

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

GABRIELA MINATTI GIACOMINI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONSERVANTES  
NATURAIS UTILIZADOS EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS**

Florianópolis, julho de 2022.

GABRIELA MINATTI GIACOMINI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONSERVANTES  
NATURAIS UTILIZADOS EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como um dos requisitos para  
a obtenção do grau de Bacharel em  
Farmácia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovana Carolina  
Bazzo

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Ramos  
Pezzini

Florianópolis, julho de 2022.

Este trabalho de conclusão de curso, escrito no formato de artigo, foi elaborado segundo as normas da Revista *Cosmetics & Toiletries*.

Categoria de trabalho: trabalho de pesquisa

## RESUMO

Conservantes são substâncias adicionadas aos cosméticos com a finalidade de inibir o crescimento de micro-organismos. Porém, os possíveis efeitos adversos dos conservantes sintéticos e a tendência dos consumidores a buscarem produtos contendo ingredientes naturais, orgânicos e sustentáveis trazem a tendência do uso de conservantes naturais.

No entanto, a utilização de conservantes naturais em formulações cosméticas deve ser realizada de forma cuidadosa, pois muitos deles podem não apresentar atividade de amplo espectro, podem possuir baixa eficácia em baixas concentrações, apresentar odor ou cor desagradável, incompatibilidade com outros ingredientes, causar irritação ou processos alérgicos e também podem possuir custo mais alto. Há poucos estudos relacionados à atividade antimicrobiana dos conservantes naturais disponíveis no mercado e a maioria dos fornecedores não disponibiliza resultados da eficácia antimicrobiana contra micro-organismos específicos. Portanto, este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana de quatro tipos de conservantes naturais, de diferentes fornecedores, que vêm sendo utilizados em formulações cosméticas e determinou a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) contra determinados micro-organismos. De uma maneira geral, a maioria dos conservantes foram eficazes para inibir o crescimento dos micro-organismos testados, apresentando CIM e CBM/CFM menores do que as concentrações indicadas pelos fabricantes, e apenas um deles teve uma baixa performance. Sendo esse o único conservante que contém apenas um componente, os demais são combinações de diferentes compostos, que podem ter diferentes mecanismos de ação ou mesmo alguma ação sinérgica, o que pode estar relacionado à sua melhor *performance*. Os resultados obtidos poderão auxiliar na etapa de desenvolvimento de novas formulações contendo estes conservantes.

**Palavras-chave:** conservantes, cosméticos, ingredientes naturais.

## 1 INTRODUÇÃO

Devido às demandas dos consumidores por produtos com longa vida de prateleira, a indústria cosmética utiliza diversos métodos para prolongar o período de uso dos cosméticos. Um dos métodos mais utilizados para uma maior duração desses produtos e para a manutenção da sua estabilidade microbiológica é o uso de conservantes, substâncias que inibem o crescimento de micro-organismos<sup>1</sup>.

O crescimento microbiano pode ocorrer em cosméticos e produtos de higiene pessoal sob condições usuais de fabricação e uso, e várias fontes de contaminação podem ser citadas, como as matérias-primas, a embalagem, ou mesmo os processos de fabricação. Além disso, uma vez que o produto cosmético é aberto, e até que seja descartado, é altamente suscetível à contaminação devido ao uso pelo consumidor<sup>2</sup>.

Os micro-organismos podem, portanto, multiplicar-se facilmente e causar efeitos tanto nas características físicas e químicas do produto (como descoloração, odor desagradável, degradação de compostos ativos, alteração do pH) quanto danos à saúde do consumidor (se o micro-organismo for patogênico, por exemplo)<sup>2</sup>. Dessa maneira, é esperado que os produtos cosméticos resistam à proliferação desses micro-organismos dentro do período de uso, reforçando a necessidade da utilização de conservantes nessas formulações.

O uso de conservantes em formulações cosméticas se destina, principalmente, para inibir o desenvolvimento de micro-organismos nos produtos, e a sua aplicação deve estar dentro da regulamentação adequada para cada tipo de conservante. Os conservantes têm sido usados em associação, para aumentar a atividade antimicrobiana, ampliando o espectro de atividade, reduzindo a resistência de micro-organismos e o risco de toxicidade.<sup>3</sup>

Segundo a ANVISA, conservantes são substâncias que são adicionadas como ingrediente aos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes com a finalidade de inibir o crescimento de micro-organismos durante sua fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso.<sup>4</sup>

Os conservantes sintéticos são utilizados há bastante tempo e possuem preço acessível, atividade contra diferentes espécies de bactérias e fungos, são compatíveis com outros ingredientes e não interferem na fragrância, cor e outros aspectos das formulações.

Porém, muitos deles podem ser prejudiciais à saúde se usados em concentrações inadequadas, podendo causar irritações na pele e em áreas sensíveis, fato que criou um alerta a muitos consumidores que, atualmente, acabam buscando produtos sem essas substâncias.<sup>2</sup>

Entre os conservantes sintéticos mais utilizados nas indústrias cosméticas estão os parabenos, ésteres do ácido 4-parahidroxibenzoico (PHBA). A popularidade global dos parabenos como conservantes se deve principalmente à sua eficácia e atividade contra um amplo espectro de bactérias e fungos. Essas substâncias inibem o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas, bem como bolores e leveduras. No entanto, o uso de parabenos vem sendo alvo de inúmeras controvérsias relacionadas à sua utilização, e a busca por conservantes alternativos cresce cada vez mais pelas indústrias e pelos próprios consumidores.<sup>1</sup>

Recentemente, a indústria cosmética iniciou uma nova tendência de substituição de conservantes químicos por substâncias de origem natural. Pesquisadores identificaram plantas que exibem propriedades antibacterianas e antifúngicas e avaliaram a eficácia, eficiência e possibilidades viáveis do uso de óleos essenciais e extratos derivados dessas plantas em cosméticos.<sup>5</sup> Além disso, derivados de plantas são utilizados na indústria de alimentos e muitos deles são classificados como “GRAS” - Geralmente Reconhecido como Seguro.<sup>6</sup> Dessa forma, essas substâncias estão ganhando espaço na indústria e vêm sendo cada vez mais utilizadas em formulações cosméticas.

A descoberta e o uso de um ingrediente natural com propriedades conservantes oferece às indústrias cosméticas a possibilidade de comunicarem sobre o aspecto “livre de conservantes” de seus produtos.<sup>2</sup> Além disso, surgiu nos últimos anos uma abordagem de cosméticos autoconservantes, onde os conservantes tradicionais são substituídos por outros ingredientes cosméticos que são usados principalmente como constituintes funcionais de um produto cosmético e/ou por seus efeitos positivos na pele, mas contribuem significativamente para a função conservante por possuírem propriedades antimicrobianas.<sup>7</sup>

Diante do exposto, pode-se concluir que os conservantes são indispensáveis nas formulações cosméticas, pois além de aumentarem o tempo de prateleira do produto, inibindo o crescimento de micro-organismos, evitam a contaminação dos mesmos. Porém, a busca dos consumidores por produtos contendo ingredientes naturais, orgânicos

e sustentáveis traz uma nova tendência às formulações cosméticas – o uso de conservantes naturais.

O desenvolvimento de novos conservantes naturais possibilita a redução e até mesmo a exclusão dos conservantes sintéticos, normalmente usados em preparações farmacêuticas e cosméticas. Além disso, esses agentes apresentam efeitos menos tóxicos e representam uma possível alternativa natural aos consumidores<sup>8</sup>.

No entanto, a utilização de conservantes naturais em formulações cosméticas deve ser realizada de forma cuidadosa, pois muitos deles podem não apresentar atividade de amplo espectro, podem possuir baixa eficácia em baixas concentrações, apresentar odor ou cor desagradável, incompatibilidade com outros ingredientes, causar irritação ou processos alérgicos e também podem possuir custo mais alto<sup>8</sup>.

Além disso, há poucos estudos relacionados à atividade antimicrobiana dos conservantes naturais disponíveis no mercado e a maioria dos fornecedores não disponibiliza resultados da eficácia antimicrobiana contra micro-organismos específicos. Portanto, a proposta deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de quatro tipos de conservantes naturais, de diferentes fornecedores, que vêm sendo utilizados em formulações cosméticas. Os resultados obtidos poderão auxiliar na etapa de desenvolvimento de novas formulações contendo estes conservantes.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS E REAGENTES**

Os conservantes foram obtidos através de doação pelos próprios fornecedores. Foram utilizados Caldo Mueller Hinton e Caldo Sabouraud-dextrose da Himedia (Mumbai, Índia). As cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 10536; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Candida albicans* ATCC 10231 foram obtidas da Microbiologics (Minnessota, USA).

### **2.2 CONSERVANTES**

Um resumo da composição de cada conservante e também a concentração recomendada para ser adicionada a formulações, de acordo com os fornecedores, é apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Conservantes naturais avaliados neste estudo, sua respectiva composição química e concentração de uso indicada pelos fornecedores.

CONSERVANTE	INCI	CONCENTRAÇÃO INDICADA
Conservante 1	Glyceryl Caprylate Glyceryl Undecylenate	1,0% - 1,5%
Conservante 2	Pentylene Glycol Glyceryl Caprylate Glyceryl Undecylenate	1,6%
Conservante 3	Pentylene Glycol	1,0% - 5,0%
Conservante 4	Benzyl alcohol Glyceryl caprylate Glyceryl undecylenate	0,3% - 1,0%

### 2.3 MÉTODOS

A atividade antimicrobiana dos conservantes foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), empregando o método de microdiluição em caldo. A metodologia foi realizada de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Norma M7-A6, Anvisa, 2019), com pequenas modificações<sup>9</sup>.

### 2.4 PROCEDIMENTO PARA REATIVAÇÃO DAS CEPAS

Para esta etapa, foi transferida uma alíquota de cada cepa mantida congelada para o meio de cultura caldo Müeller Hinton (para as cepas de *Escherichia coli* ATCC 10536; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) e caldo Sabouraud-dextrose para a *Candida albicans* ATCC 10231 e, posteriormente, incubadas a 37°C por 24 horas.



## 2.5 PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

A suspensão da cepa reativada foi diluída com solução salina estéril e, em seguida, comparada com o tubo 0,5 da escala de Mc Farland, que equivale a  $1,5 \times 10^8$  células/mL. Posteriormente, foi feita uma nova diluição com 1 mL da suspensão em 9 mL de solução salina estéril, de forma com que a concentração do inóculo ficasse em, aproximadamente,  $1,5 \times 10^7$  células/mL para as cepas de bactérias. Para a cepa de *Candida albicans*, a suspensão foi diluída até uma concentração aproximada de  $1$  a  $5 \times 10^3$  células/mL.

## 2.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

Inicialmente foi preparada uma solução mais concentrada de cada amostra, empregando solução salina e dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção 1/1 como diluente: 3% (p/v) para os conservantes 1, 2 e 4 e 5% (p/v) para o conservante 3. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas nos próprios poços da microplaca, empregando salina estéril como diluente. As concentrações foram estabelecidas de acordo com as fichas técnicas dos fabricantes de cada conservante, considerando a quantidade sugerida para utilização em formulações.

## 2.7 INOCULAÇÃO NAS MICROPLACAS

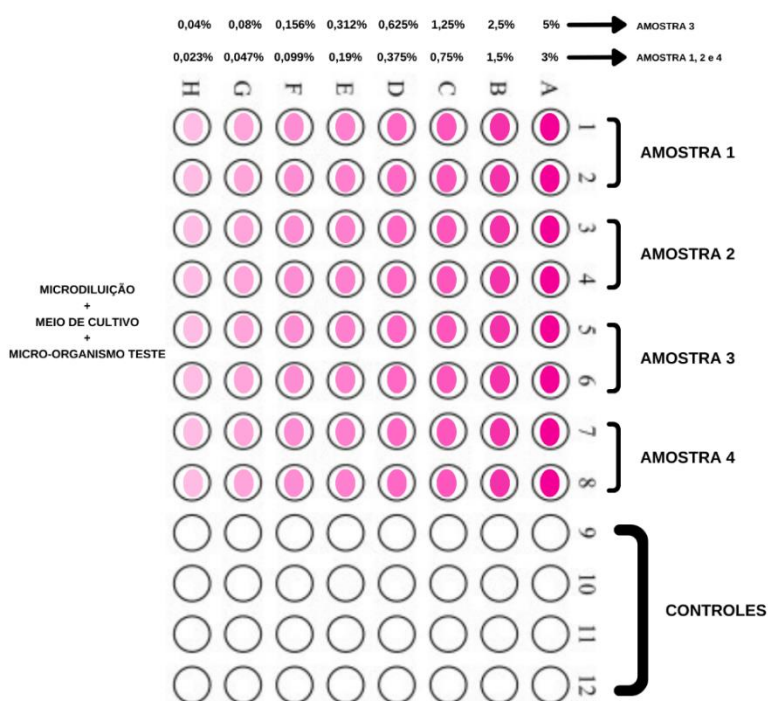
Esta etapa foi feita em duplicata para cada amostra, conforme demonstrado na Figura 1. A partir da solução inicial foram efetuadas diluições seriadas nos próprios poços da placa de microdiluição da seguinte forma: foram adicionados 100  $\mu$ L de solução salina em cada orifício da microplaca e 100  $\mu$ L da amostra na concentração inicial e, posteriormente, realizadas as diluições seriadas. Para cada micro-organismo, uma placa com 96 poços foi inoculada com diferentes concentrações das amostras. Em seguida, foi adicionado 80  $\mu$ L de caldo e 20  $\mu$ L da suspensão padronizada de cada micro-organismo teste.

O controle do efeito do solvente empregado no preparo da amostra foi feito com 100  $\mu$ L de solução salina, adicionado 80  $\mu$ L de caldo e 20  $\mu$ L da suspensão do micro-organismo teste. O controle da promoção de crescimento do meio foi feito através de 80  $\mu$ L de caldo e 20  $\mu$ L da suspensão do micro-organismo teste, na qual deverá haver

crescimento após incubação. O controle negativo de contaminação das amostras foi feito com 80  $\mu$ L de caldo e 100  $\mu$ L da solução das quatro amostras, onde não deverá haver crescimento após incubação. O controle de esterilidade do meio de cultura foi feito com 80  $\mu$ L de caldo e 100  $\mu$ L de solução salina, na qual não deverá haver crescimento após incubação.

Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para as bactérias e 48 h para a levedura.

**Figura 1** – Fluxograma para determinação da CIM pelo método de microdiluição.



## 2.8 LEITURA

Após a incubação, foi feita a leitura da turbidez em cada orifício. Para confirmar o crescimento, foi utilizado o revelador 2,3,5 trifenil tetrazólio a 0,5% (m/v), na qual foi adicionado 20  $\mu$ L da solução aquosa do mesmo em cada orifício da microplaca e, posteriormente, foi realizado uma incubação adicional de duas horas a 37°C. Poços com crescimento bacteriano adquiriram coloração rosa, enquanto poços sem crescimento permaneceram incolores.

## 2.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA OU FUNGICIDA MÍNIMA (CBM/CFM)

A CIM foi determinada como a menor concentração da diluição da amostra que inibiu o crescimento microbiano.

Para determinar a CBM, foram repicadas alíquotas dos poços em que não houve crescimento para placas contendo Ágar Caseína-soja, seguido de incubação a 36°C por 48 horas.

A CFM (Concentração Fungicida Mínima) foi determinada da mesma forma, porém, empregando Ágar Sabouraud-dextrose, e incubação a 36°C por 5 dias.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos micro-organismos utilizados neste trabalho baseou-se naqueles preconizados para a realização do teste de desafio ou *challenge test*, realizado em produtos cosméticos com o objetivo de verificar a eficácia do sistema conservante e se ele é capaz de resistir a vários tipos de contaminação durante a produção, proveniente do meio ambiente e do contato direto com o usuário, dessa forma garantindo a segurança e eficácia do produto durante o seu prazo de validade.<sup>10</sup>

O teste de desafio é baseado na contaminação proposital da formulação final com micro-organismos específicos e avaliação desta carga em intervalos de tempo definidos. Recomenda-se utilizar culturas padrão dos seguintes micro-organismos:

- *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria Gram negativa)
- *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram positiva)
- *Escherichia coli* (bactéria Gram negativa)
- *Candida albicans* (levedura)
- *Aspergillus niger* (bolor)<sup>11</sup>

Em determinadas ocasiões, especialmente quando não se conhece ou quando não se encontram dados disponíveis sobre a ação do conservante sobre micro-organismos específicos, é realizado o teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que foi utilizado neste trabalho.

Quando se fala na escolha de um conservante, este deve manter sua atividade antimicrobiana na presença de outros insumos da formulação e deve apresentar, preferencialmente, ação biocida, reduzindo o nível de contaminação por meio da destruição/morte microbiana. Além disso, também é importante a ação biostática, que mantém ou reduz o nível de contaminação por meio da inibição do crescimento dos micro-organismos.<sup>12</sup>

A CIM é definida como a concentração mínima de conservante necessária para inibir o crescimento de um micro-organismo específico, ou seja, está relacionada à sua ação biostática. Além da CIM, podem ser determinadas a CBM e a CFM, que representam a menor concentração do conservante capaz de causar a morte dos micro-organismos teste, que são evidenciadas pela ausência de crescimento após repique para uma placa de Petri contendo meio de cultivo apropriado.<sup>13</sup> No entanto, a eficácia dessa concentração de conservante só é comprovada através da realização do ensaio de eficácia de conservantes (*challenge test*), onde se avalia a resistência da formulação final do produto à contaminação microbiana.<sup>14</sup>

Existem vários métodos que podem ser empregados para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica e determinar a CIM. Os mais conhecidos são o método de difusão em ágar, o método de macrodiluição e o de microdiluição.<sup>13</sup>

Segundo a Enciclopédia de Microbiologia, quinta edição (2019), a microdiluição em caldo é o método padrão utilizado na maioria dos laboratórios de referência nos Estados Unidos e no exterior. A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada microdiluição, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprias para microdiluição.<sup>15</sup>

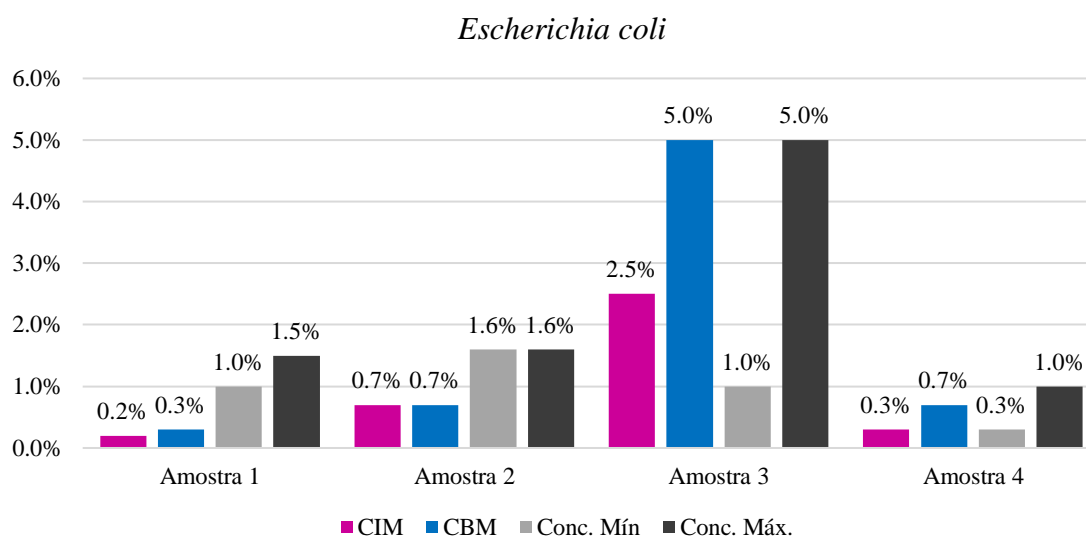
### 3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À *Escherichia coli*

As bactérias Gram-negativas da espécie *Escherichia coli* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Seu crescimento exige condições ótimas de temperatura, pH e atividade de água. O habitat natural da *Escherichia coli* é o trato intestinal dos seres humanos e animais de sangue quente.<sup>16</sup>

Em termos quantitativos, a *Escherichia coli* provavelmente é o patógeno humano mais importante. A espécie contempla pelo menos cinco categorias que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e várias outras especificamente associadas com infecções urinárias, meningites e provavelmente outras infecções extra-intestinais<sup>16</sup>.

Acerca desse cenário, a ANVISA estabelece parâmetros para controle microbiológico de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, preconizando a ausência de coliformes fecais, onde inclui-se a *Escherichia coli*, para produtos tipo I (produtos para uso infantil, para área dos olhos e que entram em contato com mucosas) e tipo II (demais produtos cosméticos suscetíveis a contaminação microbiológica).<sup>17</sup> Na Figura 2 encontram-se os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana dos conservantes frente à *Escherichia coli*.

**Figura 2** – Valores de CIM e CBM das amostras frente à *Escherichia coli* e limites de uso (concentração mínima e máxima) em formulações preconizados nas fichas técnicas dos fornecedores.



Ao determinar a atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli* (Figura 2), observamos que, de maneira geral, todos os conservantes foram eficientes, de acordo com a concentração indicada na ficha técnica do fornecedor. Além disso, ao considerar os valores de CIM, os quatro conservantes apresentaram concentrações abaixo das concentrações máximas preconizadas, indicando que são eficientes em inibir o crescimento da *Escherichia coli* nestas concentrações. Em relação à CBM, apenas o conservante 3 atingiu a concentração máxima de uso apresentada na ficha técnica. Neste caso, embora a concentração sugerida para uso em formulações cosméticas seja de 1 a

5%, o efeito inibitório foi observado apenas em concentrações iguais ou maiores do que 2,5% e, o efeito microbiocida, em concentrações iguais ou superiores a 5%.

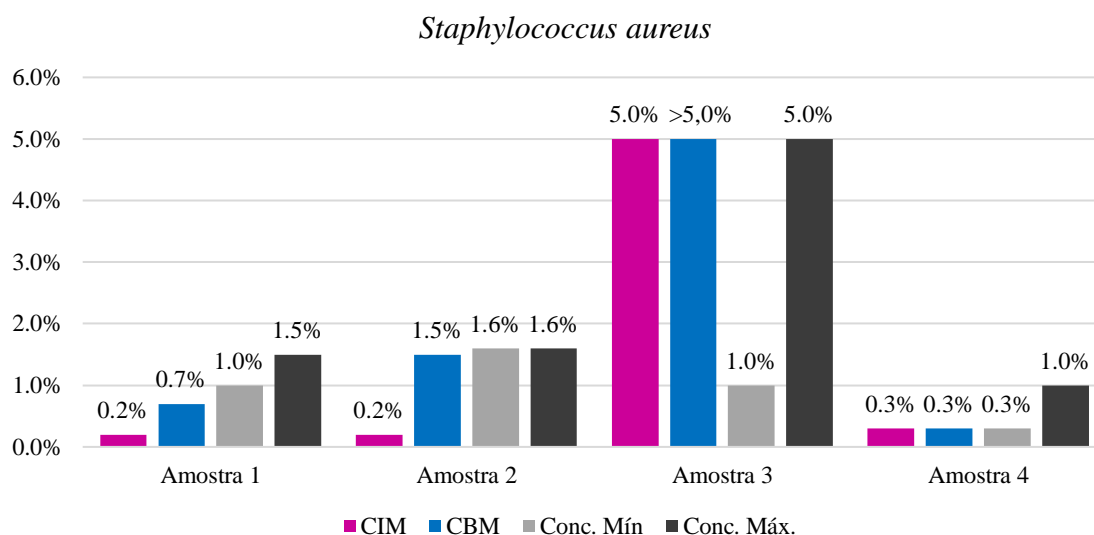
Para os conservantes 1, 3 e 4, os valores de CBM foram maiores do que os da CIM, indicando que, apesar de possuírem ação inibitória sobre o micro-organismo, uma concentração maior de conservante é necessária para que exerça a sua ação microbiocida.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE AO *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*. São bactérias Gram-positivas, podendo ser encontradas isoladas sem pares e em agrupamentos irregulares, e também são anaeróbios facultativos.<sup>18</sup>

A espécie *Staphylococcus aureus* é a mais importante do gênero, podendo causar uma variedade de processos infecciosos em seres humanos, como infecções de pele.<sup>19</sup> Por isso, a ausência deste micro-organismo é recomendada em produtos cosméticos e também em formulações farmacêuticas de uso tópico.<sup>20</sup>

**Figura 3** – Valores de CIM e CBM das amostras frente ao *Staphylococcus aureus* e limites de uso (concentração mínima e máxima) em formulações preconizados nas fichas técnicas dos fornecedores.



Em relação à determinação da atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* e comparando com a concentração indicada pelo fabricante (Figura 3), observa-se que os conservantes 1, 2 e 3 foram eficientes e, inclusive, apresentaram valores de CIM

e CBM inferiores ou iguais à mínima recomendada, com exceção do conservante 3. Neste caso, apenas na concentração máxima sugerida (5%) foi observado efeito inibitório contra o *Staphylococcus aureus* e, para que exerça ação biocida, concentrações superiores a 5% deverão ser empregadas.

Os conservantes 1 e 2 apresentaram valores de CBM maiores que os da CIM, indicando também que, mesmo possuindo ação inibitória sobre o micro-organismo, uma concentração maior de conservante é necessária para que exerça a sua ação microbiocida.

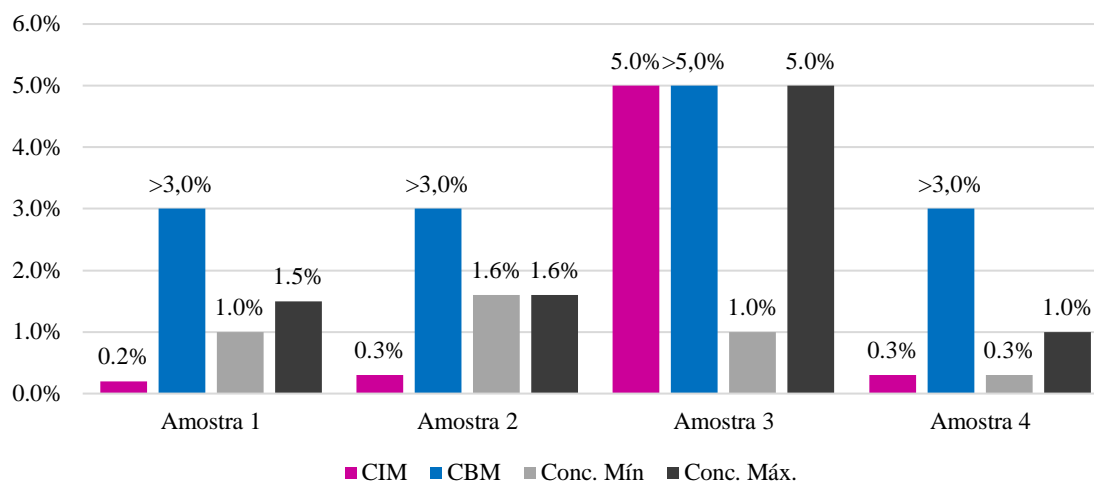
### 3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas* pertencem à família *Pseudomonadaceae*, com as características de bacilos Gram-negativos, não são esporulados e possuem flagelos. São micro-organismos não fermentadores e aeróbios.<sup>18</sup>

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a mais importante, pois é encontrada em diversos ambientes, principalmente no solo e na água. As infecções por *Pseudomonas* são consideradas oportunistas, sendo capazes de provocar doenças quando o sistema imunológico está comprometido.<sup>21</sup> Dessa forma, podem causar infecções cutâneas, urinárias e oculares. Por este motivo, a sua ausência é recomendada especialmente em produtos para uso tópico e também naqueles que possam entrar em contato com os olhos, mesmo que acidentalmente.<sup>20</sup>

**Figura 4** – Valores de CIM e CBM das amostras frente à *Pseudomonas aeruginosa* e limites de uso (concentração mínima e máxima) em formulações preconizados nas fichas técnicas dos fornecedores.

*Pseudomonas aeruginosa*



Ao determinar a atividade antimicrobiana frente à *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 4), observa-se que os valores de CIM foram menores ou iguais à concentração mínima de uso indicada pelo fornecedor para os conservantes 1, 2 e 4. Porém, quando analisamos a CBM, todos apresentaram concentrações maiores do que as recomendadas, sugerindo que o seu efeito conservante nas formulações ocorre pela inibição do crescimento deste micro-organismo e não por ação microbiocida.

No caso do conservante 3, novamente observou-se que apenas na concentração máxima sugerida (5%) foi observado efeito inibitório contra a *Pseudomonas aeruginosa* e, para que exerça ação biocida, concentrações superiores a 5% deverão ser empregadas.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À *Candida albicans*

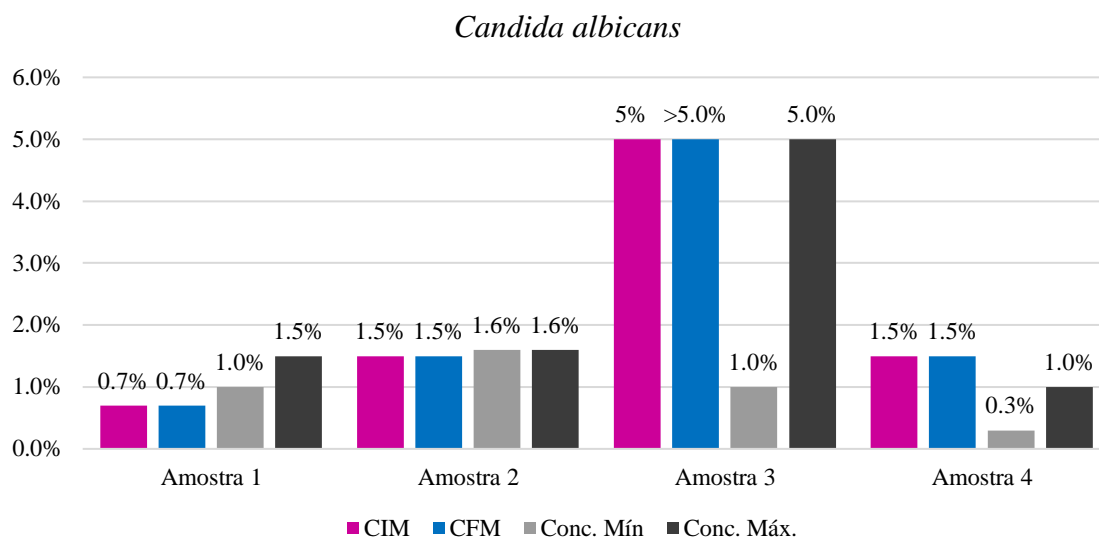
A *Candida albicans* é uma levedura diploide e apresenta-se com diferentes características, dentre elas a habilidade de se apresentar em várias formas como brotamento e filamentação.<sup>22</sup> São micro-organismos comensais, que habitam primariamente o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota vaginal, da uretra e dos pulmões. Entretanto, essas mesmas leveduras podem se tornar patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, por isso são consideradas oportunistas.<sup>23</sup>

Embora a RDC 630/2022 não indique a pesquisa de *Candida albicans* em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, este micro-organismo está incluído



na lista daqueles avaliados no teste de eficácia de conservantes de cosméticos. Por este motivo, optou-se por avaliar sua ação frente aos conservantes avaliados neste estudo.

**Figura 5** – Valores de CIM e CFM das amostras frente à *Candida albicans* e limites de uso em formulações (concentração mínima e máxima) preconizados nas fichas técnicas dos fornecedores.



Em relação à determinação da atividade antimicrobiana frente à *Candida albicans* (Figura 5), nota-se que apenas os conservantes 1 e 2 apresentaram CIM e CFM menores que as concentrações mínimas de uso indicadas pelo fabricante. Por outro lado, os conservantes 3 e 4 demonstraram ação inibitória em concentrações acima das recomendadas. Este resultado é interessante, pois o conservante 4 apresenta os mesmos componentes do que os conservantes 1 e 2, com exceção do álcool benzílico (Tabela 1). Portanto, eram esperados valores de CIM inferiores aos obtidos. Desta forma, sugere-se a confirmação deste resultado.

De uma maneira geral, os conservantes 1, 2 e 4 foram eficazes para inibir o crescimento dos micro-organismos testados. Porém, o conservante 3 inibiu apenas o crescimento dos micro-organismos em concentrações próximo ou iguais às máximas recomendadas. É importante observarmos que o conservante 3 é o único que contém apenas um composto, os conservantes 1, 2 e 4 são um conjunto de compostos que podem ter uma ação sinérgica que resulta em um melhor desempenho conservante.

#### 4 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível determinar a atividade antimicrobiana de conservantes naturais que vêm sendo utilizados em formulações cosméticas frente a diferentes micro-organismos.

Através dos resultados obtidos observou-se que os conservantes 1, 2 e 4 foram eficientes para inibir o crescimento da maioria dos micro-organismos teste. No entanto, o conservante 3 apresentou ação inibitória muito próxima à concentração máxima indicada pelo fabricante, principalmente frente ao *Staphylococcus aureus* e à *Pseudomonas aeruginosa*. Acerca disso, nota-se que o conservante 3 é o único que contém apenas um componente. Os demais são combinações de diferentes compostos, que podem ter diferentes mecanismos de ação ou mesmo alguma ação sinérgica, o que pode estar relacionado à sua melhor *performance*.

Com exceção do conservante 4, que apresentou em sua ficha técnica dados de CIM e CBM para alguns micro-organismos e que foram compatíveis com os resultados obtidos, estes dados não se encontram disponíveis para os demais conservantes. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados para direcionar a concentração de uso dos conservantes avaliados na etapa de desenvolvimento de formulações cosméticas.

## REFERÊNCIAS

1. NOWAK, Karolina; JABŁOŃSKA, Ewa; RATAJCZAK-WRONA, Wioletta. Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products. *Environmental Research*, v. 198, 110488, nov. 2020.
2. KERDUDO, Audrey; BURGER, Pauline; MERCK, Florence; DINGAS, Alexandre; ROLLAND, Yohan; MICHEL, Thomas; FERNANDEZ, Xavier. Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study. *Comptes Rendus Chimie*, v. 19, n. 9, p. 1077-1089, jul. 2016.
3. HALLA, Nouredine; FERNANDES, Isabel P; A HELENO, Sandrina; COSTA, Patrícia; BOUCHERIT-OTMANI, Zahia; BOUCHERIT, Kebir; RODRIGUES, Alírio e; FERREIRA, Isabel C F R; BARREIRO, Maria Filomena. *Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies*. *Molecules*, v. 23, n. 7, 1571, jun. 2018.
4. ANVISA. RDC N° 29, DE 1º DE JUNHO DE 2012. Brasil: Ministério da Saúde, 2012.
5. HERMAN, Anna. Antimicrobial Ingredients as Preservative Booster and Components of Self-Preserving Cosmetic Products. *Curr Microbiol*, v. 76, p. 744-754, jun. 2019.

6. SIMÕES, Manuel; BENNETT, Richard N.; ROSA, Eduardo A. S.. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, v. 26, p. 746-757, mar. 2009.
7. GLAVAČ, Nina Kočevar; LUNDER, Mojca. Preservative efficacy of selected antimicrobials of natural origin in a cosmetic emulsion. *International Journal Of Cosmetic Science*, Ljubljana, v. 40, n. 3, p. 276-284, maio 2018.
8. OSTROSKY, Elissa Arantes; MARCONDES, Elda Maria Cecilio; NISHIKAWA, Suzana de Oliveira; LOPES, Patricia Santos; VARCA, Gustavo Henrique Costa; PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; CONSIGLIERI, T Vladi Olga; BABY, Andre Rolim; VELASCO, Maria Valéria Robles; KANEKO, Telma Mary. *Rubus rosaefolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *Aaps Pharmscitech*, v. 12, n. 2, p. 732-737, jun. 2011.
9. ORCHARD, A.; VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M.; KAMATOU, G. The in vitro antimicrobial evaluation of commercially essential oils and their combinations against acne. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 40, n. 3, p. 226-243, 2018.
10. ISSO: 11930 Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product. 2019.
11. ABC, Asso Bras de Cosmetologia. *Guia ABC de Microbiologia*. 5. ed. Rio Grande do Sul: Pharmabooks, 2017. 161 p.
12. KANEKO, Telma Mary; PINTO, Terezinha de Jesus Adreoli; PINTO, Antonio F.. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. São Paulo: Editora Manoele Ltda, 2015. 432 p.
13. OSTROSKY, Elissa A.; MIZUMOTO, Miriam K.; LIMA, Marcos E. L.; KANEKO, Telma M.; NISHIKAWA, Suzana O.; FREITAS, Beatriz R.. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
14. ALVES, Márcia Filipa Bouça. *Ensaio de Eficácia de Conservantes*. 2018. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Engenharia Química e Bioquímica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2018.
15. ALVES, Everton Giovanni; VINHOLIS, Adriana Helena Chicharo; CASEMIRO, Luciana Assirati; FURTADO, Nieve Araçari Jacometti Cardoso; SILVA, Márcio Luis Andrade e; CUNHA, Wilson Roberto; MARTINS, Carlos Henrique Gomes. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
16. LEME, Luan Beloto. *Características de adesão de cepas de Escherichia coli isoladas de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal*. 2013. 24 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.
17. ANVISA. RDC N° 630, DE 10 DE MARÇO DE 2022. Brasil: Ministério da Saúde, 2021. Brasil: Ministério da Saúde, 2022.

18. BRITO, Natália Monte Rubio de. Identificação Rápida de Contaminantes Microbianos em Produtos Farmacêuticos. 2019. 109 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
19. FERREIRA, Joana Anjos. Detecção E Identificação Rápidas Dos Principais Contaminantes Microbiológicos Em Fármacos Por Espetroscopia De Infravermelho. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.
20. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6 ed. Brasil, 2019.
21. BALDINI, Regina Lúcia. Genes Envolvidos Na Patogenicidade Da Bactéria: pseudomonas aeruginosa. Pseudomonas aeruginosa. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/baldini/>. Acesso em: 27 jun. 2022.
22. BARBEDO, Leonardo s; SGARBI, Diana Bg. Candidíase. Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis. Rio de Janeiro, p. 2177-8264. jan. 2013.
23. GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun. 2010. FapUNIFESP.