



AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CONSERVANTE DE COMPOSTOS MULTIFUNCIONAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE BACTÉRIAS E LEVEDURAS

Palavras-Chave: CONSERVANTES, ÓLEOS ESSENCIAIS, ANTIMICROBIANOS

Autores(as):

THAIS LEITE DE BARROS, FCF – UNICAMP

ANA CAROLINA FURIAN DA SILVA, FCF - UNICAMP, Prof^(a). Dr^(a). KARINA COGO MÜLLER

INTRODUÇÃO:

Os produtos cosméticos são constituídos de água, compostos inorgânicos e orgânicos (*Cruz et al.; 2019*), sendo alguns destes fontes de nutrientes que podem estimular a proliferação microbiana. Todas as formulações estão sujeitas a contaminações por microrganismos (*Sousa et al.; 2021*) que podem acarretar no comprometimento da estabilidade, alterações físicas e químicas e/ou de aparência e inativação de componentes que afetam diretamente o desempenho do produto (*Silva; 2014*).

Com o intuito de minimizar o crescimento e ação destes microrganismos, são adicionadas às formulações substâncias com propriedades antimicrobianas, denominadas conservantes, que podem ser de origem natural ou sintética (*Cruz et al.; 2019*).

No Brasil, as substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são avaliadas pela RDC No 528, de 2021 e possuem a finalidade de inibir o crescimento de microrganismos durante a fabricação e estocagem ou proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso (*RDC No 528;2021; Toller; 1985*). Para avaliar a eficácia na estabilidade dos sistemas conservantes no prazo de validade estipulado, as Farmacopeias Brasileira, Americana, Européia e Japonesa recomendam a utilização do teste desafio conservante (Challenge test). Este consiste na inoculação de de microrganismos (bactérias, leveduras e bolores) a determinadas quantidades de produto. Desta forma, o produto farmacêutico é avaliado em tempos específicos (*Farmacopéia Brasileira; 6a edição, Halla et al; 2018, Russel; 2003*).

Apesar dos conservantes serem utilizados em concentrações bem pequenas nas formulações, eles têm sido apontados como um dos principais fatores causais de alergias nos usuários. Nesse sentido, os aditivos cosméticos multifuncionais como emolientes, surfactantes, ingredientes de fragrâncias, óleos essenciais, etc, com atividade antimicrobiana vem sendo utilizados em formulações cosméticas com o intuito de potencializar a preservação de produtos. Alguns aditivos multifuncionais e óleos essenciais podem apresentar efeito sinérgico quando associados, melhorando a estabilização antimicrobiana, qualidade de formulações cosméticas e diminuição da chance de

irritações cutâneas por produtos químicos (Bakkali et al, 2008; Kim et al, 2013; Alvarez-Rivera et al, 2018; Cho et al, 2020).

Com o atual projeto, pretendeu-se mensurar os efeitos antimicrobianos dos conservantes sintéticos de uso cosmético e os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum Zeycanicum blume*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) frente às cepas microbianas padrões citadas anteriormente e analisar a associação entre eles visando a utilização de um sistema conservante eficaz em formulações cosméticas que serão desenvolvidas. Para tal, foram realizados ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), ensaio de associação de antimicrobianos e teste de desafio de conservante.

METODOLOGIA:

O presente projeto contempla as seguintes etapas: Ensaio de atividade antimicrobiana, estudo e ensaio da associação entre os antimicrobianos, desenvolvimento de formulação tópica para avaliação da eficácia e teste desafio de conservante.

MATERIAIS UTILIZADOS E MICRORGANISMOS:

Para os ensaios de atividade antimicrobiana foram utilizadas as substâncias: conservantes padrões (tradicionais), sendo estes: Fenoxietanol (ProTeg F, ProServ, São Paulo), Metilparabeno (ProTeg MP, ProServ), Propilparabeno (ProTeg PP, ProServ), Etilhexilglicerina (ProTeg L, ProServ), Metilcloroisotiazolinona e Metilisotiazolinona (Pro Clin TM 150, Sigma, Barueri). As substâncias testes foram Caprilil glicol (ProTeg Kpg, ProServ), Álcool benzílico (ProTeg A, ProServ), Benzoato de sódio (ProTeg BS, ProServ), Sorbato de potássio (ProTeg SP, ProServ), óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum blume* (canela) e *Syzygium aromaticum* (cravo) (Laszlo, Brasil). As cepas-padrão de microrganismos selecionadas foram: *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 8739 e *C. albicans* ATCC 10231,.

ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA:

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada segundo as recomendações da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). A menor concentração do composto que não apresentar turbidez foi considerada a CIM.

ENSAIO DE ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS:

Para avaliar a possível interação entre os conservantes, foi utilizado o método de associação por microdiluição em placas de 96 poços (Odds, 2003; Graziano et al., 2015). Desta forma, diluições com diferentes concentrações de cada substância foram associadas e a atividade antimicrobiana avaliada. Para isso, foram utilizadas placas de 96 poços contendo meio Mueller Hinton (Difco) e uma suspensão microbiana de densidade óptica de 0,088 a 0,120 a 660 nm para as bactérias e meio Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Difco) com suspensão de densidade óptica de 0,080 a 0,100 a 530 nm para a levedura. As concentrações dos conservantes utilizados foram definidas de acordo com os resultados do ensaio de CIM (2XMIC a 1/4MIC).

A análise dos resultados foi avaliada através do valor de FICI (índice de concentração inibitória fracionada), que é calculado da seguinte forma: $\Sigma = FICIA + FICIB = MICAB/MICA + MICBA/MICB$ onde o CIM de A e B são os CIM das substâncias isoladas e CIM de AB e BA são os CIM de A e B quando em combinação. Valores de FICI <0,5 representam sinergismo, FICI entre 0,5 e 4,0 são classificados como indiferentes e FICI >4,0 são classificados como antagonismo.

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO TÓPICA:

Será desenvolvida uma emulsão não-iônica a fim de avaliar a eficácia conservante por meio de teste de desafio. Serão testadas diferentes combinações dos conservantes (combinação de conservantes experimentais) propostos, sendo selecionados aqueles com melhores resultados nos ensaios de CIM e teste de associação de antimicrobianos. Ainda, serão desenvolvidas formulações com conservantes tradicionais a fim de verificar a eficácia contra as cepas.

TESTE DE DESAFIO (CHALLENGE TEST):

O teste será realizado conforme indicado pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019) e The Personal Care Products Council (CTFA, 2007) com o objetivo de verificar a eficácia da preservação antimicrobiana da formulação.

As formulações propostas estarão contaminadas com as diferentes cepas para verificar a efetividade da conservação da formulação testada, sendo executado a partir de 2 experimentos distintos: 1 – com a inoculação no dia inicial (t=0) e 2 – com reinoculações: t=0, t= 7 dias e t= 14 dias.

Para verificar a viabilidade dos microrganismos durante os ensaios, o mesmo procedimento utilizado para as amostras, seguirá para as formulações sem conservantes como parâmetro. O critério de eficácia do sistema conservante utilizado é uma redução de 3 Log de UFC/g de bactérias em 7 dias e, para cada desafio, com redução ou não aumento da carga microbiana a partir de 14 dias. Como resultado para as cepas fúngicas, se espera que não haja crescimento. A etapa de desenvolvimento da formulação e teste de desafio estão sendo realizadas e serão apresentadas no congresso em conjunto com os outros dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), os valores de CIM para cada microrganismo e conservante encontram-se na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Resultados Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

RESULTADOS - MICs EXPERIMENTAIS (µg/ml)										
Conservante/ Microorganismo	Metilparabe no	Propilparab eno	Fenoxietan ol	Metilcloroisot iazolinona + Metilisotiazoli nona	Caprililglico l	Álcool Benzílico	Benzoato de sódio + Sorbato de Potássio	Etilexilglice rina	Óleo Essencial de Cravo	Óleo Essencial de Canela
<i>S. aureus</i> ATCC	2000	1000	2000	500	8000	24000	3000	32000	3000	93,75

6538										
<i>E. coli</i> ATCC 8739	4000	2800	4000	31,25	2000	12000	24000	4000	1500	375
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	4000	4000	16000	125	4000	4000	38400	16000	375	2000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4000	1000	3200	1000	2000	8000	38400	8000	187,5	12000

Na Tabela 2 abaixo encontram-se os valores de Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM) para cada microrganismo e conservante.

Tabela 2. Resultados Teste de Concentração Bactericida (CBM) e Fungicida Mínima (CFM)

RESULTADOS - CBMs e CFM EXPERIMENTAIS (µg/ml)										
Conservante/ Microorganism o	Metilparabe no	Propilparab eno	Fenoxietan ol	Metilcloroisot iazolinona + Metilisotiazol inona	Caprililglic ol	Álcool Benzílico	Benzoato de sódio + Sorbato de Potássio	Etilexilglic erina	Óleo Essencial de Cravo	Óleo Essencial de Canela
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8000	2000	8000	1000	16000	24000	6000	32000	3000	187,5
<i>E. coli</i> ATCC 8739	16000	2800	16000	31,25	4000	12000	24000	4000	1500	750
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	16000	32000	6400	500	8000	4000	76800	64000	1500	24000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4000	1000	6400	1000	4000	8000	76800	16000	187,5	12000

Para o ensaio de associação microbiana, foi escolhido como conservante padrão o fenoxietanol e como compostos multifuncionais o caprilil glicol, etilexilglicerina e óleo essencial de canela, o que resultou em cinco associações diferentes, cujos resultados de FICI para cada microrganismo encontram-se na Tabela 3 a seguir. Todos valores de FICI encontrados estão na faixa de 0,5 a 4,0, indicando que as associações de conservantes foram indiferentes quanto a possível interação entre os conservantes.

Tabela 3. Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) para cada microrganismo

RESULTADOS - FICIs EXPERIMENTAIS			
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 9739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
Caprilil.+ Fenoxi.	1,00	1,00	2,00
Caprilil. + Etx.	2,00	1,00	3,00
Caprilil. + OE Canela	2,00	3,00	2,00
Etx. + OE Canela	1,50	4,00	1,13
Fenoxi. + OE Canela	3,00	1,50	0,75
Etx. + Fenoxi.	0,75	4,00	1,00

CONCLUSÕES:

Em conclusão, tanto os conservantes tradicionais quanto os óleos essenciais e os conservantes multifuncionais apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas microbianas testadas. Entre os óleos, o óleo de canela apresentou menores valores de CIM e entre os conservantes teste, o álcool benzílico e o caprililglicol apresentaram maior potência.

Em relação ao Ensaio de Associação Microbiana, as combinações testadas não apresentaram interação sinérgica ou antagônica. Entretanto, algumas associações apresentaram um maior grau de interação positiva, como Caprililglicol e fenoxietanol para *S. aureus* e *E. coli* e Etilhexilglicerina com fenoxietanol para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, por exemplo. Maiores conclusões poderão ser obtidas com os ensaios de teste de desafio de conservante com essas combinações.

BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopéia Brasileira, 6a ed., 2019. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC no 528**, de 4 de Agosto de 2021

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004.**

ALVAREZ-RIVERA, G. et al.. **Preservatives in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods. In Analysis of cosmetic products** (pp. 175-224), 2018.

AZZINI, R. G. **Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos**. 1999. 169p. Diss. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BAKKALI, F. et al. **Biological Effects of Essential Oils—A Review**. Food Chem. Toxicol, 46, 446–475, 2008.

CHO, T. J. et al. **Recent Advances in the Application of Antibacterial Complexes Using Essential Oils**. *Molecules*, 25(7), 1752, 2020.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**, NCCLS. 49p, 2003.

DE SOUSA, I. A. et al. **Avaliação da qualidade microbiológica de produtos cosméticos novos e em uso**. Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia, 9(2), 1047-1053, 2021.

HALLA, Nouredine et al. **Cosmetics preservation: a review on present strategies**. *Molecules*, v. 23, n. 7, p. 1571, 2018.

MARTELLI, Eloiza Cristina et al. **Uso de substâncias bioativas como conservantes naturais em formas farmacêuticas: uma revisão**. Brazilian Journal of Health Review, v. 4, n. 2, p. 8120-8133, 2021.

MICHALEK, I. M. et al. **Microbiological contamination of cosmetic products—observations from Europe, 2005–2018**. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 33, n. 11, p. 2151-2157, 2019.