 10^2 UFC/ml que foi obtida no tempo de 8 horas (Figura 123). No cálculo da regressão da preparação 29 foram utilizados apenas 3 pontos, até 4 horas, pois no tempo de 8 horas a carga foi menor que 10 UFC/ml. Esta falha foi decorrente da taxa de redução de viáveis que foi lenta no início e acentuada após 4 horas. Portanto, para a utilização do valor de D deve-se verificar se este está de acordo com o comportamento da curva de morte do microrganismo. No caso das duas preparações apesar de o valor de D daquele contendo concentração menor do antimicrobiano ser menor, verifica-se pela curva de morte que a preparação 29, contendo 1,25% de ácido salicílico, é mais efetiva. A redução da carga para menos de 10 UFC/ml foi verificada somente na contagem após 24 horas na preparação 28, enquanto que para a preparação 29, após 8 horas (Figuras 122 e 124). O ácido salicílico a 2,0% (p/v) (preparação 32) resultou em valor de D muito baixo, de 0,36 horas, para os dois microrganismos desafiados (Figura 109 e 127).

A concentração do ácido salicílico no xampu foi definido pela atividade frente a *Serratia marcescens*. A concentração eficaz, considerando o D de 4 horas, situa-se entre 1,0% e 1,25% (preparações 28 e 29).

Considerando-se o gráfico das curvas de morte microbiana e os critérios de aceitação segundo especificação do CTFA ³² (Figuras 128 e 129), todas as preparações com ácido salicílico, estão adequadamente conservadas. Entretanto a preparação contendo 0,25% (preparação 25) não atende as especificações da Farmacopéia Britânica frente a *Serratia marcescens*, pois após 48 horas a redução é de apenas 2 ciclos logarítmicos (Figura 132).

6.4.2 Teste de uso

Os xampus contendo 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol nas concentrações de 0,05 (preparação 7) e 0,025% (preparação 8), 0,5% de hidroximetilglicinato (preparação 11) e 0,025 e 0,05% de fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (preparações 17 e 18) e ácido salicílico em concentrações de 1,0% ou maiores (preparações 28 a 32), enquadraram-se as especificações tanto do método de regressão linear quanto as do oficial, nos testes *in vitro*.

Os conservantes selecionados para serem incorporados no xampu a ser submetido ao teste de uso foram: 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (c1) na concentração de 0,025%, fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano (c7) a 0,05% e ácido salicílico (c8) na concentração de 2%. Justifica-se a escolha do primeiro conservante na concentração menor, baseada nos valores de D que resultaram menores de 4 horas. Quanto ao xampu com ácido salicílico a escolha recaiu sobre aquele contendo a concentração de 2,0%, considerando não somente a atividade antimicrobiana mas também a queratolítica que é desejável no caso de xampu anticaspa.

O ácido salicílico, no Brasil, pode ser usado em concentrações de até 3% para produtos anticaspa ²⁰, sendo classificado como produto seguro e efetivo (classe I). Contudo, devido ao fato de sofrer absorção quando aplicado em áreas extensas da pele, seu uso deve ser cauteloso em pessoas com fissuras na pele e crianças ^{20, 48, 66, 82, 124, 139}.

O xampu com o fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano foi testado na concentração de 0,05%, apesar de a preparação com a concentração de 0,025% também estar de acordo com o critério de aceitação.

Quanto ao xampu com hidroximetilglicinato de Sódio, não foi incluída no teste de uso, pois apesar de a preparação contendo 0,5% (preparação 11) ter apresentado atividade contra *Serratia marcescens* (D de 2,86 horas)

essa concentração é a máxima permitida (Figura 113). Possivelmente, a concentração ótima é maior que 0,25%, que não se mostrou eficaz contra esse microrganismo, e menor que 0,5%. Pelos resultados em que a metade da concentração máxima não foi eficiente, indicando menor atividade desse conservante, decidiu-se não continuar os estudos com a preparação contendo hidroximetilglicinato de Sódio.

Para o teste de uso esses conservantes foram incorporados no xampu base com a mistura de tensoativos, representado pela preparação 4. O estudo não foi prosseguido com a preparação 2 porque os tensoativos utilizados nessa preparação não estavam mais sendo comercializados pelo fornecedor A (Aquatec). A substituição pela preparação 4, apesar de não ideal, não foi considerada como problema uma vez que os valores de D em relação a preparação 2 foram muito semelhantes (Figuras 51, 53, 57, 59 e 61), com exceção do valor contra *Pseudomonas cepacia* que foi o menor (Figura 55). Além disso, na prática, tensoativos de outros fornecedores podem ser utilizados para a formulação do xampu.

No teste de uso foram incluídos também aqueles voluntários que haviam participado do primeiro estudo. As amostras foram distribuídas por sorteio. O voluntário que retornou a amostra contaminada no primeiro estudo, recebeu a preparação 24.

Todas as preparações retornaram sem apresentar microrganismos contaminantes viáveis. Portanto, o teste de uso confirmou que as preparações testadas apresentam-se adequadamente conservadas.

6.5 TESTE DE ESTABILIDADE DO CETOCONAZOL NOS XAMPUS

A estabilidade do cetoconazol nos xampus foi avaliada em ensaio prévio utilizando as preparações sem conservantes (preparações 2, 4 e 6) mantidas durante 28 dias a temperatura ambiente. Apesar de ser um ensaio incompleto, pelos resultados obtidos, listados na tabela XII, considerou-se que a variação do teor do princípio ativo, no decorrer do tempo, não era significativo (p igual a 0,983).

O mesmo teste foi realizado nas preparações selecionadas que apresentaram sistema conservante adequado, preparações 20, 22 e 24, mantidas a temperatura ambiente por 180 dias. O teor de cetoconazol foi determinada no dia da preparação e após intervalos de tempo de 30, 60 e 180 dias, e foram listados na tabela XIII. A análise dos dados não mostrou diferença significativa no decorrer do teste (p de 0,236), entretanto verificou-se que na preparação 20, que contém 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol na concentração de 0,025%, ocorreu o aumento gradativo durante o decorrer do tempo. Evidentemente, esses valores maiores são decorrentes de falha da metodologia analítica utilizada para a análise que não foi adequada. O método não apresentou seletividade para o princípio ativo. A diferença entre o valor obtido no doseamento efetuado após a preparação e após 180 dias é de 13,6%.

Nos dados resultantes da análise da preparação 22 que contém fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano na concentração de 0,05%, e da preparação 24, que contém ácido salicílico a 2,0%, não se verificou esse problema. Os valores de concentração do cetoconazol nos xampus aumentaram e diminuíram no decorrer dos 180 dias do teste. A análise de variância dos valores obtidos das amostras das 3 preparações, nos mesmos tempos de análise, resultou em valor de p igual 0,236, indicando semelhança entre os valores. Estes dados indicam que possivelmente não ocorreu a alteração da concentração do princípio ativo nessas preparações. Entretanto, considerando que o método analítico

utilizado para a avaliação não apresenta seletividade, não se pode afirmar sobre a estabilidade do cetoconazol nas preparações. O método utilizado no presente estudo baseou-se naquele validado para comprimidos ⁹⁰, que se mostrou eficiente nos ensaios prévios realizados com o xampu adicionado de cetoconazol, porém sem conservantes (Tabela XII). Para a conclusão há a necessidade de se realizar a avaliação utilizando método analítico mais adequado, possivelmente a cromatografia líquida de alta eficiência que é o método preconizado pela Farmacopéia Americana (USP XXIII) ¹³⁴. Entretanto, como foi citado, os dados indicam que o cetoconazol nas preparações 22 e 24 apresentam estabilidade no período de 180 dias.

6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho proposto visa fornecer dados para que farmácias possam formular xampu anticaspa com cetoconazol a 2%, devidamente estudado quanto aos sistemas conservantes, evitando assim a simples adição de conservantes tradicionalmente utilizados como os parabenos, sem qualquer estudo prévio.

Os dados de testes de xampus de cetoconazol sem conservantes mostram que se enquadram às exigências das especificações de métodos oficiais, como o da farmacopéia Britânica ²¹ e a do CTFA ³². Entretanto, verificou-se que no caso de produtos utilizados durante o banho, sujeito as condições de maior risco de contaminação, que é o caso dos xampus, mesmo produtos que apresentam sistema conservante de acordo com essas especificações podem ser susceptíveis à contaminação.

A prática comum adotada em farmácias de manipulação de adição de conservantes tradicionais como parabenos na fórmula, sem estudo prévio, pode resultar em produtos susceptíveis à contaminação microbiana. Como foi demonstrado, os parabenos, mesmo associados, mostraram-se menos eficientes que outros conservantes, tanto contra *Pseudomonas cepacia* como *Serratia marcescens*, no caso específico do xampu em estudo. Como esses contaminantes são muito freqüente nestes produtos, deve-se formular o xampu com sistema conservante eficiente contra esses microrganismos.

De acordo com os dados obtidos, os xampus com 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol na concentração de 0,025% (preparação 20), com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano na concentração de 0,05% (preparação 22), e que contém ácido salicílico a 2,0% (preparação 24) foram mais efetivos quanto ao sistema conservante.

Por outro lado a análise da estabilidade do cetoconazol indica que as preparações 22 e 24 são mais estáveis, pois apesar da metodologia analítica não adequada, o aumento do valor de concentração da substância observada na preparação 20 pode ser decorrente de interferência de

substâncias de decomposição do cetoconazol ou de interação com outros componentes da fórmula.

As fórmulas mais adequadas, segundo os dados do estudo, são os xampus contendo fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano na concentração de 0,05% (preparação 22), e aquele que contém ácido salicílico a 2,0% (preparação 24).

Portanto, o sistema conservante mais adequado para o xampu com cetoconazol a 2% na fórmula estudada é o fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano na concentração de 0,05%, pois o ácido salicílico não é efetivo na concentração utilizada como conservante antimicrobiano que é de 0,5%.

O xampu com 2,0% de ácido salicílico pode ser vantajoso quando se considera que nesta concentração a substância além de ser sistema conservante eficaz apresenta função queratolítica que auxilia no tratamento da caspa.

7

CONCLUSÕES

- 7.1. Matérias-primas de xampus contendo conservantes não apresentam atividade antimicrobiana suficiente, para promover adequada proteção contra a contaminação microbiana em xampus.
- 7.2. O cetoconazol, embora com atividade antibacteriana e antifúngica, não apresenta atividade antimicrobiana efetiva com conservantes presentes nas matérias-primas de xampus.
- 7.3. Xampu com cetoconazol a 2%, preparado segundo a fórmula estudada, necessita de adição de conservantes.
- 7.4. O metilparabeno, ativo contra *Pseudomonas cepacia* e *Serratia marcescens* em solução, não é efetivo, mesmo associado ao propilparabeno, quando incorporado em xampu com cetoconazol a 2%.
- 7.5. O ácido salicílico na concentração máxima recomendada como conservante (0,5%) não é eficiente para a conservação de xampu com cetoconazol a 2%.

- 7.6. Os xampus contendo 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% e 0,025%, ou hidroximetilglicinato de Sódio a 0,5% ou fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,025 e 0,05% estão adequadamente conservados, segundo as especificações do teste de eficácia de conservantes, tanto pelo método da regressão linear como do oficial.
- 7.7. O 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,025%, o fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% e o ácido salicílico a 2,%, concentração utilizada como queratolítico, constituem sistemas conservantes eficazes em xampu anticaspa com cetoconazol a 2%, confirmado pelo teste de uso.
- 7.8. Os xampus anticaspa com cetoconazol a 2% contendo fenoxietanol associado a 1,2- dibromo-2,4-diciano-butano a 0,05% ou o ácido salicílico a 2,%, apresentam estabilidade do princípio ativo e sistemas conservantes adequados.

APÊNDICE

Abaixo estão as tabelas I a XVIII, das quais se extraíram os dados para a construção das figuras anteriormente citadas.

TABELA I Logaritmo decimal do número de bactérias sobreviventes por mililitro em intervalos de tempo especificados pelo método da regressão linear ⁹⁸ para 6 preparações de xampus, 3 com cetoconazol e 3 sem o princípio ativo, sem conservante

Prep	Microorganismo	Tempo (horas)					
		0	2	4	8	24	48
1	<i>S. aureus</i>	6,3	4,8	4,2	3,5	< 1,0	< 1,0
1	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
1	<i>P. cepacia</i>	6,9	6,7	6,5	6,0	3,5	< 1,0
2	<i>S. aureus</i>	6,3	5,9	5,7	4,0	< 1,0	< 1,0
2	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
2	<i>P. cepacia</i>	6,9	5,6	5,5	5,0	3,6	2,5
3	<i>S. aureus</i>	6,3	5,2	3,8	2,9	< 1,0	< 1,0
3	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
3	<i>P. cepacia</i>	6,9	5,7	5,5	4,6	3,0	< 1,0
4	<i>S. aureus</i>	6,3	5,9	5,2	3,5	< 1,0	< 1,0
4	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
4	<i>P. cepacia</i>	6,9	5,6	5,4	4,5	2,4	< 1,0
5	<i>S. aureus</i>	6,3	4,7	3,8	< 1,0	< 1,0	< 1,0
5	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
5	<i>P. cepacia</i>	6,9	5,3	5,2	4,8	3,3	< 1,0
6	<i>S. aureus</i>	6,3	5,8	5,4	4,5	< 1,0	< 1,0
6	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
6	<i>P. cepacia</i>	6,9	5,3	5,6	4,5	3,2	< 1,0

2, 4 e 6 = xampu com o cetoconazol; 1, 3 e 5 = xampu sem o princípio ativo;
Prep = preparação

TABELA II Logarítmo decimal do número de leveduras e bolores sobreviventes por mililitro em intervalos de tempo especificados pelo método da regressão linear⁹⁸ para 6 preparações de xampus, 3 com cetoconazol e 3 sem o princípio ativo, sem conservante

Prep	Microrganismo	Tempo (horas)					
		0	2	4	8	24	48
1	<i>C. albicans</i>	5,7	5,5	5,6	4,5	4,1	< 1,0
1	<i>A. niger</i>	5,1	5,1	4,2	3,9	3,3	< 1,0
1	<i>M. furfur</i>	5,1	5,0	4,8	4,5	< 1,0	< 1,0
2	<i>C. albicans</i>	5,7	4,0	4,1	4,4	2,3	2,2
2	<i>A. niger</i>	5,1	4,1	3,9	3,5	2,8	< 1,0
2	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
3	<i>C. albicans</i>	5,7	5,7	5,6	4,4	3,2	2,4
3	<i>A. niger</i>	5,1	5,0	4,4	3,6	3,7	< 1,0
3	<i>M. furfur</i>	5,1	5,1	4,9	4,7	< 1,0	< 1,0
4	<i>C. albicans</i>	5,7	3,3	3,6	2,6	3,7	2,5
4	<i>A. niger</i>	5,1	4,0	3,9	3,6	2,9	< 1,0
4	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
5	<i>C. albicans</i>	5,7	5,6	5,1	4,1	< 1,0	< 1,0
5	<i>A. niger</i>	5,1	5,0	4,1	3,3	< 1,0	< 1,0
5	<i>M. furfur</i>	5,1	5,0	4,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
6	<i>C. albicans</i>	5,7	5,5	4,7	3,9	3,1	< 1,0
6	<i>A. niger</i>	5,1	4,1	3,5	3,2	< 1,0	< 1,0
6	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

2, 4 e 6 = xampu com o cetoconazol; 1, 3 e 5 = xampu sem o princípio ativo;
Prep = preparação

TABELA III Equações da reta, coeficientes de correlação e valores de D obtidos para bactérias pelo método da regressão linear⁶⁸ para 6 preparações de xampu, 3 com cetoconazol e 3 sem o princípio ativo, sem conservantes

Prep	Microrganismo	Valor de D (horas)	Equação da Reta	R
1	<i>S. aureus</i>	3,09	$Y = - 0,324 X + 5,845$	- 0,932
1	<i>P. aeruginosa</i>	0,36	$Y = - 2,750 X + 6,500$	- 1,000
1	<i>P. cepacia</i>	6,93	$Y = - 0,144 X + 7,035$	- 0,996
2	<i>S. aureus</i>	3,46	$Y = - 0,289 X + 6,483$	- 0,971
2	<i>P. aeruginosa</i>	0,36	$Y = - 2,750 X + 6,500$	- 1,000
2	<i>P. cepacia</i>	12,69	$Y = - 0,079 X + 6,001$	- 0,994
3	<i>S. aureus</i>	2,35	$Y = - 0,425 X + 6,045$	- 0,970
3	<i>P. aeruginosa</i>	0,36	$Y = - 2,750 X + 6,500$	- 1,000
3	<i>P. cepacia</i>	7,12	$Y = - 0,141 X + 6,200$	- 0,945
4	<i>S. aureus</i>	2,85	$Y = - 0,351 X + 6,460$	- 0,991
4	<i>P. aeruginosa</i>	0,36	$Y = - 2,750 X + 6,500$	- 1,000
4	<i>P. cepacia</i>	5,89	$Y = - 0,170 X + 6,278$	- 0,967
5	<i>S. aureus</i>	1,60	$Y = - 0,625 X + 6,183$	- 0,987
5	<i>P. aeruginosa</i>	0,36	$Y = - 2,750 X + 6,500$	- 1,000
5	<i>P. cepacia</i>	8,19	$Y = - 0,122 X + 6,012$	- 0,906
6	<i>S. aureus</i>	4,62	$Y = - 0,216 X + 6,262$	- 0,999
6	<i>P. aeruginosa</i>	0,36	$Y = - 2,750 X + 6,500$	- 1,000
6	<i>P. cepacia</i>	7,73	$Y = - 0,129 X + 6,070$	- 0,909

NC = não calculado; 2, 4 e 6 = preparações com cetoconazol; 1, 3 e 5 = preparações sem o princípio ativo, R = coeficiente de correlação; Prep = preparação

TABELA IV Equações da reta, coeficientes de correlação e valores de D obtidos para bactérias pelo método da regressão linear ⁹⁸ para 6 preparações de xampu, 3 com cetoconazol e 3 sem o princípio ativo, sem conservantes

Prep	Microrganismo	Valor de D (horas)	Equação da Reta	R
1	<i>C. albicans</i>	14,25	$Y = - 0,070 X + 5,623$	- 0,911
1	<i>A. niger</i>	NC	$Y = - 0,074 X + 4,865$	- 0,892
1	<i>M. furfur</i>	12,59	$Y = - 0,079 X + 5,139$	- 0,996
2	<i>C. albicans</i>	NC	$Y = - 0,061 X + 4,641$	- 0,846
2	<i>A. niger</i>	NC	$Y = - 0,078 X + 4,494$	- 0,889
2	<i>M. furfur</i>	0,49	$Y = - 2,050 X + 5,100$	- 1,000
3	<i>C. albicans</i>	13,55	$Y = - 0,074 X + 5,573$	- 0,954
3	<i>A. niger</i>	NC	$Y = - 0,055 X + 4,781$	- 0,764
3	<i>M. furfur</i>	19,31	$Y = - 0,052 X + 5,169$	- 0,951
4	<i>C. albicans</i>	NC	$Y = - 0,034 X + 4,084$	- 0,565
4	<i>A. niger</i>	NC	$Y = - 0,073 X + 4,447$	- 0,862
4	<i>M. furfur</i>	0,49	$Y = - 2,050 X + 5,100$	- 1,000
5	<i>C. albicans</i>	4,84	$Y = - 0,207 X + 5,836$	- 0,985
5	<i>A. niger</i>	4,16	$Y = - 0,240 X + 5,235$	- 0,970
5	<i>M. furfur</i>	7,19	$Y = - 0,139 X + 5,150$	- 0,954
6	<i>C. albicans</i>	9,71	$Y = - 0,103 X + 5,391$	- 0,916
6	<i>A. niger</i>	4,38	$Y = - 0,229 X + 4,763$	- 0,914
6	<i>M. furfur</i>	0,49	$Y = - 2,050 X + 5,100$	- 1,000

NC = não calculado; 2, 4 e 6 = preparações com cetoconazol; 1, 3 e 5 = preparações sem o princípio ativo, R = coeficiente de correlação; Prep = preparação

TABELA V Logaritmo decimal do número de bactérias sobreviventes por mililitro em intervalos de tempo especificados pelo método Oficial da BP 93 ²¹ e do CTFA ³² para 3 preparações diferentes de xampu com e sem cetoconazol, mas sem conservante

Prep	Microorganismo	Tempo (dias)					
		0	2	7	14	21	28
1	<i>S. aureus</i>	6,3	< 1,0	---	---	---	< 1,0
1	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	---	---	< 1,0
1	<i>P. cepacia</i>	6,9	< 1,0	---	---	---	< 1,0
2	<i>S. aureus</i>	6,3	< 1,0	---	---	---	< 1,0
2	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	---	---	---	< 1,0
2	<i>P. cepacia</i>	6,9	2,5	< 1,0	---	---	< 1,0
3	<i>S. aureus</i>	6,3	< 1,0	---	---	---	< 1,0
3	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	---	---	---	< 1,0
3	<i>P. cepacia</i>	6,9	< 1,0	---	---	---	< 1,0
4	<i>S. aureus</i>	6,3	< 1,0	---	---	---	< 1,0
4	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	---	---	---	< 1,0
4	<i>P. cepacia</i>	6,9	< 1,0	---	---	---	< 1,0
5	<i>S. aureus</i>	6,3	< 1,0	---	---	---	< 1,0
5	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	---	---	---	< 1,0
5	<i>P. cepacia</i>	6,9	< 1,0	---	---	---	< 1,0
6	<i>S. aureus</i>	6,3	< 1,0	---	---	---	< 1,0
6	<i>P. aeruginosa</i>	6,5	< 1,0	---	---	---	< 1,0
6	<i>P. cepacia</i>	6,9	< 1,0	---	---	---	< 1,0

--- não foi analisado; 2, 4 e 6 = xampu com o cetoconazol; 1, 3 e 5 = xampu sem o princípio ativo; Prep = preparação

TABELA VI Logaritmo decimal do número de leveduras e bolores sobreviventes por mililitro em intervalos de tempo especificados pelo método oficial da BP 93²¹ e do CTFA³² para 3 preparações diferentes de xampu com e sem cetoconazol, mas sem conservante

Prep	Microrganismo	Tempo (dias)					
		0	2	7	14	21	28
1	<i>C. albicans</i>	5,7	< 1,0	—	—	—	< 1,0
1	<i>A. niger</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
1	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
2	<i>C. albicans</i>	5,7	2,2	< 1,0	—	—	< 1,0
2	<i>A. niger</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
2	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
3	<i>C. albicans</i>	5,7	2,4	< 1,0	—	—	< 1,0
3	<i>A. niger</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
3	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
4	<i>C. albicans</i>	5,7	3,5	< 1,0	—	—	< 1,0
4	<i>A. niger</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
4	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
5	<i>C. albicans</i>	5,7	< 1,0	—	—	—	< 1,0
5	<i>A. niger</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
5	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
6	<i>C. albicans</i>	5,7	< 1,0	—	—	—	< 1,0
6	<i>A. niger</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0
6	<i>M. furfur</i>	5,1	< 1,0	—	—	—	< 1,0

— não foi analisado; 2, 4 e 6 = xampu com o cetoconazol; 1, 3 e 5 = xampu sem o princípio ativo; Prep = preparação

TABELA VII Logaritmo decimal do número de microrganismos sobreviventes em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em intervalos de tempo especificados pelo método da regressão linear ⁹⁸ para as soluções aquosas de conservantes Sc1 a Sc7

Sol	Conservante e Concentração	Microorga- nismo	Tempo (horas)					
			0	2	4	8	24	48
Sc1	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	6,8	5,7	5,7	2,6	<1,0	<1,0
Sc1	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	6,4	5,2	4,6	1,5	<1,0	<1,0
Sc2	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	6,8	6,2	6,8	5,6	2,8	<1,0
Sc2	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	6,4	6,2	5,9	4,4	<1,0	<1,0
Sc3	Imidazolidinil uréia a 0,300%	<i>P. cepacia</i>	6,8	5,5	5,7	4,5	<1,0	<1,0
Sc3	Imidazolidinil uréia a 0,300%	<i>S. marcescens</i>	6,4	6,2	6,1	6,1	3,7	3,5
Sc4	Diazolidinil uréia a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	6,8	5,0	2,8	<1,0	<1,0	<1,0
Sc4	Diazolidinil uréia a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	6,4	6,1	6,0	6,0	1,6	<1,0
Sc5	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	6,8	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Sc5	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	6,4	5,5	4,5	2,0	<1,0	<1,0
Sc6	Metilparabeno a 0,200%	<i>P. cepacia</i>	6,8	6,3	5,1	<1,0	<1,0	<1,0
Sc6	Metilparabeno a 0,200%	<i>S. marcescens</i>	6,4	6,1	5,7	3,2	<1,0	<1,0
Sc7	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano a 0,050%	<i>P. cepacia</i>	6,8	6,3	6,6	5,8	<1,0	<1,0
Sc7	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano a 0,050%	<i>S. marcescens</i>	6,4	6,2	5,6	4,5	<1,0	<1,0

Sol = solução do conservante

TABELA VIII Equações da reta, coeficientes de correlação e valores de D obtidos pelo método da regressão linear⁹⁸ para soluções aquosas de conservantes Sc1 a Sc7

Sol	Conservante e Concentração	Microrga-nismo	Valor de D (horas)	Equação da reta	R
Sc1	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	1,97	$Y = -0,509 X + 6,980$	-0,960
Sc1	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	1,65	$Y = -0,604 X + 6,540$	-0,988
Sc2	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	5,92	$Y = -0,169 X + 6,624$	-0,978
Sc2	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	3,91	$Y = -0,256 X + 6,620$	-0,963
Sc3	Imidazolidinil uréia a 0,300%	<i>P. cepacia</i>	3,91	$Y = -0,256 X + 6,520$	-0,926
Sc3	Imidazolidinil uréia a 0,300%	<i>S. marcescens</i>	14,88	$Y = -0,067 X + 6,296$	-0,927
Sc4	Diazolidinil uréia a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	1,00	$Y = -1,000 X + 6,867$	-0,998
Sc4	Diazolidinil uréia a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	4,90	$Y = -0,204 X + 6,771$	-0,968
Sc5	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	0,34	$Y = -2,900 X + 6,800$	-1,000
Sc5	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	1,80	$Y = -0,554 X + 6,540$	-0,997
Sc6	Metilparabeno a 0,200%	<i>P. cepacia</i>	2,35	$Y = -0,425 X + 6,917$	-0,973
Sc6	Metilparabeno a 0,200%	<i>S. marcescens</i>	2,45	$Y = -0,409 X + 6,780$	-0,955
Sc7	Fenoxietanol e 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,050%	<i>P. cepacia</i>	NC	$Y = -0,110 X + 6,780$	-0,864
Sc7	Fenoxietanol e 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,050%	<i>S. marcescens</i>	4,05	$Y = -0,247 X + 6,540$	-0,989

NC = não calculado; R = Coeficiente de correlação; Sol = solução do conservante

TABELA IX Logaritmo decimal do número de microrganismos sobreviventes por mililitro em intervalos de tempo especificados pelo método oficial da BP 93²¹ e do CTFA³² para as soluções de conservantes Sc1 a Sc7

Sol	Conservante e Concentração	Microrga- nismo	Tempo (dias)					
			0	2	7	14	21	28
Sc1	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	6,8	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc1	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	6,4	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc2	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	6,8	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc2	5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	6,4	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc3	Imidazolidinil uréia a 0,300%	<i>P. cepacia</i>	6,8	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc3	Imidazolidinil uréia a 0,300%	<i>S. marcescens</i>	6,4	3,5	< 1,0	—	—	< 1,0
Sc4	Diazolidinil uréia a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	6,8	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc4	Diazolidinil uréia a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	6,4	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc5	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	6,8	< 1,0	< 1,0	—	—	< 1,0
Sc5	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	6,4	< 1,0	< 1,0	—	—	< 1,0
Sc6	Metilparabeno a 0,200%	<i>P. cepacia</i>	6,8	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc6	Metilparabeno a 0,200%	<i>S. marcescens</i>	6,4	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc7	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano a 0,050%	<i>P. cepacia</i>	6,8	< 1,0	—	—	—	< 1,0
Sc7	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano a 0,050%	<i>S. marcescens</i>	6,4	< 1,0	—	—	—	< 1,0

— não foi analisado; Sol = solução do conservante

TABELA X Logarítmo decimal do número de microrganismos sobreviventes em UFC/mL (Unidades formadoras de colônias por mililitro) em intervalos de tempo especificados pelo método da regressão linear ⁹⁸ para as preparações 7 a 14

Prep	Conservante Concentração	Microrga- nismo	Tempo (horas)					
			0	2	4	8	24	48
7	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	6,5	4,9	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
7	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	6,6	4,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
8	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,025%	<i>P. cepacia</i>	6,5	5,4	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
8	2-Bromo-2-nitropropano- 1,3-diol a 0,025%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,0	2,6	< 1,0	< 1,0	< 1,0
9	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
9	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,3	4,7	4,7	4,6	4,6
10	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,125%	<i>P. cepacia</i>	6,5	4,6	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
11	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,50%	<i>S. marcescens</i>	6,6	5,9	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
12	Metilparabeno a 0,200%	<i>P. cepacia</i>	6,5	5,5	5,0	2,6	< 1,0	< 1,0
12	Metilparabeno a 0,200%	<i>S. marcescens</i>	6,9	6,5	6,4	5,3	3,6	3,6
13	Metilparabeno a 0,300%	<i>S. marcescens</i>	6,9	6,8	6,5	6,5	6,5	6,6
14	Metilparabeno a 0,400%	<i>S. marcescens</i>	6,9	6,7	6,7	6,5	6,5	6,2

Prep = preparação

TABELA XI Logaritmo decimal do número de microrganismos sobreviventes em UFC/mL (Unidades formadoras de colônias por mililitro) em intervalos de tempo especificados pelo método da regressão linear⁹⁸ para as preparações 15 a 18

Prep	Conservante Concentração	Microorga- nismo	Tempo (horas)					
			0	2	4	8	24	48
15	Metil e Propilparabeno a (0,18 e 0,02%)	<i>P. cepacia</i>	6,5	4,3	3,8	2,2	1,2	< 1,0
15	Metil e Propilparabeno a (0,18 e 0,02%)	<i>S. marcescens</i>	6,9	5,9	5,5	3,9	1,8	< 1,0
16	Metil e Propilparabeno a (0,16 e 0,04%)	<i>P. cepacia</i>	6,5	4,5	3,3	2,4	1,4	< 1,0
16	Metil e Propilparabeno a (0,16 e 0,04%)	<i>S. marcescens</i>	6,9	6,0	5,7	4,7	1,7	< 1,0
17	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,050%	<i>P. cepacia</i>	6,5	4,4	3,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0
17	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,050%	<i>S. marcescens</i>	6,6	5,6	2,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
18	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,025%	<i>P. cepacia</i>	6,5	5,2	2,6	< 1,0	< 1,0	< 1,0
18	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,025%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,0	3,4	< 1,0	< 1,0	< 1,0

Prep = preparação

TABELA XII Logaritmo decimal do número de microrganismos sobreviventes em UFC/mL (Unidades formadoras de colônias por mililitro) em intervalos de tempo especificados pelo método da regressão linear⁹⁸ para as preparações 25 a 32

Prep	Conservante Concentração	Microrga- nismo	Tempo (horas)					
			0	2	4	8	24	48
25	Ácido salicílico a 0,25%	<i>P. cepacia</i>	6,5	5,5	5,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
25	Ácido salicílico a 0,25%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,5	6,4	6,5	6,0	5,6
26	Ácido salicílico a 0,50%	<i>P. cepacia</i>	6,5	5,1	2,9	< 1,0	< 1,0	< 1,0
26	Ácido salicílico a 0,50%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,5	6,5	6,4	4,8	3,1
27	Ácido salicílico a 0,75%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
27	Ácido salicílico a 0,75%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,5	6,6	6,6	4,5	< 1,0
28	Ácido salicílico a 1,00%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
28	Ácido salicílico a 1,00%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,5	5,8	2,0	< 1,0	< 1,0
29	Ácido salicílico a 1,25%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
29	Ácido salicílico a 1,25%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,2	5,3	< 1,0	< 1,0	< 1,0
30	Ácido salicílico a 1,50%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
30	Ácido salicílico a 1,50%	<i>S. marcescens</i>	6,6	6,2	4,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
31	Ácido salicílico a 1,75%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
31	Ácido salicílico a 1,75%	<i>S. marcescens</i>	6,6	5,6	2,7	< 1,0	< 1,0	< 1,0
32	Ácido salicílico a 2,00%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
32	Ácido salicílico a 2,00%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

Prep = preparação

TABELA XIII Equações da reta, coeficientes de correlação e valores de D obtidos pelo método da regressão linear ⁹⁸ para as preparações 7 a 14

Prep	Conservante e Concentração	Microrganismo	Valor de D (horas)	Equação da Reta	R
7	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	0,63	$Y = -1,600 X + 8,100$	-1,000
7	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	0,95	$Y = -1,050 X + 6,600$	-1,000
8	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,025%	<i>P. cepacia</i>	0,91	$Y = -1,100 X + 7,600$	-1,000
8	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,025%	<i>S. marcescens</i>	1,00	$Y = -1,000 X + 7,067$	-0,927
9	Hidroxi metilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	0,36	$Y = -2,750 X + 6,500$	-1,000
9	Hidroxi metilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	NC	$Y = -0,030 X + 5,675$	-0,589
10	Hidroxi metilglicinato de Sódio a 0,125%	<i>P. cepacia</i>	1,05	$Y = -0,950 X + 6,500$	-1,000
11	Hidroxi metilglicinato de Sódio a 0,50%	<i>S. marcescens</i>	2,86	$Y = -0,350 X + 6,600$	-1,000
12	Metilparabeno a 0,200%	<i>P. cepacia</i>	2,08	$Y = -0,480 X + 6,580$	-0,991
12	Metilparabeno a 0,200%	<i>S. marcescens</i>	NC	$Y = -0,071 X + 6,400$	-0,892
13	Metilparabeno a 0,300%	<i>S. marcescens</i>	NC	$Y = -0,004 X + 6,684$	-0,372
14	Metilparabeno a 0,400%	<i>S. marcescens</i>	8,47	$Y = -0,118 X + 6,752$	-0,912

NC = Não calculado; R = coeficiente de correlação; Prep = preparação

TABELA XIV Equações da reta, coeficientes de correlação e valores de D obtidos pelo método da regressão linear ⁹⁸ para as preparações 15 a 18

Prep	Conservante e Concentração	Microrganismo	Valor de D (horas)	Equação da Reta	R
15	Metil e Propilparabeno a (0,18 e 0,02%)	<i>P. cepacia</i>	NC	$Y = -0,179 X + 4,964$	-0,847
15	Metil e Propilparabeno a (0,18 e 0,02%)	<i>S. marcescens</i>	5,00	$Y = -0,200 X + 6,319$	-0,965
16	Metil e Propilparabeno a (0,16 e 0,04%)	<i>P. cepacia</i>	NC	$Y = -0,169 X + 4,900$	-0,822
16	Metil e Propilparabeno a (0,16 e 0,04%)	<i>S. marcescens</i>	4,83	$Y = -0,207 X + 6,572$	-0,965
17	Fenoxietanol e 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,050%	<i>P. cepacia</i>	1,33	$Y = -0,750 X + 6,300$	-0,949
17	Fenoxietanol e 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,050%	<i>S. marcescens</i>	0,87	$Y = -1,150 X + 7,033$	-0,951
18	Fenoxietanol e 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,025%	<i>P. cepacia</i>	1,03	$Y = -0,975 X + 6,717$	-0,982
18	Fenoxietanol e 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano 0,025%	<i>S. marcescens</i>	1,25	$Y = -0,800 X + 6,933$	-0,941

NC = Não calculado; R = coeficiente de correlação; Prep = preparação

TABELA XV Equações da reta, coeficientes de correlação e valores de D obtidos pelo método da regressão linear ⁹⁸ para as preparações 25 a 32

Prep	Conservante e Concentração	Microrganismo	Valor de D (horas)	Equação da Reta	R
25	Ácido salicílico a 0,25%	<i>P. cepacia</i>	2,67	$Y = -0,375 x + 6,417$	-0,982
25	Ácido salicílico a 0,25%	<i>S. marcescens</i>	48,78	$Y = -0,0021 X + 6,561$	-0,984
26	Ácido salicílico a 0,50%	<i>P. cepacia</i>	1,11	$Y = -0,900 X + 6,633$	-0,992
26	Ácido salicílico a 0,50%	<i>S. marcescens</i>	13,14	$Y = -0,076 X + 6,740$	-0,994
27	Ácido salicílico a 0,75%	<i>P. cepacia</i>	0,36	$Y = -2,750 x + 6,500$	-1,000
27	Ácido salicílico a 0,75%	<i>S. marcescens</i>	11,10	$Y = -0,913 X + 6,654$	-0,947
28	Ácido salicílico a 1,00%	<i>P. cepacia</i>	0,36	$Y = -2,750 x + 6,500$	-1,000
28	Ácido salicílico a 1,00%	<i>S. marcescens</i>	1,67	$Y = -0,599 X + 7,320$	-0,939
29	Ácido salicílico a 1,25%	<i>P. cepacia</i>	0,36	$Y = -2,750 x + 6,500$	-1,000
29	Ácido salicílico a 1,25%	<i>S. marcescens</i>	3,08	$Y = -0,325 X + 6,683$	-0,976
30	Ácido salicílico a 1,50%	<i>P. cepacia</i>	0,36	$Y = -2,750 x + 6,500$	-1,000
30	Ácido salicílico a 1,50%	<i>S. marcescens</i>	1,54	$Y = -0,650 X + 6,900$	-0,929
31	Ácido salicílico a 1,75%	<i>P. cepacia</i>	0,36	$Y = -2,750 x + 6,500$	-1,000
31	Ácido salicílico a 1,75%	<i>S. marcescens</i>	1,03	$Y = -0,975 X + 6,983$	-0,947
32	Ácido salicílico a 2,00%	<i>P. cepacia</i>	0,36	$Y = -2,750 x + 6,500$	-1,000
32	Ácido salicílico a 2,00%	<i>S. marcescens</i>	0,36	$Y = -2,800 X + 6,600$	-1,000

NC = Não calculado; R = coeficiente de correlação; Prep = preparação

TABELA XVI Logarítmo decimal do número de microrganismos sobreviventes em UFC/mL nos intervalos de tempo especificados pelos métodos oficiais da BP 93 ²¹ e do CTFA ³² para as preparações 7 a 14

Prep	Conservante e Concentração	Microorganismo	Tempo (dias)					
			0	2	7	14	21	28
7	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
7	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
8	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,025%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
8	2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,025%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
9	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
9	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,250%	<i>S. marcescens</i>	6,6	4,6	5,0	5,0	6,1	6,0
10	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,125%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
11	Hidroximetilglicinato de Sódio a 0,50%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
12	Metilparabeno a 0,200%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
12	Metilparabeno a 0,200%	<i>S. marcescens</i>	6,9	3,6	3,7	6,9	7,0	6,8
13	Metilparabeno a 0,300%	<i>S. marcescens</i>	6,9	6,6	6,5	6,4	6,7	6,6
14	Metilparabeno a 0,400%	<i>S. marcescens</i>	6,9	6,2	6,4	6,2	6,1	6,2

— não foi analisado; Prep = preparação

TABELA XVII Logaritmo decimal do número de microrganismos sobreviventes em UFC/mL nos intervalos de tempo especificados pelos métodos oficiais da BP 93²¹ e do CTFA³² para as preparações 15 a 18

Prep	Conservante e Concentração	Microorga- nismo	Tempo (dias)					
			0	2	7	14	21	28
15	Metil e Propilparabeno a (0,18 e 0,02%)	<i>P. cepacia</i>	6,5	<1,0	—	—	—	<1,0
15	Metil e Propilparabeno a (0,18 e 0,02%)	<i>S. marcescens</i>	6,9	<1,0	—	—	—	<1,0
16	Metil e Propilparabeno a (0,16 e 0,04%)	<i>P. cepacia</i>	6,5	<1,0	—	—	—	<1,0
16	Metil e Propilparabeno a (0,16 e 0,04%)	<i>S. marcescens</i>	6,9	<1,0	—	—	—	<1,0
17	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,050%	<i>P. cepacia</i>	6,5	<1,0	—	—	—	<1,0
17	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,050%	<i>S. marcescens</i>	6,6	<1,0	—	—	—	<1,0
18	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,025%	<i>P. cepacia</i>	6,5	<1,0	—	—	—	<1,0
18	Fenoxietanol e 1,2-dibromo- 2,4-dicianobutano 0,025%	<i>S. marcescens</i>	6,6	<1,0	—	—	—	<1,0

---- não foi analisado; Prep = preparação

TABELA XVIII Logaritmo decimal do número de microrganismos sobreviventes em UFC/mL nos intervalos de tempo especificados pelos métodos oficiais da BP 93 ²¹ e do CTFA ³² para as preparações 25 a 32

Prep	Conservante e Concentração	Microrga- nismo	Tempo (dias)					
			0	2	7	14	21	28
25	Ácido salicílico a 0,25%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
25	Ácido salicílico a 0,25%	<i>S. marcescens</i>	6,6	5,6	< 1,0	—	—	< 1,0
26	Ácido salicílico a 0,50%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
26	Ácido salicílico a 0,50%	<i>S. marcescens</i>	6,6	3,1	< 1,0	—	—	< 1,0
27	Ácido salicílico a 0,75%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
27	Ácido salicílico a 0,75%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
28	Ácido salicílico a 1,00%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
28	Ácido salicílico a 1,00%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
29	Ácido salicílico a 1,25%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
29	Ácido salicílico a 1,25%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
30	Ácido salicílico a 1,50%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
30	Ácido salicílico a 1,50%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
31	Ácido salicílico a 1,75%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
31	Ácido salicílico a 1,75%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0
32	Ácido salicílico a 2,00%	<i>P. cepacia</i>	6,5	< 1,0	—	—	—	< 1,0
32	Ácido salicílico a 2,00%	<i>S. marcescens</i>	6,6	< 1,0	—	—	—	< 1,0

— não foi analisado; Prep = preparação

RESUMO

O xampu com cetoconazol 2% (p/v) é um dos produtos utilizados no tratamento da caspa. Esta preparação apresenta propriedades antimicrobianas resultantes não somente da atividade do próprio princípio ativo, mas também de conservantes que estão, geralmente, presentes nos tensoativos, matérias-primas de xampus. Neste trabalho, verificou-se a necessidade ou não da adição de sistemas conservantes em xampus com cetoconazol, preparados com tensoativos provenientes de 3 fabricantes. As preparações foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana pelo teste de desafio, segundo método da regressão linear e o oficial, frente aos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas cepacia* ATCC 17759, *Candida albicans* ATCC 10321, *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Malassezia furfur* ATCC 14521, e também pelo teste de uso. Foram detectadas diferenças de atividade antimicrobiana nos tensoativos de diferentes procedências. Todas as preparações foram consideradas adequadamente conservadas, tanto pelas especificações do método da regressão linear como pelas do método oficial. Entretanto, o teste de uso indicou a necessidade de adição de sistemas conservantes, pois uma das amostras apresentou contaminação, sendo o microrganismo identificado como *Serratia marcescens*. Este microrganismo e o *Pseudomonas cepacia*, foram utilizados para os estudos desafios posteriores para seleção de conservantes. Aqueles a serem incorporados no xampu foram selecionados

previamente pelo teste de desafio, realizado em soluções contendo a metade da concentração máxima permitida da substância. Aqueles incluídos nos xampus foram: hidroximetilglicinato de Sódio 0,125, 0,500 e 0,250% (v/v), metilparabeno 0,20, 0,30 e 0,40% (p/v), metilparabeno associado ao propilparabeno nas concentrações de 0,18 com 0,02% e 0,16 com 0,04% (p/v), fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,025 e 0,050% (v/v), 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,025 e 0,050% (p/v) e ácido salicílico a 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75 e 2,00% (p/v). Todas as preparações foram consideradas adequadamente conservadas frente a *Pseudomonas cepacia*, de acordo com a especificação tanto do método de regressão linear como a do método oficial. Entretanto, em relação à *Serratia marcescens*, aquelas com metilparabeno e ácido salicílico, em concentração inferior a 0,5%, não atenderam ao critério de aceitação do método oficial. Na avaliação pelo método da regressão linear, além destas, as preparações com hidroximetilglicinato de Sódio a 0,25%, metilparabeno associado ao propilparabeno e aquelas com ácido salicílico até 0,75% também não atenderam as especificações. As preparações contendo 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05%, ácido salicílico 2,00% e fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05%, que apresentaram eficácia antimicrobiana adequada, foram submetidas ao teste de uso e ao teste de estabilidade do cetoconazol. Todas as amostras foram aprovadas no teste de uso, entretanto na preparação contendo 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol a 0,05% o princípio ativo não foi estável.

Os xampus com fenoxietanol associado a 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano a 0,05% e com ácido salicílico a 2% foram consideradas as preparações mais adequadas entre as testadas.

SUMMARY

One of the products used for the dandruff treatment is the shampoo with ketoconazole 2%. The antimicrobial properties of this kind of preparation are result of the activity of the active ingredient and the activity of the preservatives, usually present into the surfactants, raw materials of shampoos. In this study, shampoos with ketoconazole, prepared with surfactants obtained from 3 manufacturers, were evaluated in relation to the requirement for the preservative system. The antimicrobial activity of the preparations was evaluated by challenge tests, using the linear regression method and the official method, and by an in-use test. The microorganisms tested were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas cepacia* ATCC 17759, *Candida albicans* ATCC 10321, *Aspergillus niger* ATCC 16404 and *Malassezia furfur* ATCC 14521. The preparations were considered well preserved by the data obtained from the tests, according to the criteria of the linear regression method and according to the official method. However, when the in-use test was performed, one sample showed to be contaminated with *Serratia marcescens*, indicating the necessity of the inclusion of preservatives in the formula. This bacteria and *Pseudomonas cepacia* were used in the challenge tests for the preservative studies. In order to select the preservatives to be included in the shampoos, challenge tests were performed with solutions of these compounds. The selected preservatives included into the shampoos were: sodium hydroxymethylglycinate 0,125, 0,25

e 0,50% (v/v), methylparaben 0,20, 0,30 e 0,40% (p/v), methylparaben 0,18 e 0,16% associated with propylparaben 0,02 and 0,04% (p/v), phenoxyethanol associated with 1,2-dibromo-2,4-dicianobutane at 0,025 and 0,05%, 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol 0,025 and 0,05% (v/v) and salicylic acid 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75 and 2,00% (p/v). The challenge test performed with the preparations added with these preservatives showed that all of them were well preserved from the data obtained against the *Pseudomonas cepacia*, according to the requirements of the official method. On the other hand, the shampoo with methylparaben and other ones containing less than 0,5% of salicylic acid did not attend the official specification, when *Serratia marcescens* was tested. The data from the linear regression method showed that these preparations and shampoos with sodium hydroxymethylglycinate 0,25%, with methylparaben associated to propylparaben and that with salicylic acid 0,75% were not well preserved. Shampoos with 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol 0,05%, with salicylic acid 2,0% and other one with phenoxyethanol associated to 1,2-dibromo-2,4-dicianobutane 0,05%, that had showed effective preservative system, were submitted to the in-use test. The ketoconazole stability was evaluated in these samples. Nevertheless the ketoconazole was not stable in shampoo with 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol 0,05%, all the three preparations passed in the in-use test. The shampoos with phenoxyethanol associated to 1,2-dibromo-2,4-dicianobutane 0,05% and that one with salicylic acid 2,00% were considered the most suitable preparations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOUNASSIF, M.A., EL-SHAZLY, B.M. Di-diferential potentiometric and H-NMR spectrometric determinations of ketoconazole and its formulations. *Anal. Lett.*, New York, v.22, p.2233-2247, 1989.
2. ACKERMAN, A.B., KLIGMAN, A.M. Some observations on dandruff. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 20, p. 81-101, 1969.
3. AKERS, M.J. Official methods of preservative evaluation and testing. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. v.1, p. 292-303.
4. ALEXANDER, S. Do shampoos affect dandruff? *Br. J. Dermatol.*, London, v. 97, p. 92-95, 1967.
5. ALEXANDER, S. Loss of hair and dandruff. *Br. J. Dermatol.*, London, v. 97, p. 549-552, 1967.
6. AL-MESHAL, M.A. Determination of ketoconazole in plasma and dosage forms by high performance liquid chromatography and a microbiological method. *Anal. Lett.*, New York, v.22, n. 10, p.2249-2263, 1989.
7. ALTON, K.B. Determination of the antifungal agent ketoconazole in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam., v. 221, p.337-344, 1980.

8. ANDREWS, F.A., PETERSON, L.R., BEGGS, W.H., CRANKSHAW, D., SAROSI, G.A. Liquid chromatography assay of ketoconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.19, n.1, p.110-113, 1981.
9. AREVALO, M.P., ARLAS, A., ANDREW, A., ROFRIGUEZ, C., SIERRA, A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole *in vitro* activity against *Candida spp.* *J. Chemother.*, Florence, v. 6, n. 4, p. 226-229, 1994.
10. ARTICO, M., STAFNACICH, G., SILVESTRI, R., MASSA, S., APUZZO, G., SIMONETI, G. Research on antibacterial and antifungal agents. 16. synthesis and antifungal activities of 1- α -(1-naphthyl)- benzyl imidazolole derivatives and related 2-naphthyl isomers. *Eur. J. Med. Chem.*, Paris, v. 27, n. 7, p. 693-699, 1992.
11. BADCOCK, N.R. Microdetermination of ketoconazole in plasma or serum by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 306, p.436-440, 1984.
12. BERKE, P.A., ROSEN, W.E. Germall II: a new broad-spectrum cosmetic preservative. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 97, n. 6, p. 49-53, 1982.
13. BERKE, P.A., ROSEN, W.E., STEINBERG, D.C. Protecting shampoos with two new preservatives. *Cosmet. Technol.*, Feb., p. 9-12, 1983. [Fotocópia].
14. BERKE, P.A., STEINBERG, D.C., ROSEN, W.E. Germaben II: a complete preservative system in clear liquid form. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 97, n. 11, p. 89-93, 1982.
15. BOIRON, P., DROUHET, E., DUPONT, B., IMPROVISI, L. Effect of pH on the mode of action of ketoconazole in *Candida albicans*. *Proc.Int.Simp.:In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents* p.135-142. 1985. Apud: *Chem. Abstr.*, Columbus, v.1457, abstr.206058v, 1985

16. BONADEO, I. *Cosmetica, ciencia y tecnologia*. Madrid: Ciencia, 1982. p. 383-392.
17. BOOTS COMPANY PLC. *Bronopol: a broad spectrum antibacterial agent*. Nottingham: Boots Microcheck, 1992. 42p.. [Technical Bulletin, n. 6, Feb., 1992].
18. BRANDÃO, L. *Index ABC: ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes*. São Paulo. SRC., 1996. 359p.
19. BRANNAN, D.K. Cosmetic preservation. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 46, p.199-220, 1995.
20. BRASIL. Leis, Decretos, etc... Portaria n. 108 de 26 de Setembro de 1994. Classifica os produtos em cosméticos, de higiene, perfumes e estabelece os limites para seus sistemas conservantes e dá outras providências. In: TEXTOS Legais. *Bol. IOB*, 41/94, p. TL1059-TL1074. [Fotocópia]
21. BRITISH pharmacopoea 1993. London: Her Majestys Stationery Office, 1993.
22. BRYCE, D. M. CROSHAW, B. HALL, J.E. HOLLAND, V.R. LESSEL, B. The activity and safety of the antimicrobial agent Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol). *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 29, p.3-24, 1978.
23. BUTTERFIELD, W., ROBERTS, M.M., DAVE, V.K. Sensitivities of *Pityrosporum sp* to selected commercial shampoos. *Br. J. Dermatol.*, London, v. 116, p. 233-235, 1987.
24. CAGLIANI, I. Moderni sistemi di preservazione in forme cosmetiche. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v.124, p. 357-365, 1985.
25. CARISON, J.A., MANN, H.J., CANAFAX, D.M. effect of pH on Disintegration and dissolution of ketoconazole tablets. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v. 40, p.1334-1336, 1983.

26. CARR, M.M., PRYCE, D.M., IVR, F.A. Treatment of seborreic dermatitis with ketoconazole: I. Reponse of seborrheic dermatitis of the scalp to topical ketoconazole. *Br. J. Dermatol.*, London, v. 116, p.213-216, 1987.
27. COASTS, D. Interaction between preservatives and surfactants. *Manuf. Chem. Aerosol News*, London, v.44, n.8, p.41-42, 1973.
28. CONNONLY, P., BLOOMFIELD, S.F., DENYER, S.P. A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics. *J. Appl. Bacteriol.*, Baltimore, v.75, p.456-462, 1993.
29. COSMETIC FORMULARY. Antimicrobial detergent compositions. *Am. Cosmet. Perfum.*, Oak Park, v. p.23-30, 1972.
30. COSMETIC preservatives encyclopedia: antimicrobials. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.102, n. 12, p.25-39, 1987.
31. CROSHAW, B. Preservatives for cosmetics and toiletries. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 28, p.3-16, 1977.
32. CTFA Microbiology guidelines. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, p 1-2, 1993.
33. DAVISON, A.L. Microbial standards for pharmaceuticals. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. v.1, p. 356-365.
34. DECKER, R.L., WENNINGER, J.A. Frequency of preservative use in cosmetic formulas as disclosed to FDA - 1987. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 102, n. 12, p.21-24, 1987.
35. ELLIS, D. JARUNEN, A., HANSMAN, D. Effect of pH on *in vitro* antifungal drug sensitivity testing. *Recent Adv.Chemother. Proc Int.Congr.Chemother.* p.2554-2555. 1985. Apud: *Chem. Abstr.*, Columbus, v. 1457, abstr. 206217w, 1986
36. EUROPEAN pharmacopoea. Paris. Maisonneuve, v. 8, part 17, 1994.

37. FAEGERMANN, J. Activity of triazole derivatives against *Pityrosporum orbiculare* *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York, v.544, p.348-353, 1988.
38. FAERGEMANN, J. *In vitro* and *in vivo* activities of ketoconazole and itraconazole against *Pityrosporum Orbiculare*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 26, n. 5, p. 773-774, 1984.
39. FARMACOPÉIA brasileira, 3. ed., p.1126-1128, Editora Organização Andriosa S.A., 1977
40. FEAD, W.A. Water, waste and working clean. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 3, n. 4, p. 19-20, 1971.
41. FEDERATION INTERNATIONALE PHARMACEUTIQUE (FIP). The test for effectiveness of antimicrobial preservation of pharmaceuticals. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*. New York: Marcel Dekker, 1984. v. 1, p. 423-440. [3rd. Joint Report of the Committee of Laboratories and Drug Control Services and the Section of Industrial Pharmacists].
42. FINKELSTEIN, P. LADEN, K. An objective method for evaluation of dandruff severity. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 19, p. 669-673, 1968.
43. FORD, G.P., FARR, P.M., IVE, F.A., SHUSTER, S. The response of seborrheic dermatitis to ketoconazole. *Br. J. Dermatol.*, London, v. 111, p. 603-607, 1987.
44. FRANCES, H. The effect of microorganisms on product stability and appearance. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 2, p. 23-24, 1971.

45. FUJITA, H., MATAKI, Y., DEGUCHI, T., MORI, I., YAMAMOTO, F., ITO, T., NAGAI, T. Skin kinetics of ketoconazole and antigungal agents, absorption, distribution and excretion of 3-H-ketoconazole and 14-CO-ketoconazole in rats and rabbits. *Yakuri to Chiryō*, v.19, n. 5, p.1845-1855, 1991. Apud: *Chem. Abstr.*, Columbus, v.1825, abstr. 126341y, 1991.
46. FUTTERER, E. Antidandruff hair tonic containing piroctone olamine. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 103, n. 2, p.49-52, 1988.
47. FUTTERER, E. Evaluation of efficacy of dandruff agents. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 32, p. 327-338, 1981.
48. GERSTEIN, T. Antidandruff preparations: scientific and regulatory considerations. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 96, n. 7, p.45-47, 1981.
49. GOLDMAN, C.L. Adequate preservation of cosmetic products. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 1, p. 6-7, 1971.
50. GOLDSCHMIT, H. KLIGMAN, A.M. Increased sebum secretion following selenium sulfide shampoos. *Acta Dermatol. Venereal. V.* 48, p. 488-491, 1968.
51. GOSSE, R.M., VANDERWYK, R.W. The relationship of a Nystatin-Resistant Strain of *Pityrosporum ovale* to Dandruff. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 20, p. 603-613, 1969.
52. GREEN, C.A. FARR, P.M. SHUSTER, S. Treatment of Seborreic dermatitis with ketoconazole: II. Reponse of seborrheic dermatitis of the face, scalp and trunk to topical ketoconazole. *Br. J. Dermatol.*, London, v. 116, p.217-221, 1987.
53. GROOT, A.C., BOS, J.D. Preservatives in the european standard series for epicutaneous testing. *Br. J. Dermatol.*, London, v. 116, p.289-292, 1987.
54. GUIA ABC Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de H.P., Cosméticos e Perfumes. P. 53-59, 1998.

55. HALL, A.L. Cosmetically acceptable phenoxyethanol. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*. New York: Marcel Dekker, 1984. V. 1, p. 79-108.
56. HARRIS, R., JONES, H.E., ARTIS, W.N. Orally adm. ketoconazole: route of delivery to the human stratum corneum. *Antimicrob. Agents.Chemother.*, Washington, v. 24, n. 6, p.876-882, 1983.
57. HARRY, R.G. *The principles and practice of modern cosmetics*. London: Leonard Hill Books, 1962. v. 1, cap. 19, p.300-340.
58. HEERES, J., BACKX, L.J.J., MOSTMANS, J.H. CUTSEM, V. Antimycotic imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally ctive broad-spectrum antifungal agent. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 22, n. 8, p. 1003-1005, 1979.
59. HEERES, J., deBRABANDER, M., VANDENBOOSCHE, H. Ketoconazole: chemistry and basis for selectivity. *Curr. Chemother. Immunother.*, Florence, v. 2, p. 1007-1009, 1982.
60. HENRY, M. Product microorganisms, their significance, level and recall methodology. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 2, p. 22-23, 1971.
61. HOFFMAN, D.W., JONES-OKING, K.L., RAVARIS, C.L., EDKINS, R.D. Eletrochemical detection for high performance liquid chromatography of ketoconazole in plasma and saliva. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v.172, p.495-498, 1988.
62. HUGBO, P.G. Additivity and synergism in vitro as displayed by mixtures of some commonly employed antibacterial preservatives. *Cosmet. Toilettries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p. 52, 55-56, 1977.
63. HUME, A.L., KERKERING, T.M. New drug evaluations: ketoconazole. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, Hamilton, v. 17, p. 169-174, 1983.
64. IMOKAWA, G., OKAMOTO, K. Antimicrobial effect of zinc pirthione. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 33, p. 27-37, 1982.

65. IMOKAWA, G., SHIMIZU, H., OKAMOTO, K. The effect of zinc pirithione on human skin cells *in vitro*. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 34, p. 1-11, 1983.
66. JASS, H.E. OTC drug products for the control of dandruff, seborrheic dermatitis and psoriasis. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 98, n. 2, p.64-69, 1983.
67. JASS, H.E. Antidandruff preparations: Formulation and evaluation considerations. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 96, n. 7, p.49-55, 1981.
68. JENKINS, J.W. The preservation of cosmetics products. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 3, n. 4, p. 17-19, 1971.
69. KABARA, J.J. Cosmetic preservation: the problems and the solutions. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*. New York: Marcel Dekker, 1984. v.1, p. 3-6.
70. KABARA, J.J. Composition and structure of microorganismos. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*. New York: Marcel Dekker, 1984. v.1, p. 21-27.
71. KENNEY, D. Pretreatment of the hair before shampooing with anionic shampoo. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 94, n. 11, p.27-28, 1979.
72. KETOCONAZOLE. *ACOFAR*, Madrid, v. 27, p. 40, March, 1988.
73. KLIGMAN, A.M., MCGINLEY, K.J., LEYDEN, J.J. The nature of dandruff. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 27, p. 111-139, 1976.
74. KRACMAR, J., KRACMAROVA, J. Ultraviolet spetrophotometric in drug control XIX. New pharmaceuticals with in the molecules. Part 4: Effect of substitution and solventes. *Pharmazie*, v. 38, n. 8, p. 524-7, 1983.
75. KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. The yeasts – a taxonomy study. Elsevia, 1998, 1055p.
76. LANZET, M. The devlopment and evaluation of cosmetic preservation systems. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 1, p. 4-6, 1971.

77. LORENZ, P. 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane: a preservative for cosmetics. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p.88-91, 1977.
78. MADDEN, J.M. JACKSON, G.J. Cosmetic preservation and microbes: viewpoint of the Food and Drug Administration. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 96, n. 10, p. 75-77, 1981.
79. MARCON, M.J. BURREL, D.E. POWELL, D.A. BUESCHING, W.J. In vivo activity of systemic antifungal agents against *Malassezia furfur*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 31(6), p. 951-3, 1987. Apud: Chem. Absts. Columbus, v. 1514, abstr 36493e.
80. MAROUCHOC, S.R. Properties of Dowcil 200 preservative. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p. 91-93, 1977.
81. MARPLES, R.R. Likely health hazards from different types of microorganisms. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 2, p. 24-26, 1971.
82. MARTIDALE, W.H. *The extra pharmacopoea*. 28. ed. London: Pharmaceutical Press, 1982. p. 326-328, 754-772, 1132-1139
83. MARUSZEWSKI, A. Formulating adequately preserved cosmetics. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 1, p. 2-4, 1971.
84. MARZULLI, F.N., MAIBACH, H.I. Antimicrobials: experimental contact sensitization in man. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 24, p.399-421, 1973.
85. McCARTHY, T.J. Formulated factors affecting the activity of preservatives. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*. New York: Marcel Dekker, 1984. v.1, p. 359-388.
86. McCARTHY, T.J., MYBURGH, J.A., BUTLER, N. Further studies on the influence of the formulation on preservative activity. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p.33-36, 1977.
87. MERCK index. 11. ed. Rahway, 1989. p. 476, 835, 1153, 1271, 1338.

88. MULBERRY, G.K., ENTRUP, M. R., AGIN, J.R. Rapid screening methods for preservative efficacy evaluations. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.102, n.12, p.47-54, 1987.
89. MUSCATIELLO, M.J., PENICKNAC, A.J. Historical perspective os cosmetic microbiology. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.101, n. 12, p.47-50, 1986.
90. NERY, M.M.F. *Determinação analítica do cetoconazol em medicamentos*. São Paulo, 1994. 119p [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].
91. O'NEILL, J.J., MEAD, C.A. The parabens: bacterial adaptation and preservative capacity. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 33, p.75-84, 1982.
92. OHARA, M.T. *Aplicação do cloreto de trifeniltetrazólio no teste de limite microbiano em medicamentos e cosméticos*. São Paulo, 1992. 212 p. [Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].
93. OLSON, J. Recalls from the perspective of the Food and Drug Administration. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 2, p. 26-28, 1971.
94. ORENTREICH, N. A clinical evaluation od two shampoos in the treatment of seborrheic dermatitis. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 23, p. 189-194, 1972.
95. ORENTREICH, N., TAYLOR, E.H., BERGER, R.A., AUERBACH, R. Comparative study of two antidandruff preparations. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 58, p. 1279-1280, 1964.
96. ORTH, D.S. Establishing cosmetic preservative efficacy by use of D-Values. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 31, p.165-172, 1980.
97. ORTH, D.S. Evaluation of preservative in cosmetics products. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*. New York: Marcel Dekker ,1984. v.1, p. 403-421.

98. ORTH, D.S. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 30, p.321-332, 1979.
99. ORTH, D.S. Preservative evaluation and testing: the linear regression method. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. v.1, p. 304-312.
100. ORTH, D.S. Principles of preservation. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. v.1, p. 241-250.
101. ORTH, D.S., BARLOW, R.F., GREGORY, L.A. Evaluating product preservation in relation to packaging and consumer use/abuse. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.107, n.12, p.39-43, 1992.
102. ORTH, D.S., BRUEGGEN, L.R. Rechallenge testing and reability of the linear regression method. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.97, n.5, p.61-65, 1982.
103. ORTH, D.S., LUTES, C.M., MILSTEIN, S.R., ALLINGER, J.J. Determination of shampoo presevative stability and apparent activation energies by the linear regression method of preservative efficacy testing. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 38, p.307-319, 1987.
104. PASCUCCI, V.L., BENNETE, J., NARANG, P.K., CHATTERJI, D.C. Quantification of ketoconazole in biological fluids using high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 72, n. 12, p. 1467-1469, 1983.
105. PAULSON, S.D. Calculating D-values for steam sterilization process. *Med. Device Diagn. Ind.*, Santa Monica, v. 17, n. 5, p.198-204, 1995.
106. PEETERS, O.M., BLATON, N.M., DE BRANDER, C.J. Ketoconazole: a crystal structure with disorder. *Acta Crystallogr. Sect B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, v. B35, n. 10, p. 2461-2464, 1979.

107. PIÉRARD, G.E. Method and pharmaceutical composition of ketoconazole for treating alopecia. *PCT Int. Appl. WO 92. 00057*. 1992. 16p. Apud: *Chem. Abstr.*, Columbus, v. 1964, abstr. 113561r, 1992.
108. PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. ARRESE, J.E. PIÉRARD, G.E. Sebum flow dynamics and antidandruff shampoos. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.48 (March/April), p. 117-121, 1977.
109. PLEWIG, G., KLIGMAN, A.M. The effect of selenium sulfide on epiderman turnover of normal and dandruff scalps. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 20, p. 767-775, 1969.
110. POUCHER, W.A. *Perfums cosmetics and soaps*. 8. ed. London: Chapman and Hall, 1974. v. 3, cap. 6, p.89-133.
111. PRESERVATIVE properties of bronopol. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p.87-88, 1977.
112. PRICE, N.C.S. 50 Years of surfactants - cosmetic cleansing and emulsions. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 110, n. 12, p.49-66, 1995.
113. PROSERPIO, G. Antimicrobici cutanei nei prodotti cosmetici antiforfora, deodoranti, dermopurificanti. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v. 124, p. 347-355, 1985.
114. RICHARD, G., GATAUD, P., ARNAUD, J.C., BORÉ, P. Quantitative analysis of preservatives using thin-layer chromatography. In: BORÉ, P., ed. *Cosmetic analysis: selective methods and techniques*. 1985. v. 4, p.157-181
115. RICHARDSON, E.L. Preservatives: frequency of use in cosmetic formulas as disclosed to FDA. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p. 85-86, 1977.
116. ROIA, F.C., VANDERWICK, R.W. Resident microbial flora of the human scalp and Its relationship to dandruff. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 20, p. 113-134, 1969.

117. ROSEN, M., McFARLAND, A.G. Free formadehyde in anionic shampoos. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 35, p.157-169, 1984.
118. ROSEN, W.E., BERKE, P.A. Germall 115- a safe and effective modern cosmetic preservative. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p.88-89, 1977.
119. ROSENBERG, E.W., BELEW, P.W. Topical treatment of psoriasis with imidazole antibiotics. *US Appl. 363.845*. 1982. 3p. Apud: *Chem. Abstr.*, Columbus, v. 1422, abstr. 180219a, 1986.
120. SCHANNO, R.J., WESTLUND, J.R., FOELSCH, J.R. Evaluation of 1,3-dimethylol-5,5'-dimethyl hydantoin as a cosmetic preservative. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 31, p. 85-96, 1980.
121. SHAZ, R.Z., SUDGEN, J.K. Some aspects of the role of *Pityrosporum ovale* in Dandruff. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v. 51, p. 209-211, 1976.
122. SHUSTER, S. The aetiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents. *Br. J. Dermatol.*, London, v. 111, p.235-242, 1984.
123. SMITH, W.P. Cosmetic preservation: a survey. Adverse reactions, consumer perception, future directions. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 108, n. 10, p. 67-75, 1993.
124. SPOOR, H. Antidandruff preparations. In: SAGARIN, E., ed. *Cosmetics, science and technology*. New York: Interscience, 1957. v. 1, p. 641-649.
125. STEINBERG, D. Cosmetic preservation: current international trends. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 107, n. 9, p. 77-82, 1992.
126. SUTTON LABORATORIES. *Germaben II, Germall II*. Jul. 1987. p.1-20, 1-26. [Catálogo].
127. SUTTON LABORATORIES. *Preservative for personal care products: Germall 115, Germall II, Liquapar Oil, Suttocid A*, s.d. [Catálogo].

128. SWEZEY, S.F., GIACOMINI, K.M., ABANG, A., BRASS, C., STEVENS, D.A., BLASCHKE, T.F. Measurement of ketoconazole, a new antifungal agent, by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 227, p.510-515, 1982.
129. TENENBAUM, S. Considerations leading to the development of the microbial limits guidelines of the CTFA. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p.79-83, 1977.
130. TENENBAUM, S. The CTFA microbial limit guidelines. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 4, n. 2, p. 28-30, 1971.
131. TENTATIVE final monographs issued for dandruff, seborrhea, psoriasis products among others. *Am. Pharm.*, Washington, v. 26, n.10, p. 40-41, 1982.
132. THIEPONT, D. CUTSEN, J.V. GERVEN, F.V. HEERES, J. JANSEN, P.A.J. Ketoconazole: a new broad spectrum orally active antimycotic. *Experientia*, Basel, v.35, p.606-607, 1978.
133. TROLLER, A.J. Model system for the investigation of dandruff. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v22, p. 187-198, 1971.
134. UNITED States pharmacopoeia 23.ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 1995. p. 1681, 1682-1686, 1687-1690.
135. VAN DOORNE, H. Interaction between preservative and pharmaceuticals components. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. v.1, p. 274-291.
136. VANDERWIK, R., ROIA, F.C. The relationship between dandruff and the microbial flora of the human scalp. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 15, p. 761-768, 1964.
137. VILAR, E.C. A actividade do piritionato de zinco como produto anti-caspa. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v. 38, n. 2, p. 1-4, 1988.

138. WALLHAUSSER, K.H. Antimicrobial preservatives used by the cosmetic industry. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*. New York: Marcel Dekker, 1984. v.1, p. 605-745.
139. WEDDERBURN, D.L. The use of antiseptics and germicides in toilet preparations. In: HIBBOTT, H.W., ed. *Handbook of cosmetic science*. London: Pergamon, 1963. Cap.21, p. 445-472.
140. WILSON, C.H. Some notes on the analysis of preservatives in cosmetics. *CTFA Cosmet. J.*, Washington, v. 3, n. 4, p. 8-10, 1971.
141. YABLONSKI, J.I. Strategies for cosmetic preservation. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p.22,24,26,31, 1977.
142. YABLONSKI, J.L., GOLDMAN, C.L. Microbiology of shampoos. *Cosmet. Perfum.*, Oak Park, v. 90, n. 3, p. 45-52, 1975.