

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE

CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

FERNANDA ILARY COSTA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CONSERVANTES EM EMULSÃO
LANETTE®**

CUITÉ – PB

2014

FERNANDA ÍLARY COSTA DUARTE

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CONSERVANTES EM EMULSÃO
LANETTE®

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia, da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Júlia Beatriz Pereira de Souza

CUITÉ-PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

D812a Duarte, Fernanda Ílary Costa.

Avaliação da eficácia de conservantes em emulsão lanette®. / Fernanda Ílary Costa Duarte. – Cuité: CES, 2014.

51 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2014.

Orientadora: Dra. Júlia Beatriz Pereira de Souza.

1. Emulsão. 2. Qualidade microbiológica. 3. Conservante. I.
Título.

CDU 615.4

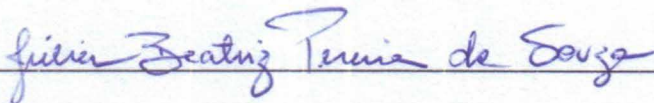
FERNANDA ILARY COSTA DUARTE

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CONSERVANTES EM EMULSÃO
LANETTE®

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia, da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Farmácia

APROVADA EM: 11 / 02 / 2014

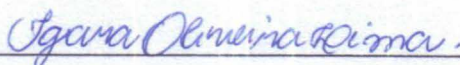
COMISSÃO EXAMINADORA



Profª Drª Júlia Beatriz Pereira de Souza



Prof. Dr. Toshiyuki Nagashima Júnior



Profª. Drª. Igara Oliveira Lima

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus por me conceder força, paz, saúde, fé, capacidade física e mental para a realização deste trabalho.

À minha família (Fernando, Célia, Mairla e Maria Luíza) por todo o amor que me faz forte diante de qualquer situação.

Aos meus amigos e amigas que estiveram comigo (distante ou perto) desde o início desta jornada, como também aqueles que chegaram ao longo dela. A vocês, o meu sincero obrigada.

A Afonso Filho pelo amor e paciência.

A Prof^a. Dr^a. Júlia Beatriz Pereira de Souza por me orientar ao longo destes três anos com compromisso e responsabilidade. Obrigada por toda a ajuda e consideração.

A banca examinadora pela disponibilidade em avaliar meu trabalho de conclusão de curso.

A todos os professores do curso de Farmácia pelos ensinamentos disponibilizados durante esses anos de graduação.

“E Jesus disse-lhe: Se tu podes crer, tudo é possível ao que crê”.

(Marcos 9.23)

RESUMO

É perceptível o crescimento do mercado de produtos manipulados, diante disso cabe as farmácias de manipulação garantir total qualidade e segurança com relação ao uso destes produtos. Uma das preparações mais dispensadas são as emulsões para fins dermatológicos e estéticos, caracterizadas como base galênica e destinadas a veicular os mais diversos fármacos. Composta por dois líquidos imiscíveis, uma fase oleosa e outra fase aquosa, de forma que essa mistura de lipídeos e água propicia facilmente o crescimento de diversos microrganismos. Como consequência disto a inclusão de conservantes na formulação é um fator essencial para garantir a qualidade e a estabilidade microbiológica das preparações, impedindo a proliferação microbiana. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o teste de eficácia do sistema conservante (metil e propilparabeno) em emulsão a base de cera lanette[®] manipulada na Farmácia Escola Manuel Casado de Almeida (UFMG/Cuité – PB). Este teste consistiu em contaminar a amostra com inóculos separados de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e determinar o número de microrganismos viáveis pelo método de semeadura em profundidade, nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 dias. Tomando-se por base os critérios preconizados pela Farmacopéia Brasileira V, os resultados obtidos mostraram que o sistema conservante foi eficaz apenas para três microrganismos desafiantes, as bactérias gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* não foram inibidas como o esperado. Assim, sugere-se novos estudos que visem investigar as causas dessa ineficácia por parte deste sistema conservante, por meio da avaliação da composição da formulação bem como dos métodos de manipulação.

Palavras-chave: Emulsão. Qualidade microbiológica. Conservante.

ABSTRACT

It is perceptible growth of manipulated products market, it fits on the pharmacies to ensure total quality and safety regarding these products use. One of the mores dispensed preparations are the emulsions for dermatologic and aesthetic purposes, characterized as galenic base and designed to serve a wide variety of drugs. Composed by two immiscible liquids, an oil phase and one aqueous phase so that the mixture of lipids and water easily promotes various microorganisms.growth. As a consequence the inclusion of preservatives in the formulation is an essential factor in ensuring the preparations microbiological quality and stability preventing microbial proliferation. The aim of this study was to test the preservative system (methyl and propyl) efficacy in the lanette[®] wax based emulsion manipulated in Manuel Casado de Almeida pharmacy school (UFCG/Cuité – PB). This test consisted of contaminating the sample with separate inoculants *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* , *Aspergillus niger* and determine the viable microorganisms number by the method of pour plate at 0, 7, 14, 21, 28 days. Taking as a basis the Brazilian Pharmacopoeia V criteria, the results showed that the preservative system was effective in only three challenging microorganisms, gram-negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa* were not inhibited as expected. Thus, further studies aimed at investigating the inefficiency causes by the preservative system is suggested, by evaluating the composition of the formulation and the methods of manipulation.

Keywords: Emulsion. Microbiological quality. Preservative.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da formação das emulsões, após conturbação na interface das fase.....	18
Figura 2 – Estrutura química do ácido p-hidroxibenzóico.....	25
Figura 3 – Esquematização da execução do teste do desafio.....	32
Figura 4 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g da <i>E. coli</i> para a emulsão lanette® sem e com conservantes.....	36
Figura 5 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do <i>P. aeruginosa</i> para a emulsão lanette® sem e com conservantes.....	37
Figura 6 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do <i>S. aureus</i> para a emulsão lanette® sem e com conservantes.....	37
Figura 7 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do <i>C. albicans</i> para a emulsão Lanette® sem e com conservantes.....	38
Figura 8 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do <i>A. niger</i> para a emulsão lanette® sem e com conservantes.....	38
Figura 9 – Característica do crescimento de <i>A. niger</i> na formulação sem e conservante.....	40
Figura 10 – Característica do crescimento de <i>C. albicans</i> na formulação sem e com conservante.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de microrganismos viáveis (UFC/g) no teste de eficácia de conservantes.....	34
Tabela 2 – Número de sobreviventes em logaritmo base 10 (Log UFC/g) no teste de eficácia de conservantes.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	Butilhidroxitolueno
EDTA	Ácido Etileno Dióxido Tetracético
g	Gramas
H/L	Hidrófilico/Lipófilico
H/L/H	Hidrófilico/Lipófilico/Hidrófilico
L/H	Lipófilico/Hidrófilico
L/H/L	Lipófilico/Hidrófilico/Lipofílico
p/p	Peso/Peso
ml	Mililitro
PB	Paraíba
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2Objetivos Específicos.....	16
3. FUDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 Manipulação de Formas Farmacêuticas.....	17
3.2 Emulsões.....	17
3.2.1 Cera Lanette®	20
3.3 Controle de qualidade.....	21
3.3.1 Controle de qualidade microbiológico.....	22
3.4 Conservantes.....	23
3.4.1 Parabenos.....	24
3.4.2 Teste de eficácia do sistema conservante (Teste do desafio).....	25
3.4.2.1 Microrganismos teste.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Material.....	29
4.1.1 Amostras.....	29
4.1.2 Microorganismos teste.....	29
4.1.3 Substância e meios de cultura.....	29
4.1.4 Equipamentos e acessórios.....	29
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Preparo de culturas estoques.....	31
4.2.2 Padronização do inóculo.....	31
4.2.3 Contaminação da amostra.....	31
4.2.4 Contagem de microorganismo viáveis.....	31
4.2.4.1 Preparo da amostra.....	32
4.2.5 Interpretação dos resultados.....	33
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de produtos necessita ser protegidos do ataque de microrganismos durante seu período de uso. Isto, para proteger o usuário de riscos de infecções, bem como para prevenir contaminação e deterioração do produto. No caso de medicamentos, alimento e cosméticos, a segurança do usuário é a principal prioridade, bem como a manutenção da qualidade e das características organolépticas para o seu uso proposto são também importantes (DENYER; BAIRD; HODGES, 2000).

Nas últimas décadas a preferência pelos produtos manipulados vem aumentando significativamente (DALLAMI; MIGUEL; CANSIAN, 2012). Cabe ao manipulador garantir tecnicamente, tanto ao cliente quanto ao médico, a preparação dos produtos farmacêuticos com individualidade e total qualidade e segurança.

A farmácia magistral atende diversas especialidades, onde cerca de 18 % das formulações são emulsões dermatológicas e estéticas. (MIGUEL et al, 2002). O emprego da forma emulsão como veículo para preparações de uso tópico deriva do primeiro “cold cream” criado por Galeno, sendo historicamente a forma mais antiga de aplicação cosmética. A palavra emulsão deriva do latim *emulgeo*, aplicando-se de modo geral, a todas as preparações de aspecto leitoso com as características de um sistema disperso de duas fases líquidas imiscíveis, nos quais uma das fases está dispersa na outra como glóbulos (BONTORIM, 2009; MORAIS, 2006).

Tal preparação é encontrada, em geral, na forma de creme (emulsão semi-sólida) ou loções (emulsão líquida). De acordo com a RDC 67/2007, Trata-se de uma base galênica, ou seja, formulação composta de uma ou mais matérias primas, com fórmula definida, destinada a ser utilizada como veículo de preparações em preparações farmacêuticas.

Na rotina de uma farmácia de manipulação os cremes são muito utilizados para incorporação dos mais diversos fármacos e com as mais variadas aplicabilidades. As bases de cremes e loções cremosas mais indicadas são as caracterizadas como auto-emulsionantes. Uma muito antiga e muito utilizada é a cera Lanette[®] composta por álcool cetosteárfílico e lauril sulfato de sódio, a cera Polawax[®] constituída por álcool cetosteárfílico e monoestearato desorbitano polioxietileno 20 também é bastante usada, as quais são preferidas pela boa estabilidade que apresentam e por promoverem melhor penetração cutânea. (ZANIN et al.,2001)

Estabelecendo-se as características do produto e suas especificações, devem ser realizados testes corriqueiros de controle de qualidade. As emulsões apresentam alta atividade hídrica, devido à presença de água em sua formulação, bem como composição complexa que inclui óleos, extratos, substâncias orgânicas diversas, sais, corantes, perfumes que são provenientes de diferentes origens. Tais fatores colaboram para o enriquecimento da flora microbiana envolvida no processo como um todo, tornando-as altamente susceptíveis a contaminação, comprometendo sua qualidade e a segurança do usuário. (SANTOS, 2006)

Tendo em vista as características de sua utilização, bem como o fato de ser um produto não estéril, é admissível a presença de carga microbiana limitada. Porém a presença de cepas reconhecidamente patogênicas é proibitiva, pois representa potencial risco de aquisição de quadro clínico por infecção ou intoxicação. (SANTOS, 2006) Assim, para assegurar que o produto esteja microbiologicamente seguro e estável, faz-se a adição de conservantes.

Neste sentido, o teste de eficácia de conservante (teste do desafio) é realizado para determinar a efetividade dos conservantes em preservar o produto durante a fabricação e durante o período de uso pelo consumidor. Em resumo, a amostra é inoculada com microorganismos específicos e em tempos determinados é observada a carga microbiana, onde se espera a redução ou nenhum aumento do número de microorganismos. Sendo essenciais os resultados deste teste na documentação da segurança e estabilidade durante a fase de desenvolvimento do produto.

Com base no exposto a pesquisa sugere à execução do teste do desafio nas emulsões a base de cera Lanette[®], produzidas na Farmácia Escola Manuel Casado de Almeida, do Centro de Educação e Saúde/UFCG, no município de Cuité – PB

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a eficácia do sistema conservante empregado nas emulsões à base de cera Lanette[®] manipuladas pela Farmácia Escola Manuel Casado de Almeida, do Centro de Educação e Saúde- UFCG, no município de Cuité-PB.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o inóculo por meio da espectrofotometria;
- Realizar a contagem de microorganismos viáveis na emulsão Lanette[®], após adição do inóculo, com e sem conservantes;
- Avaliar a eficácia do sistema conservante, por meio do teste do desafio;
- Observar o comportamento microbiano frente ao sistema conservante.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Manipulação de Formas Farmacêuticas

As farmácias magistrais representam significativa parcela do mercado brasileiro de medicamentos. Este setor ressurgiu no Brasil no final da década de 1980, após seu desaparecimento quase completo devido ao advento da indústria farmacêutica na década de 1950 (RIBEIRO, 2003).

O aumento do número de medicamentos manipulados no Brasil resultou em maior preocupação com a qualidade destes produtos, com isto a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) adotou medidas que resultaram no aumento do rigor de qualidade com relação aos produtos magistrais. Sendo indispensável à execução do controle de qualidade, que requer alto custo, área física adequada, aquisição de equipamentos e treinamento contínuo de pessoas (MARTINELLI et al., 2005). Estas características dificultam que as farmácias realizem este controle dos manipulados, que em muitos casos não dispõem de recursos suficientes para a execução de tais práticas, o que leva a um questionamento sobre qualidade destes produtos (BONFILIO et al., 2010).

No dia a dia de uma farmácia magistral, as emulsões representam 18% dos produtos manipulados, para aplicação dermatológica e estética são as mais comumente preparadas. Os cremes (emulsão de uso externo) são muito utilizados como bases para incorporação dos mais diversos fármacos e com as mais variadas aplicabilidades. (BABY et al., 2008; ZANON, 2010)

3.2 Emulsões

Emulsões são preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis entre si, uma fase oleosa e outra fase aquosa (GENNARO et al., 2004). São sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, onde a fase que está presente na forma de gotas, cujo diâmetro de partícula geralmente varia entre 0,1 a 10 μ m, denomina-se de fase descontínua, interna ou dispersa e a que forma a matriz em que se dispersam essas gotas de fase contínua, externa ou dispersante. Essas duas fases são estabilizadas pela presença de agentes emulsionantes, através do processo denominado emulsificação (SINKO, 2008).

De acordo com a hidrofília ou a lipofília da fase dispersante, estes sistemas são classificados em óleo-em-água (H/L) ou água-em-óleo (L/H) (BELTRAMI, 2008). Na fase oleosa são acrescentados certos conservantes, antioxidantes e em muitos casos a própria substância ativa constitui esta fase da emulsão (AULTON, 2005; FERREIRA, 2002).

A emulsão H/L é o tipo mais comum, nela as gotículas de óleo estão dispersas na fase aquosa. Essas preparações são usadas para aplicação tópica de fármacos hidrofílicos, são absorvidas de forma mais rápida devido ao baixo conteúdo de óleos e facilmente removíveis da superfície da pele. Por não possuírem característica sensorial gordurosa são mais agradáveis ao uso, sendo mais aceitas pelo consumidor (AULTON, 2005; SINKO, 2008; THOMPSON, 2006). Já as emulsões L/H são sistemas nos quais a água está dispersa como gotículas em óleo, onde são muito utilizadas para a hidratação da pele seca (MILAN et al., 2007). Também é possível formar emulsões múltiplas, como por exemplo, uma emulsão água-óleo-água (L/H/L), na qual pequenas gotículas de água podem ser englobadas dentro de partículas oleosas maiores, as quais, por sua vez, estão dispersas em água. Da mesma forma, é possível formar emulsões do tipo óleo-água-óleo (H/L/H) (AULTON, 2005).

A preparação de uma emulsão exige o fornecimento de certa quantidade de energia (por agitação) que deve ser suficiente para vencer a resistência das fases ao fluxo e a seguir promover a conturbação que leve a fase dispersa a formar digitações ou filamentos instáveis que se separam e assumem o formato de gotículas (GENNARO et al., 2004).

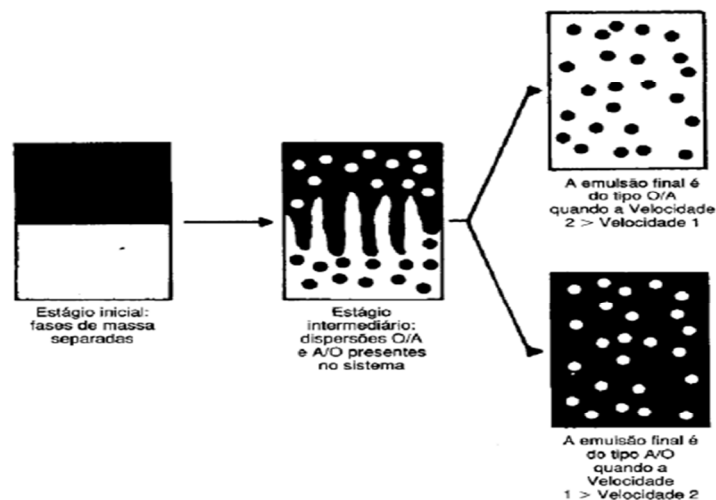


Figura 1 – Representação da formação das emulsões, após conturbação na interface das fases. Fonte:

BARBOSA & MINETOMA, 2001

As fases deverão estar à mesma temperatura a fim de evitar a solidificação prematura de algum componente da fase oleosa no momento da união das fases. O aquecimento destas tem a vantagem de reduzir a viscosidade do sistema facilitando a transmissão da força de cisalhamento ao produto.

Podem ser preparadas pela técnica da inversão de fases, onde a fase que constituirá a fase dispersante é lentamente adicionada sobre a fase que será a fase dispersa, formando inicialmente uma dispersão do tipo fase dispersante/fase dispersa. Na medida em que a fase que constituirá a fase dispersante continua sendo adicionada ocorre então a inversão da emulsão, produzindo uma emulsão com tamanho médio de gotículas muito pequenas (AULTON, 2005).

Como na dispersão de duas fases imiscíveis, há um grande aumento na área de contato interfacial, a quantidade de energia fornecida para obtenção da dispersão traduz-se por elevação da energia livre de superfície deixando o sistema termodinamicamente instável (ANSEL et al, 2007). A reunião de duas ou mais gotas produz uma gota maior cuja área superficial é menor que a soma das áreas superficiais das gotículas anteriores, com a consequente redução da energia livre de superfície. Daí a tendência das gotículas reunirem-se em gotículas cada vez maiores, depois de cessado o fornecimento de energia que mantém a fase dispersa na forma de gotículas, até que aconteça a separação total das fases (ANSEL et al, 2007). A adição de um agente emulsificante capaz de reduzir a tensão interfacial das gotículas pode reduzir a coalescência das gotículas a níveis insignificantes, reduzindo a instabilidade termodinâmica das emulsões que podem permanecer estáveis por longos períodos, (GENNARO *et al*, 2004).

A maioria dos agentes emulsificantes são substâncias com moléculas contendo grupos polares e apolares. Em uma emulsão tal agente é adsorvido na interface entre as fases e, assim, reduz a tensão interfacial. Ao serem adsorvidos o emulsificante orienta-se na interface para que os grupos não polares, os quais têm afinidade com o óleo, apontem para a fase de oleosa, enquanto os grupos polares irão se direcionar para a fase aquosa. Assim, uma película é formada na interface, agindo como um filme interfacial que fornece um revestimento as gotículas da fase interna, impedindo a coalescência sob a influência da tensão interfacial.

A viscosidade das emulsões pode variar bastante dependendo de seus constituintes, podendo ser preparações mais fluidas, denominadas loções (via oral, tópica ou parenteral), ou semi-sólidas, denominadas cremes e unguentos (uso tópico) (SINKO, 2008). Em geral as

farmácias de manipulação fazem uso de ceras auto-emulsionantes como base para cremes e loções, com destaque para as ceras Polawax[®] (álcool cetoestearílico e monoestearato de sorbitano polioxiethylênico 20 OE) e Lanette[®] (álcool cetoestearílico e lauril sulfato de sódio) indicadas pela boa estabilidade (ZANIN, 2001).

As emulsões usadas nas formulações precisam demonstrar estabilidade física sob as mais variadas condições. Devem, também, manter a consistência adequada para conseguir boa sensação sobre a pele, espalhar-se e liberar ingredientes ativos (TADROS et al., 2007). Emulsão estável é aquela que conserva as devidas proporções entre seus constituintes e mantém a superfície interfásica, mesmo após estar exposta a tensões decorrentes de fatores como temperatura, agitação e aceleração da gravidade (SILVAS; SOARES, 1996).

As emulsões contêm, frequentemente, um grande número de ingredientes tais como, carboidratos, proteínas e esteroides, cada um dos quais contribui para o crescimento de uma variedade de microorganismos. Mesmo na ausência de qualquer um dos ingredientes naturais mencionados anteriormente, a mistura de lipídeos e água em contato íntimo permite o desenvolvimento de microorganismos. Como consequência, a inclusão de um conservante na formulação é um fator essencial para garantir a estabilidade das preparações, no entanto, alguns aspectos devem ser levados em conta na seleção de um conservante. A contaminação microbiológica pode ocorrer durante a produção de uma emulsão e/ou durante o seu uso. Frequentemente, a contaminação microbiana pode ter origem em matérias-primas contaminadas ou por uso de condições de preparação pouco higiênica. Finalmente, o consumidor pode inocular o produto durante o seu uso. Consequentemente, um conservante ou um conjunto de conservantes, devem proteger a emulsão contra todas estas possíveis contaminações (SANTOS, 2006).

3.2.1 Cera Lanette[®]

É uma dispersão coloidal de álcool cetoestearílico e lauril sulfato de sódio, agente de consistência, auto-emulsionável, aniônica, com alta viscosidade e pH entre 5,0 e 6,5. Sua dosagem varia conforme a consistência e o teor dos componentes graxos a serem emulsionados, em geral, usam-se entre 5 a 12% de cera Lanette[®] conforme se queira uma loção cremosa ou um creme bastante consistente. Para o preparo das emulsões a cera quando fundida é acrescida dos componentes oleosos. Paralelamente os componentes hidrossolúveis

devem ser adicionados à quantidade necessária de água, para então que na mesma temperatura sejam adicionados aos componentes oleosos. (CHEMSPECS, 2006).

A emulsão formada é do tipo H/L, onde podem ser incorporados emolientes, umectantes, hidratantes e outros ativos. Este produto apresenta significativa comercialização pelo fácil preparo e manuseio, com boas características sensoriais e capacidade de estabilizar boa parte das formulações. (BASTITUZZO; ITAYA; ETO, 2004).

3.3 Controle de qualidade

O termo controle de qualidade pode ser definido um conjunto de operações que objetivam verificar se o produto está em conformidade com as especificações regidas por farmacopeias e legislações vigentes. A inadequação a essas práticas representa um somatório de atribuições para a empresa que podem resultar em prejuízos, perda de credibilidade e até a perda da licença de funcionamento e do registro do produto. Ao paciente, a ausência de qualidade do medicamento compromete a sua saúde (PEIXOTO et. al., 2005).

Para obtenção de medicamentos com qualidade, todo processo envolvido na produção deve ser monitorado, incluindo: controle do meio ambiente, controle da fabricação e controle final do produto acabado. A contaminação cruzada é um dos pontos críticos para a manutenção da qualidade dos medicamentos. Os fatores predisponentes da ocorrência são: utilização de equipamentos e vidrarias mal lavadas, presença de pó suspenso no ar e as condições relacionadas ao próprio manipulador (MARTINELLI et al., 2005).

Alguns fatores dificultam a prática do controle de qualidade pelas farmácias de manipulação, tais como: alto custo, necessidade de investimento inicial para adequação de área física e aquisição de equipamentos básicos para a realização dos testes mínimos exigidos, necessidade de treinamento contínuo de pessoas, complexidade de algumas análises, entre outros (BARBOSA, 2001). O grande desafio das farmácias de manipulação é a sobrevivência em longo prazo diante das obrigatoriedades impostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A ANVISA, determina que seja cumprida a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 67, de 8 de outubro de 2007, que dispõe sobre as boas práticas de manipulação das preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácia, buscando estabelecer rígidos parâmetros de qualidade em todas as etapas de fabricação de um produto manipulado. Estabelecendo que as farmácias de manipulação para se adequarem às normas precisam

estabelecer testes de controle microbiológico e físico-químico, para suas matérias primas, bem como as bases farmacêuticas, e produtos acabados (BRASIL, 2007).

A farmácia tem por obrigação submeter todas as matérias-primas, e por amostragem os produtos acabados, aos testes exigidos, sendo que pode decidir por realizar ou terceirizar estes serviços. A realização de tais atividades é considerada um atributo de caráter não apenas social, mas também, legal, ético e moral. Que venha a ser admitida como uma prática rotineira na fabricação de medicamentos, para garantir melhor qualidade nos produtos elaborados (LINSBINSKI, 2008).

3.3.1 Controle de Qualidade Microbiológico

A realização do controle de qualidade nas farmácias de manipulação é de suma importância para que a qualidade microbiológica dos insumos utilizados e dos produtos acabados seja assegurada, garantindo eficácia, segurança e credibilidade dos medicamentos manipulados e dispensados à população (MARTINELLI et al., 2005).

O uso seguro e eficaz de medicamentos e cosméticos requerem análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e do produto acabado, como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário aos mesmos. Em relação ao controle de qualidade microbiológico de produtos não estéreis, nos quais se admite a presença de carga microbiana limitada, o objetivo imediato desta análise é comprovar a ausência de microrganismos patogênicos e determinar o número de microrganismos viáveis, em função da utilização do produto, por exemplo para uso tópico ou oral (ANDRADE et al., 2005).

Deve-se ressaltar que carga microbiana elevada pode comprometer a estabilidade do produto, conseqüentemente, pode haver perda da eficácia terapêutica, por degradação do princípio ativo ou por alteração de parâmetro físico fundamental para a sua atividade, como o pH. Variações de pH podem resultar em faixas de coloração distintas do corante ou em precipitações; produção de gases, provocando odor desagradável; ação enzimática promovendo degradação de tensoativos (lipases) ou macromoléculas (celulases), levando à quebra de emulsões (PINTO et al., 2000).

Preparações cosméticas para uso tópico pode veicular microrganismos indesejáveis provenientes da água empregada, de outras matérias-primas presentes na mesma, dos manipuladores, do ambiente, da embalagem, dentre outros. Cosméticos têm como limites de aceitação, em termos de microrganismos aeróbios viáveis totais, não mais que 10^3 UFC / g ou

mL, sendo o limite máximo de 5×10^3 UFC/g ou ml; ausência de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e coliformes totais e fecais (BRASIL, 1999).

As contaminações dos produtos manipulados causam alterações sensoriais, degradação de componentes da formulação, alterações físicas e da aparência do produto. Dessa forma os tornam impróprios para o uso devido à perda da eficácia e segurança, podendo até mesmo causar danos à saúde dependendo do tipo do microrganismo presente, da via de administração utilizada e do estado de saúde do usuário do produto (SILVA; SILVA, 2011).

Acredita-se que as principais causas da contaminação microbiológica sejam as seguintes: a água que é utilizada tanto no processo de fabricação como na lavagem dos materiais e na limpeza de ambientes da sala de produção; a matéria-prima levando em consideração o prazo de validade e sua origem como natural ou sintética, pois matérias primas de origem natural favorecem o desenvolvimento dos microrganismos devido à capacidade de reter água. Acredita-se que a higiene do manipulador, como lavagem adequada das mãos, uniforme e não adequação as boas práticas de fabricação também estejam relacionados à contaminação (MARQUES; MOREIRA, 2009).

Os produtos manipulados em farmácias magistrais são classificados como produtos não estéreis. Para essa classificação admite-se a presença de carga microbiana, cujo objetivo é a quantificação e análise das bactérias viáveis, comprovando ausência de microrganismos patogênicos. A determinação dos microrganismos patogênicos varia de acordo com a via de administração do produto (nasal, oral, tópico e via respiratória). No entanto, os testes microbiológicos são dispendiosos economicamente levando as farmácias de manipulação a analisar somente as matérias-primas e terceirizar, por lote ou amostragem, a análise do produto acabado (MEDEIROS, 2013; SILVA; SILVA, 2011).

3.4. Conservantes

Sabe-se que contaminantes microbianos podem causar a deterioração de produtos farmacêuticos por meio de mudanças químicas e físicas, tornando-os inapropriados para consumo. Microorganismos são capazes de crescer em produtos aquosos quando nutrientes estão disponíveis e quando as condições ambientais são suficientes, desta forma fármacos podem ser metabolizados e transformados em formas menos potentes ou quimicamente inativas. Como também utilizados como substrato para o crescimento de microrganismos (PEREIRA, 2011).

Os riscos do uso de produtos contaminados estão nos danos e infecções que os microrganismos podem causar ao consumidor. Nas décadas de 60 e 70, houve vários relatos de infecções devido ao uso de loções para mãos e cremes contaminados, resultando em infecções hospitalares e septicemia devido a bactérias gram negativas, especificamente *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp* e *Serratia spp* (PEREIRA, 2011).

Os conservantes são substâncias adicionadas aos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes com a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações causadas por microorganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto (BRASIL, 2003). Também conhecidos como conservantes, possuem ação bacteriostática e/ou fungistática, reduzindo a probabilidade de crescimento microbiano em produtos que contenham água em sua constituição e em produtos anidros que podem ser contaminados ou umedecidos durante o uso. Possuem como alvo bactérias, bolores e leveduras (ZANON, 2010).

A escolha do conservante tem que ser realizada conforme as características da formulação como: susceptibilidade à contaminação, característica físico-químicas e possíveis incompatibilidades. Um conservante é dito ideal quando apresenta largo espectro de atuação, efetividade em baixas concentrações, solubilidade em meio aquoso, estabilidade em temperatura ambiente, efetividade e estabilidade no pH do produto, não alterar as características do produto (cor, odor, sabor, viscosidade, textura) , baixa toxicidade, custo/benefício aceitável para uso, inativar microrganismos rapidamente para prevenir a adaptação microbiana ao sistema conservante (AULTON, 2005; LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG , 2001; THOMPSON, 2006).

O número de compostos químicos permitidos para uso como conservantes em alimentos e produtos farmacêuticos é limitado. Isso ocorre, principalmente, devido aos problemas de toxicidade e potencial alergênico desses compostos. Produtos aquosos não estéreis precisam de sistemas conservantes que sejam capazes de reduzir sua carga microbiana a níveis aceitáveis em um período de tempo razoável e que garanta a ausência de patógenos. Onde se espera que a atividade do conservante garanta que qualquer microrganismo introduzido pelo consumidor seja rapidamente eliminado no período entre usos (PEREIRA, 2011).

A concentração de conservante necessária numa emulsão depende em grande medida da sua capacidade para interagir com os microrganismos. Uma vez que os microrganismos podem estar presentes na água, na fase oleosa ou em ambas, o conservante independentemente do seu coeficiente de partição água/óleo, deve estar disponível numa

concentração eficaz em ambas as fases. É praticamente inconcebível que um único conservante possa se distribuir entre as fases em concentrações eficazes, independentemente das suas composições. Assim, é frequente incluir um conservante solúvel na fase aquosa e outro solúvel na fase oleosa (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Dentre alguns dos conservantes que podem ser citados e que são comumente utilizados por farmácias magistrais nesses tipos de formulações estão os parabenos. Muito utilizados por não possuírem odor, não serem irritantes a pele e por possuírem baixa toxicidade (FERREIRA, 2002).

3.4.1 Parabenos

Os parabenos são uma das classes de conservantes mais utilizadas. Sua primeira aplicação na indústria farmacêutica data de 1920, caracterizam-se pelo amplo espectro de ação, sendo ativos contra fungos, leveduras e bactérias gram positivas. O mecanismo de ação desses conservantes está relacionado com o efeito inibitório no transporte de membranas e função mitocondrial, tanto na fase germinativa quanto vegetativa (SONI; BURDOCK; GREEMBER, 2001; TAVARES; PEDRIALI, 2011).

Quimicamente, são obtidos através da reação de esterificação do ácido p- hidro xibenzóico (Figura 2) com álcool em meio ácido , onde se classificam em metil, etil, propil, butil, isopropil, isobutil e benzilparabenos (SANTOS, 2006).

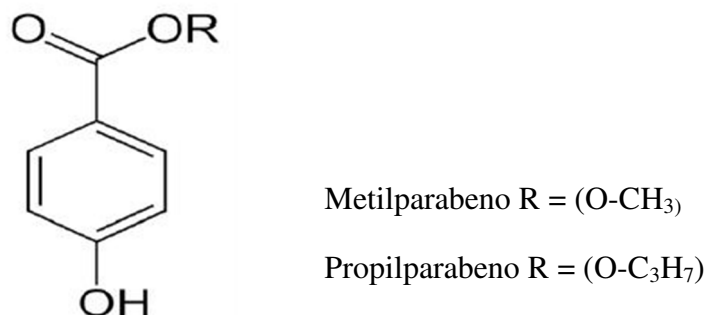


Figura 2– Estrutura química do ácido p-hidroxibenzóico. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2006.

Suas características físico-químicas lhe fornecem boa compatibilidade com os componentes da formulação, apresentam baixa toxicidade, alergenicidade e baixo custo. Inodoros, incolores a branco, com atividade em ampla faixa de pH e temperatura. Por outro lado, possuem baixa eficiência contra bactérias gram negativas e hidrossolubilidade limitada.

O metilparabeno e propilparabeno são os mais utilizados, principalmente, em combinação, numa concentração que varia de 0,01 a 0,3% (AULTON, 2005; SANTOS, 2006).

O uso destes compostos é regulamentado pela ANVISA conforme a RDC nº 5/07, e a RDC nº 162/01, que respectivamente estabelece o uso desses conservantes em alimentos e o uso em cosméticos. (BARZOTTO et al., 2009). Por possuírem estrutura similar aos salicilatos, eles podem desencadear urticária e angioedema em indivíduos com intolerância a esta classe farmacológica (SIQUEIRA, 2005).

Vários estudos apontam a ação estrogênica dos parabenos, relato como o de Darbre e Everett (2004) que constataram a presença de parabenos em tecido retirado de câncer de mama, pôs em questionamento a segurança destes conservantes. A capacidade de se acumularem nas células adipócitas do tecido mamário, está de acordo com a sua lipossolubilidade crescente proporcional a sua cadeia alquílica. Em termos de resposta fisiológica, o aumento da concentração de parabenos pode levar a uma expressão gênica e proliferação celular de câncer mamário da mesma forma que o 17 - β estradiol (STRANGE, 2008).

3.4.2. Teste de eficácia do sistema conservante (Teste do desafio)

O teste de desafio, ou challenge test, tem como objetivo avaliar a eficácia do sistema conservante necessário à proteção satisfatória do produto, desde a fabricação até o prazo final de validade. Consiste na contaminação proposital do produto com microrganismos específicos e avaliação desta carga em intervalos de tempo definidos. Para o teste do desafio é importante ter conhecimento sobre microbiologia. Requerendo local adequado, sob condições de higiene, limpeza e segurança que satisfaçam este processo (GUIA ABC DE MICROBIOLOGIA, 2008).

Sendo indicado durante os processos de desenvolvimento, lotes piloto e do produto acabado. Pode ser executado não somente em produtos intactos, mas também pode ser utilizado para avaliar a eficácia de proteção durante seu uso (CAMPANA et al, 2006).

Tem como princípio fundamental a inoculação separadamente, de diversos recipientes do produto com uma concentração conhecida de vários organismos testes. Na sequência, as amostras são retiradas de cada um ao longo de um período estabelecido de tempo, determinando-se a proporção de inóculo que conseguiu sobreviver (AULTON, 2005). Recomenda-se o uso de cinco microorganismos-teste (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*,

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) cada um em uma concentração final de 10^5 a 10^6 células mL^{-1} ou g^{-1} no produto. As contagens de células são realizadas em amostras retiradas após 7,14, 21 e 28 dias.

As propriedades conservantes da preparação são adequadas se, durante o teste, nas condições do mesmo, houver queda significativa ou nenhum aumento do número de microorganismos na preparação inoculada, após os tempos e temperaturas preconizadas. O critério de aceitação, em termos de diminuição do número de microorganismos com o tempo, varia com diferentes tipos de preparação, de acordo com o grau de proteção pretendida (PEREIRA, 2011).

Os testes de eficácia conservante são utilizados com esse propósito, em vez dos ensaios químicos dos conservantes, porque normalmente não é possível prever como a atividade de uma substância conservante pode ser influenciada pelos constituintes ativos, adjuvantes de formulação e pelo próprio material do recipiente (AULTON, 2005).

3.4.2.1 Microrganismos teste

Os marcadores microbiológicos exigidos para o teste de eficácia de conservantes descrito pela Farmacopéia Brasileira V são as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

O *Staphylococcus aureus* pertence a um grupo de microrganismos gram-positivos, não formadores de esporo, presente na cavidade nasal e na pele de pessoas normais e de animais. É uma das espécies patogênicas mais comum, juntamente com a *Escherichia coli*. Têm forma esférica (são cocos), cerca de 1 micrometro de diâmetro, formando grupos com aspecto de cachos de uvas com cor amarelada, devido à produção de carotenóides, sendo daí o nome de "estafilococo dourado" (SANTOS, 2006).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo, aeróbico. Este bacilo pode ser encontrado em pares, em pequenas cadeias ou sozinho. Estão amplamente distribuídas no solo e na água, embora normalmente não sejam patogênicos. É reto ou levemente encurvado e mede 1 a 5 micrometros de comprimento e 0,5 a 1 micrometro de largura, sendo móvel devido à presença de um ou mais flagelos polares. É nutricionalmente versátil, onde não requer muitos valores de crescimento orgânico, caracterizando-se como um agente oportunista. (ZAVASCKI, 2003).

As bactérias *Escherichia coli* são aeróbias e anaeróbias facultativas, assumem a forma de um bacilo gram-negativo, são facilmente cultivadas em laboratório e relativamente conhecidas sob o ponto de vista genético. São utilizadas como indicador de contaminação fecal, pois tem habitat exclusivo no trato intestinal. Sua presença na água, por exemplo, indica a possibilidade de também estarem presentes microrganismos entéricos/ patogênicos, onde alguns sorotipos de *E. coli* são responsáveis por gastroenterites, sendo a diarreia o principal sintoma (CORDEIRO et al., 2004).

Candida albicans é um fungo pleomórfico normalmente encontrado na mucosa dos tratos gastrointestinal e genitourinário, em 30 a 60% da população, onde reside em equilíbrio com a flora microbiana e o sistema imune do hospedeiro. (OSTROSKY-ZEICHNER; PAPPAS, 2006; SANTOS et al., 2006). É considerada uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas que em doentes imunocomprometidos podem ser fatais (CARDOSO et al, 2004).

Aspergillus niger é um fungo filamentosos, sendo considerado o mais comum dos fungos filamentosos, como também um dos mais bem estudados. Possui ampla distribuição, estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vivos, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical. (ROCHA, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Amostras

- Emulsões à base de cera Lanette[®] manipulados na Farmácia Escola Manuel Casado de Almeida (cuja formulação está descrita no anexo I).

4.1.2. Microorganismos teste

- *Escherichia coli* ATCC 11105;
- *Pseudomonas aeruginosas* ATCC 9027;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- *Aspergillus niger*;
- *Candida albicans*.

4.1.3 Substâncias e meios de cultura

- Ágar Caseína – soja;
- Ágar Sabouraud-dextrose;
- Tampão peptona cloreto de sódio pH = 7,0;
- Cloreto de Sódio 0,9%;
- Polissorbato de sódio 80 (Tween 80);
- Água destilada.

4.1.4. Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Marte, mod AY220;
- Balança semi-analítica, Bel Engineering, Mark[®];
- Espectrofotômetro Viável Digital Microprocessado, Quimis[®];
- Estufa de secagem e esterilização, Biopar[®];
- Estufa Bacteriológica, Qualxtron[®];

- Autoclave Vertical, Phoenix[®];
- Pipetas automáticas, Digipet[®];
- Contador digital;
- Bico de Bunsen;
- Banho-maria Termostático, Hydrasan[®];
- Ponteiras;
- Alça platinada;
- Pissetas com álcool a 70%.

4.1.5. Vidrarias

- Béqueres;
- Bastão de vidro;
- Erlenmeyers;
- Placas de Petri;
- Pipeta graduada;
- Tubos de ensaio.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo de culturas estoques

Seguindo as instruções especificadas no rótulo preparou-se os meios de cultura, esterilizando-os em autoclave a 121°C por 15 min. Em seguida os meios foram distribuídos em tubos e inclinados, a fim de se obter meio inclinado para o repique das cepas padrão que servirão para a execução do teste.

4.2.2 Padronização do inóculo

A partir de culturas estoques, as bactérias foram transferidas com auxílio de alça platinada para meio inclinado de ágar caseína-soja. Incubou-se estas culturas por 24 horas a 36°C. Após este período de incubação adicionou-se ao meio 1 ml de salina a 0,9% com leve homogeneização (Figura 3). Realizou-se diluições seriadas da suspensão até que se encontrasse com auxílio do espectrofotômetro no comprimento de onda 580 nm, a diluição que apresentasse 85% de transmitância. Equivale ao tubo 0,5 na escala de McFarland, ou seja, $1,5 \times 10^8$ UFC/ml para bactérias e $1,5 \times 10^6$ UFC/ml para fungos.

A padronização dos fungos difere das bactérias, apenas pelo meio utilizado, neste caso meio ágar Sabouraud-dextrose. Para *A. niger* a diluição é facilitada pela suspensão dos esporos em 2 ml de salina 0,9% adicionada de 0,2 ml de polissorbato de sódio 80 a 0,05%.

4.2.3 Contaminação da amostra

Foi reservado 30 g da emulsão Lanette® em recipiente plástico para cada microorganismo e adicionou-se 1 ml do inóculo (figura 3) padronizado, homogeneizando com bastão vidro estéril para que houvesse uma distribuição homogênea dos microorganismos. O mesmo procedimento foi realizado com a emulsão sem conservante, para assegurar que a quantidade do microorganismo está de acordo com os compêndios oficiais e observar o comportamento microbiano sem a presença dos conservantes.

4.2.4 Contagem dos microorganismos viáveis

Logo após a inoculação realizar o plaqueamento pelo método de profundidade ou “pour plate” para cada microrganismo nos tempos 0 (essencial para que se confirme a concentração inicial do inóculo), 7, 14, 21 e 28 dias. Usar meio ágar caseína soja para as bactérias com período de incubação em torno de 4 dias a 30-35°C, já o meio ágar sabourad-dextrose para bolores e leveduras com incubação em torno de 7 dias a 20-25°C.

4.2.4.1 Preparo da amostra

- Foi transferido 1 g da emulsão contaminada para 9 ml de tampão fosfato pH = 7,0 (diluição 1:10);
- Em seguida transferiu-se 1 ml desta diluição para mais 9 ml do tampão (diluição 1:100);
- Desta última diluição (1:100) retirou-se 1 ml e adicionou-se a mais 9 ml do tampão (diluição 1:1000).

Realizou-se o plaqueamento pelo método de profundidade em duplicata para cada diluição. O mesmo procedimento deve ser executado com as emulsões contaminadas que não possuem conservantes.

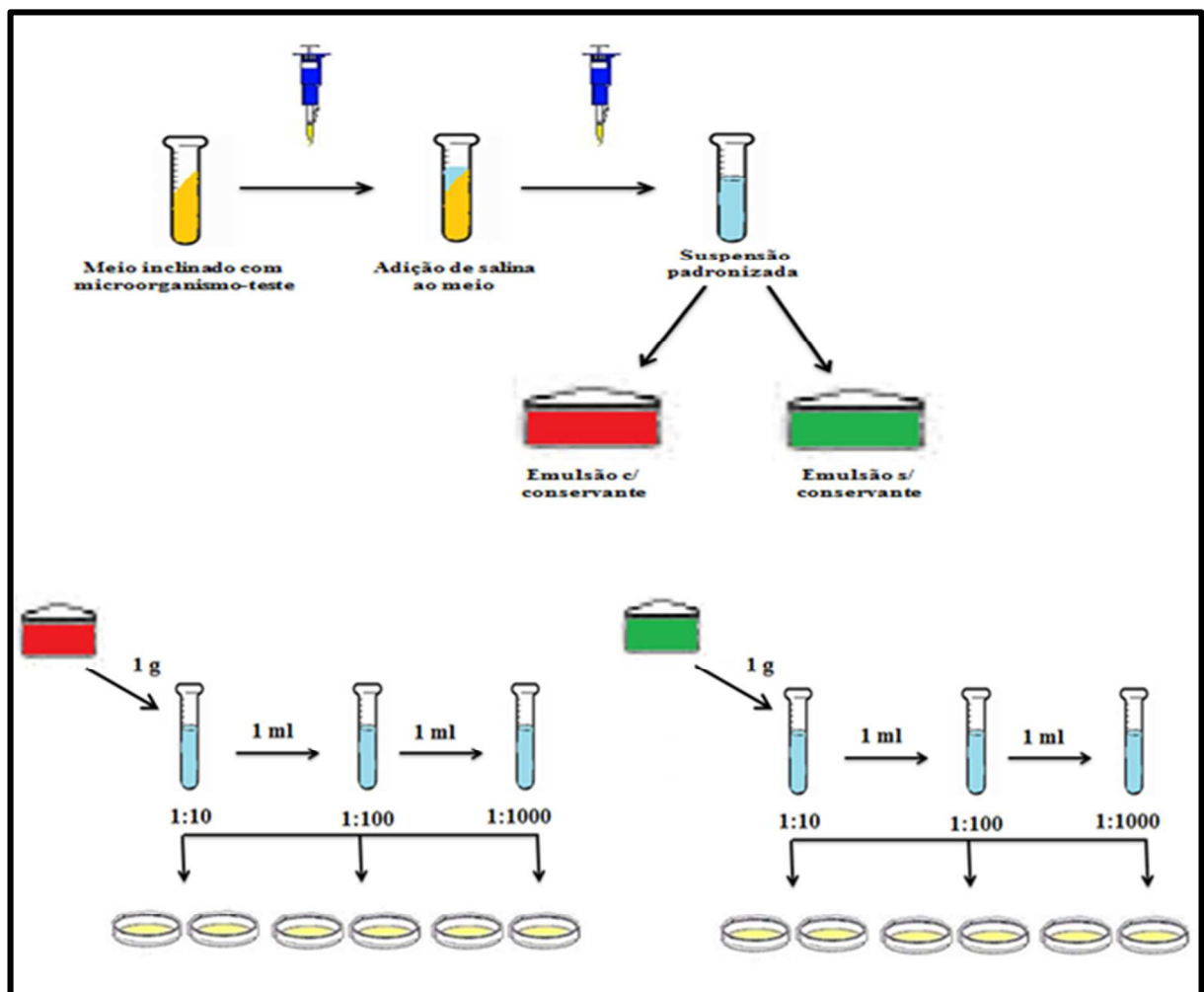


Figura 3 – Esquematização da execução do teste do desafio.

Fonte: elaborado pela autora

4.2.5 Interpretação dos resultados

Seguindo os parâmetros da Farmacopéia Brasileira V, foi estabelecido como critério de aprovação que as bactérias reduzam seu crescimento em pelo menos 2 log no 14º dia e não aumentem até os 28 dias. Para os bolores e leveduras, não aumentar a contagem inicial do 14º ao 28º dia.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os produtos estão sujeitos à contaminação por microrganismos e o crescimento destes depende de fatores físicos e químicos, como também atividade de água, formulação, temperatura de armazenamento e a presença ou ausência de substâncias antimicrobianas. As formulações não estéreis são acrescidas de conservantes para reduzir o crescimento microbiano no produto. Uma vez que sua contaminação pode acontecer no decorrer do processo de fabricação ou durante o uso pelo consumidor, numa exposição ao ambiente úmido e no contato com a pele. Mesmo que o desenvolvimento de microrganismos não patogênicos ocorra, estes podem gerar falhas de qualidade do produto (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

O teste do desafio é empregado para avaliação da capacidade antimicrobiana dos conservantes utilizados, sendo requisito essencial para garantir a segurança, principalmente, dos produtos multidoses. Nesta pesquisa, os resultados do teste foram obtidos pela contagem de microrganismos viáveis (Tabela 1), cujo sistema conservante avaliado era composto por metilparabeno (nipagin) a 0,15% e propilparabeno (nipazol) a 0,04%.

Tabela 1 – Contagem de microrganismos viáveis (UFC/g) no teste de eficácia de conservantes.

Emulsão	Microorganismos	Tempo em dias				
		0	7	14	21	28
Emulsão sem conservantes	<i>E. coli</i>	1,19 x 10 ³	7,5 x 10 ²	4,9 x 10 ²	8 x 10 ¹	4 x 10 ¹
	<i>P. aeruginosa</i>	1,5 x 10 ³	1,8 x 10 ²	9 x 10 ¹	5 x 10 ¹	<10
	<i>S.aureus</i>	3,1 x 10 ²	1,5 x 10 ²	5 x 10 ¹	3 x 10 ¹	<10
	<i>C. albicans</i>	2,57 x 10 ³	2,3 x 10 ²	1 x 10 ¹	<10	<10
	<i>A. niger</i>	4,5 x 10 ³	3,45 x 10 ³	2,85 x 10 ³	2,45 x 10 ³	2 x 10 ³
Emulsão com conservantes	<i>E.coli</i>	5,5 x 10 ²	7 x 10 ¹	3 x 10 ¹	3 x 10 ¹	1 x 10 ¹
	<i>P. aeruginosa</i>	4,5 x 10 ²	1,6 x 10 ²	3 x 10 ¹	1,5 x 10 ¹	<10
	<i>S.aureus</i>	1,8 x 10 ²	4,5 x 10 ¹	<10	<10	<10
	<i>C. albicans</i>	1,5 x 10 ¹	<10	<10	<10	<10
	<i>A. niger</i>	4,6 x 10 ³	<10	<10	<10	<10

Os dados da Tabela 1 apresentam diferentes reduções na contagem microbiana, evidenciando, como esperado, maior diminuição para a formulação com sistema conservante. Observou-se maior eficácia frente aos fungos, com inibição total de crescimento a partir do 7º dia. Em relação às bactérias, obteve-se inibição total de crescimento para *S. aureus*, a partir do 14º dia, e para *P. aeruginosa* apenas no 28º dia. Não houve inibição total de crescimento para *E.coli*.

O crescimento microbiano é favorecido quando algum dos componentes da emulsão constitui um meio nutritivo adequado, neste caso a água e os ácidos graxos presentes. As bactérias tendem a se desenvolver na fase aquosa e os fungos na interface entre as duas fases. De uma forma geral as emulsões H/L são mais susceptíveis a proliferação bacteriana, devido a maior proporção de água (SANTOS 2011).

Tendo-se por base os critérios de aceitação da Farmacopéia Brasileira V, considerou-se que para bactérias deveria ocorrer uma redução de pelo menos 2 log no 14º dia e que não houvesse aumento em 28 dias. Já para os fungos que a contagem não aumentasse no 14º e 28º dias.

Tabela 2 – Número de sobreviventes em logaritmo base 10 (Log UFC/g) no teste de eficácia de conservantes.

Emulsão	Microorganismos	Tempo em dias				
		0	7	14	21	28
Emulsão sem conservantes	<i>E. coli</i>	3,07	2,87	2,69	1,90	1,60
	<i>P. aeruginosa</i>	3,17	2,25	1,95	1,69	0
	<i>S.aureus</i>	2,49	2,17	1,69	1,47	0
	<i>C. albicans</i>	3,40	2,36	1	0	0
	<i>A. niger</i>	3,65	3,52	3,45	3,38	3,30
Emulsão com conservantes	<i>E.coli</i>	2,74	1,84	1,47	1,47	1
	<i>P. aeruginosa</i>	2,65	2,20	1,47	1,17	0
	<i>S.aureus</i>	2,25	1,65	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,17	0	0	0	0
	<i>A. niger</i>	3,66	0	0	0	0

Os resultados foram tabelados, transformados em log (Tabela 2) e representados graficamente em uma curva logarítmica de decréscimo de carga microbiana em função do tempo, denominada curva de letalidade.

Diante dos resultados expostos observa-se que a *E. Coli* e a *P. aeruginosa*, não foram inibidas como o esperado. Pois, apresentaram inibição de 1,27 e 1,18 log respectivamente, não atingindo a redução exigida de 2 logs no 14º dia do teste. Embora se tenha observado inibição progressiva, *P. aeruginosa* até o 21º dia apresentou redução de apenas 1,48 log com inibição total no 28º dia (Figura 5). *E. coli* apresentou redução de apenas 1,74 log até o 28º dia (Figura 4). *C. albicans* e *A. niger* (Figuras 7 e 8) apresentaram inibição total de crescimento no tempo 7, e *S. aureus* no 14º dia (Figura 6).

No tocante às formulações sem conservante, apresentaram inibição progressiva de crescimento, no entanto, em menor proporção que as formulações com conservante. *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram inibidos, respectivamente, em 1,48 log e 1,02 log no tempo de 21 dias, não mais apresentando crescimento no 28º dia (Figuras 5 e 6). Já *E. coli* demonstrou redução de 1,47 log, com crescimento até o 28º dia. A *C. albicans* sofreu redução de 2,4 log no 14ª dia e inibição total no 21º dia (figura 7). No entanto, *A. niger* apresentou crescimento até o final do experimento, com redução de apenas 0,35 log (Figura 8). Estes dados comprovam a necessidade de um sistema conservante adequado para garantir a estabilidade microbiológica das formulações analisadas.

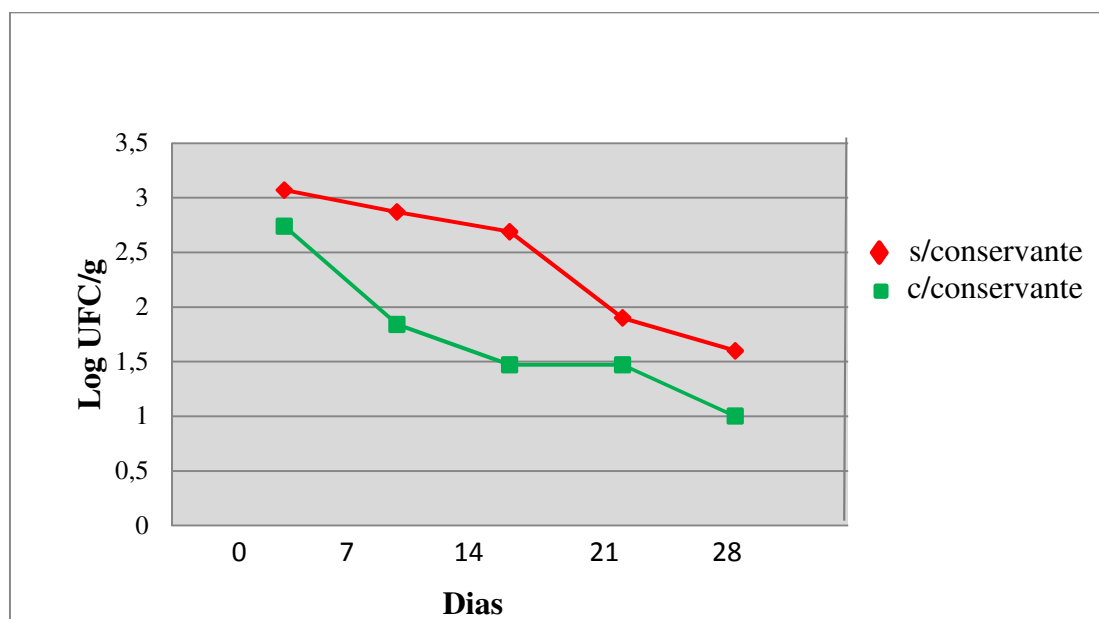


Figura 4 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g da *E. coli* para a emulsão lanette® sem e com conservantes.

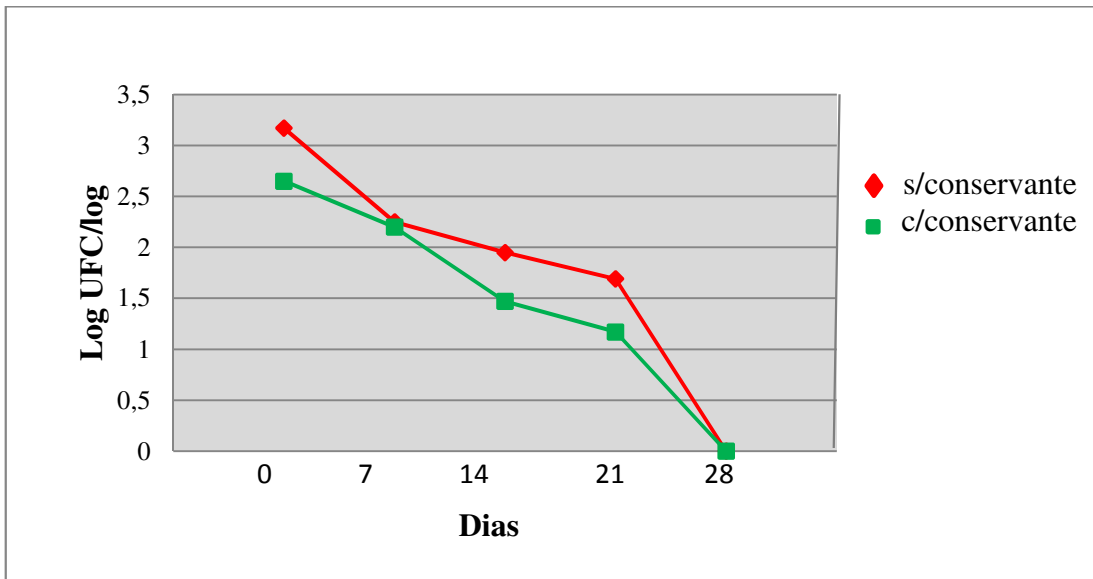


Figura 5 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do *P. aeruginosa* para a emulsão lanette® sem e com conservantes.

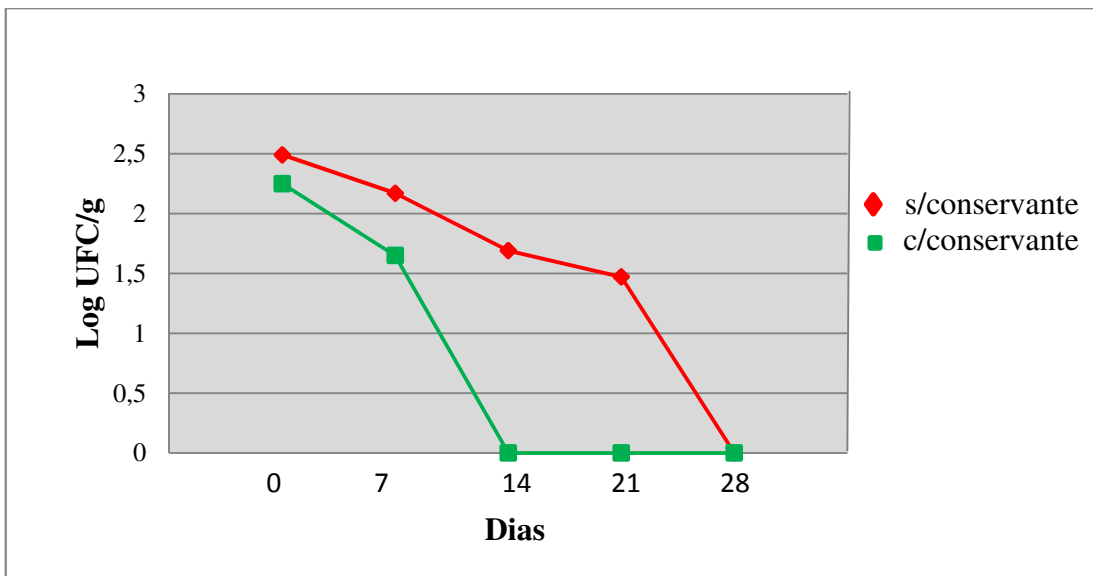


Figura 6 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do *S. aureus* para a emulsão lanette® sem e com conservantes.

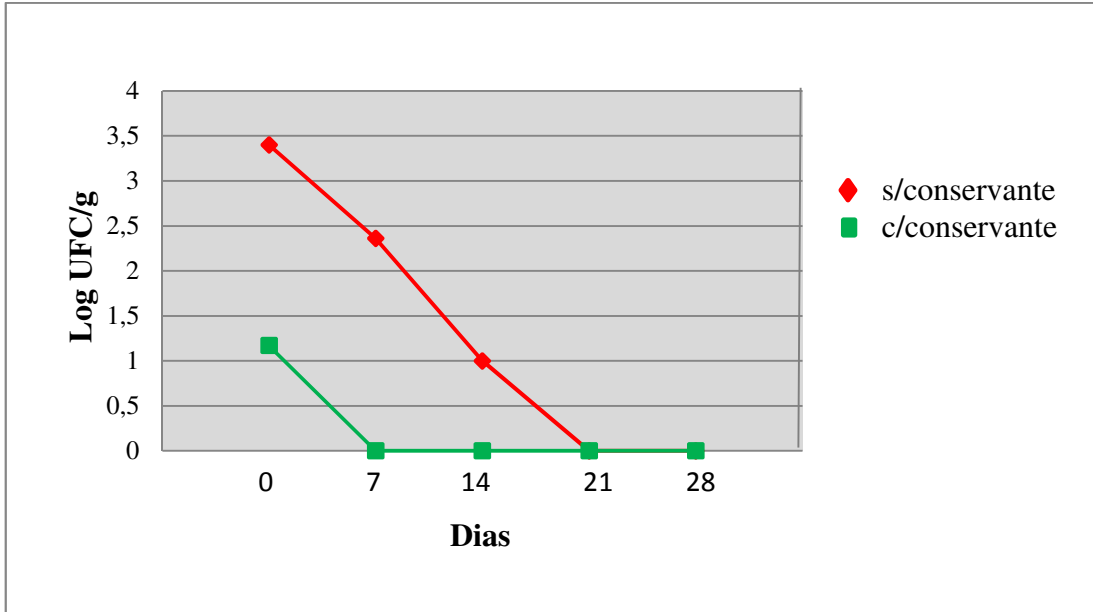


Figura 7 – Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do *C. albicans* para a emulsão lanette® sem e com conservantes.

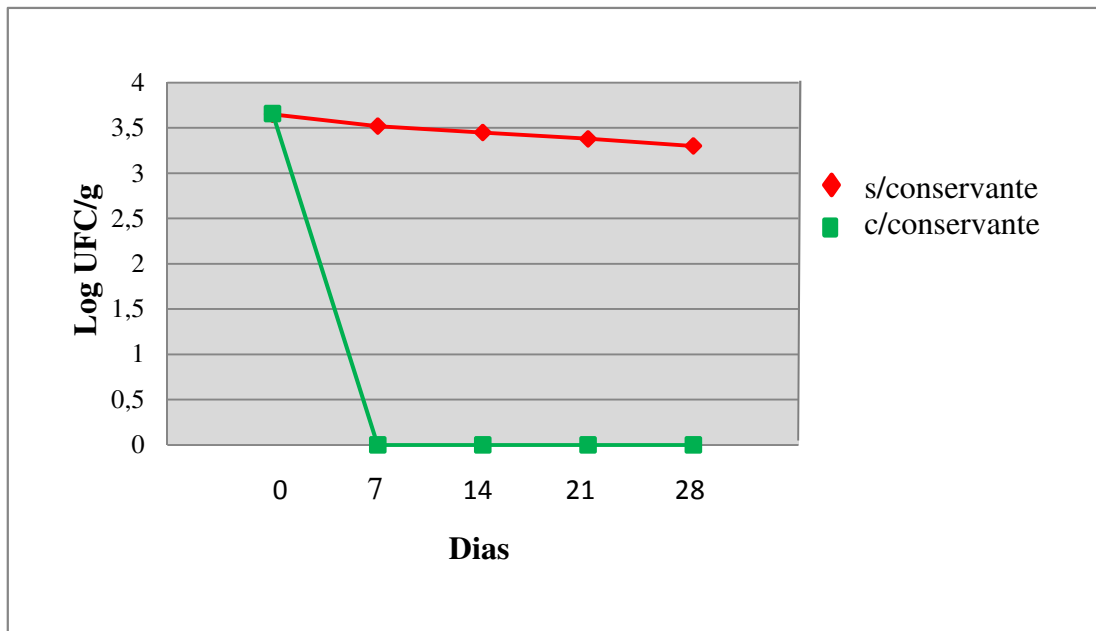


Figura 8– Perfil das curvas de inibição Log UFC/g do *A. niger* para a emulsão lanette® sem e com conservantes.

A regulamentação brasileira para o uso de conservantes em produtos de higiene pessoal e cosméticos é regida pela RDC nº 162/01 que determina o uso máximo de 0,4% de

cada parabeno e 0,8% de parabenos total na formulação. Em emulsões do tipo H/L os parabenos se distribuem na interface do sistema, onde frequentemente mais de um é usado, na forma de misturas de parabenos com diferentes solubilidades para que haja a conservação tanto na fase aquosa quanto na oleosa. (LEMINI, 1997; El HUSSEN et al, 2007). Possuem alto coeficiente de partição L/H, uma vez que o aumento da cadeia alquila deste grupo causa elevação da atividade antimicrobiana e a diminuição da sua hidrossolubilidade. (COMÉTICOS & PERFUMES, 2007).

Os ésteres do ácido p-hidroxibenzóico são utilizados em combinação uns com os outros devido à sua ação sinérgica, uma vez que o metílico é solúvel em água, enquanto que o propílico e os estéres de cadeia maior são praticamente insolúveis no meio aquoso. Metilparabeno é o menos ativo da classe, com melhora da atividade quando combinado a outros como o propil, etil e butilparabenos. (ZANON, 2010)

Em análise dos constituintes que compõem a emulsão, verificou-se a presença de EDTA (Etileno- diamino- tetra-acetato) um agente quelante usado para fins anti-oxidantes devido a presença de metais. Ele contribui com os conservantes, potencializando o efeito antimicrobiano, devido à capacidade de aumentar a permeabilidade da parede celular bacteriana e de alterar a estabilidade dos ribossomos de microrganismos (FARCA et al., 1997)

As bactérias tendem a se desenvolver na fase aquosa, a esta fase foi incorporado o metilparabeno na concentração de 0,15% (máximo permitido é 0,4%), que é o menos ativo dos parabenos e o mais solúvel em água (ZANON, 2010;SANTOS, 2011). Observando-se que *E.coli* e *P. aeruginosa* não apresentaram nível de inibição esperado frente aos conservantes, sugere-se que este comportamento pode está atrelado aos métodos de solubilização e incorporação pelo qual o metilparabeno foi acrescentado a fase aquosa, a concentração utilizada, a incompatibilidade com outros componentes da formulação ou a necessidade da adição de um terceiro conservante ao produto. Configurando pontos críticos capazes de determinar a qualidade da conservação.

Os melhores métodos para incorporar parabenos em uma formulação incluem: pré-dissolução em um solvente apropriado, como o propilenoglicol, adição do sal a temperatura ambiente (os sais de parabeno são altamente solúveis em água) e ajuste do pH a faixa cosmética, ou adicionar o parabeno em pó a temperatura de emulsificação (75-80°C), na fase aquosa. Adicionar os parabenos na água antes de aquecê-la pode resultar em um tempo significativamente maior para dissolvê- los (COSMÉTICOS & PERFUMES, 2007)

Outro fator importante que pode ter comprometido o alcance de resultados satisfatórios para estas bactérias, é o fato de que a cera lanette[®] caracteriza-se como uma base auto-emulsionante de caráter aniônico. Pinto, Kaneko e Pinto (2010), afirmam que há uma incompatibilidade dos agentes aniônicos com esta classe de conservante, que ocasiona uma redução na capacidade antimicrobiana.

Com amplo espectro de ação, os parabenos são mais ativos contra fungos e contra bactérias gram-positivas, sendo considerados fracos contra bactérias gram-negativas (COSMÉTICOS & PERFUMES, 2007). Tal afirmação pode ser observada nos resultados exibidos, onde o maior grau de redução da carga microbiana ocorreu com os fungos *C. albicans* e *A. niger* (Figuras 9 e 10). Para Lachman, Lierberman e Kanig (2001), há necessidade da adição de um terceiro conservante, como por exemplo o imidazolidiniluréia, que possui sinergismo com parabenos e apresenta grande atividade com bactérias gram positivas, gram negativas e nenhuma frente aos fungos.

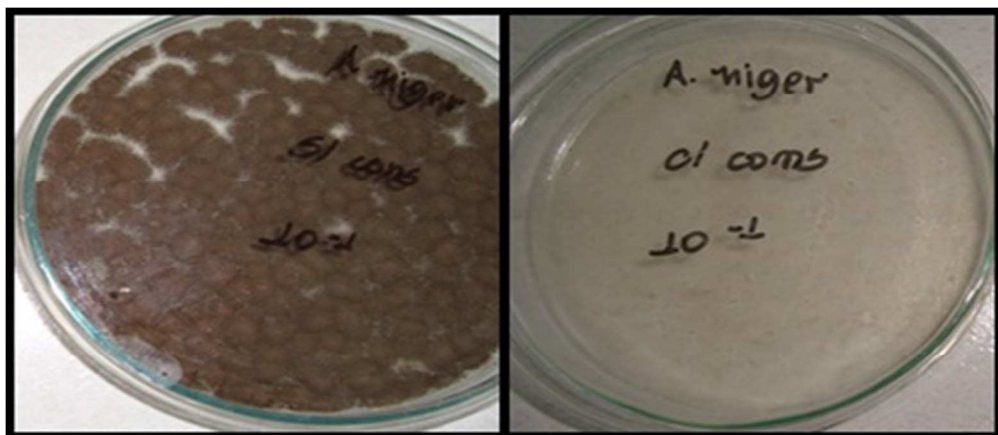


Figura 9 – Característica do crescimento de *A. niger* na formulação sem e com conservante.

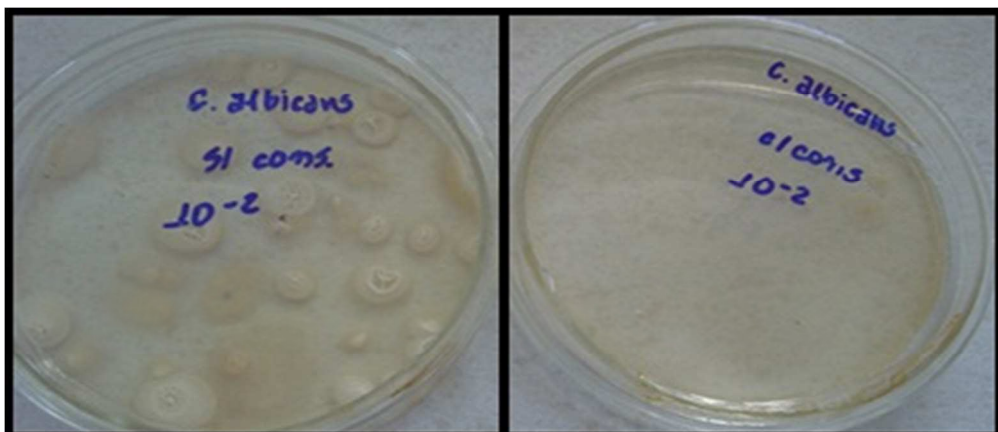


Figura 10 – Característica do crescimento de *C. albicans* na formulação sem e com conservante.

Diante dos resultados obtidos sugere-se novos estudos com o objetivo de identificar as causas da ineficácia do atual sistema conservante, frente aos microrganismos gram negativos, por meio de avaliação da eficácia conservante após as possíveis alterações no que se refere à formulação, tanto nas técnicas de manipulação, quanto na composição do sistema conservante, para a obtenção da eficácia adequada.

6. CONCLUSÃO

- O inóculo foi padronizado a 85% de transmitância através da espectrofotometria;
- Ao se observar a contagem de microrganismos viáveis nas formulações com e sem a adição de conservantes, constatou-se que o sistema conservante empregado na formulação apresentou capacidade de reduzir a carga microbiana a níveis consideráveis, principalmente para os fungos;
- Todos os microrganismos apresentaram decréscimo a partir do sétimo dia de execução do teste; notadamente, a fórmulação foi adequadamente conservada frente a três microrganismos desafiantes: *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger*
- Mesmo diante de bons resultados, comparando os valores preconizados pela Farmacopéia Brasileira V com os obtidos ao final do experimento, não foi observada inibição adequada para os microrganismos gram negativos, *E. coli* e *P. aeruginosa*..

REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed. São Paulo: Artmed, 2007.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; LOYD, V. O. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005.

BABY, A.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomenbrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 44, n. 2, 2008.

BABY, A.R. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas**. São Paulo, v. 44, n.2, 2008.

BARBOSA, E. RDC 33 sob fogo cruzado. **Pharm. Bras**. Brasília, n. 24, 2001.

BARBOSA, S. F.; MINETOMA, T. T. I. Emulsões. **Revista Racine**. São Paulo, n. 65, 2001.

BARZOTTO, I.L.M. et al. Estabilidade de emulsões frente a diferentes técnicas de homogeneização e resfriamento. **Visão Acadêmica**. São Paulo, v.10, n.2, 2009.

BASTISTUZZO, J.A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário Médico Farmacêutico**. 2. Ed. São Paulo: Pharmabooks, 2004.

BELTRAMI, M. C. et al. Estudos de estabilidade acelerada de emulsões manipulados contendo o antiviral aciclovir. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v.9, n. 2, 2009

BONFILIO, R. et al. Farmácia magistral: sua importância e seu perfil de qualidade. **Revista Baiana de Saúde Pública**. Bahia, v.34, n.3, 2010.

BONTORIM, G. **Estudo de estabilidade de emulsão cosmética utilizando reologia e técnicas convencionais de análise**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOOCK, K. P. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacao*)**. 2007. 112f. São Paulo, 2007. 112p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 set. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/le-gis/resol/162_01rdc.htm>. Acesso em: 14 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 481 de 23 de setembro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 1999. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82f733004aee4c53b7cebfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+481+de+27+de+setembro+de+1999.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 30 de ago 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC n. 140 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 mai.2003. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_140_29_05_03.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC n. 67 de 8 outubro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 out. 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/segurancadopaciente/documentos/rdcs/RDC%20N%C2%BA%2067-2007.pdf>> Acesso em: 30 de ago 2013.

CAMPANA, R. et al. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative. **Lett Appl Microbiol**, v. 43, 2006.

CARDOSO, B.C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade do Minho. Portugal, 2004.

CHEMSPECS - **Especialidades Químicas**. Disponível em:

<http://www.chemspecs.com.br/img/LANETTE_WB.pdf>. Acesso em: 10 Jul.2013

COSMÉTICOS & PERFUMES. Conservantes. São Paulo, v.43, jan/fev/mar. 2007.

CORDEIRO, A.C.S.; LEITE, S.G.F.; DEZOTTI, M. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* **Química Nova**. Rio de Janeiro, v.27, n.,5, p. 689-694, 2004.

D' LEON, L. F. P. Estudo de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosmetic & Toiletries**, São Paulo, v. 13, n. 4, 2001.

DALLARMI, L.; MIGUEL, M.D.; CANSIAN, F.C. Desenvolvimento de emulsão dermatocossmética contendo manteiga de manga (*Mangifera indica* L.) *Anacardiaceae*. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v.13, n.1, 2012.

DENYER, S.; BAIRD, R. M.; HODGES, N.A. **Handbook of microbiological quality control: pharmaceuticals and medical devices**. 1ª Edição: Washington, D.C. CRC Press, 2000.

El HUSSEIN, S et al. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis–dermis layers (*ex-vivo* study). **Exp. Dermatol.** v.16, p. 830 –836, 2007.

FARCA, A.M.; PIROMALLI, G.; MAFFEI, F. Potentiating effect of EDTA-Tris on the activity of antibiotics against resistant bacteria associated with otitis, dermatitis and cystitis. **J. Small Anim. Prac.**, v.38, p.243-245, 1997

FARMACOPÉIA, Brasileira. 5. ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**: 2010.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. Juiz de Fora: Juiz de Fora, 2002.

GENNARO, A. R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GUIA ABC DE MICROBIOLOGIA. **Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosmético e Perfumes**. 3ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Volume II Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LANGE, M.K.; HEBERLE, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vale do Taquari, v. 45, n. 1, 2009.

LEMINI, C. et al. Estrogenic effects of p-hydroxibenzoic acid in CD1 mice. **Environ Res**. v.75, p. 130-34, 1997.

LINSBINSKI, L.M.; MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P. Avaliação da equivalência farmacêutica de comprimidos de captopril. **Rev. Bras. Farm.** Rio de Janeiro, v. 89, n.3, 2008.

MARQUES, M, F; MOREIRA, M, L. Análises Microbiológicas de Protetor Solar Manipulado nas Farmácias Magistrais do Município de Ipatinga/MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, Minas Gerais, v. 90, n. 2, 137-143, 2009.

MARTINELLI, H.K. et al. Avaliação do controle de qualidade realizado nas farmácias de manipulação e homeopáticas de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health**. São Paulo; v. 27, n.2, 2005.

MEDEIROS, A. C. D. et al. **Análise de contaminantes microbiológicos em produtos comercializados em farmácia de manipulação**. Disponível em: <http://sites.uepb.edu.br/biofar/download/v1n12007/pdf_analise_de_contaminates_microbiologispdf> Acesso em: 07 ago 2013.

MIGUEL, et. al. O cotidiano das farmácias de manipulação. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v.3, n.2, 2002

MILAN, A.L.K.; MILÃO, D.; SOUTO, A.A.; CORTE, T.W.F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n.4, 2007.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para taratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 181f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto , São Paulo, 2006.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 3, p. 857-863, 2006.

PEREIRA, T.A. **Avaliação da eficácia de um sistema conservante em formulações adicionadas de biomoléculas e estudos de adaptação microbiana**. 2011. 104f Dissertação (Mestrado).Universidade de Brasília. Brasília, 2011.

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

RIBEIRO, A. **Resolução RDC No 33 / ANVISA/MS: uma análise crítica do roteiro de inspeção para farmácias com manipulação** [Dissertação]. Niterói; RJ: Universidade Federal Fluminense; 2003.

ROCHA, P.C. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

SANTOS, A.L.S. *et al.* Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, n.2, p. 209-220, 2006.

SANTOS, F.R.A. **Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações**. 2011. 68f. Monografia (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2011.

- SANTOS, N.P. **A farmacotécnica de incorporação dos parabenos interfere na atividade antimicrobiana?** 2006. 41 f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Farmacêuticas). Centro Universitário Feevale. Novo Hamburgo, 2006.
- SILVA, E. C.; SOARES, I.C. Tecnologia de Emulsões. **Cosmetics & Toiletries**, Edição em português. v. 8, n. 4, 1996.
- SILVA, M.F.; SILVA, L.L. Análise microbiológica de três formulações magistrais. **Cadernos da Escola de Saúde**. Curitiba, v.2, n.6, 2011.
- SINKO, P.J. **Martin: físico-farmácia e ciência farmacêuticas**. 5^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- SIQUEIRA, V.L. **Cuidados microbiológicos em cosméticos e produtos de higiene pessoal**. Conselho Regional de Química, 2005
- SONI, M.G.; BURDOCK, S.L., GREENBERG, N.A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the publish literature. **Food and Chemical Toxicol**, v. 39, p. 513-32, 2000.
- SOUZA, F.L.C. **Desenvolvimento de bases emulsionadas de silicne e água e avaliação comparativa com bases emulsionadas de óleo e água para uso externo de uso mais comum em manipulação**. 2007. 191f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.
- STRANGE P.G. Agonist binding, agonist affinity and agonist efficacy at G protein-coupled receptors. **Brit. J. Pharmac**, v. 153, p. 1353- 1363, 2008.
- SZATKOWSKI, L.T.D. O uso de medicamentos manipulados no município de Toledo. **Infarma**. Paraná, v.16, n.1, 2004.
- TADROS, T. et al. Emulsões: correlação da estabilidade física de longo prazo com medições reológicas de curto prazo. **Cosmetics & Toiletries**, Brasil, v. 19, n. 2, 2007.
- TAVARES, A.T.; PEDRIALI, C.A. Relação do uso de parabenos em cosméticos e a sua ação estrogênica na indução do câncer no tecido mamário. **Revista Multidisciplinar da Saúde** .São Paulo, n. 6 , 2011, p. 61 – 74.

THOMPSON, J.E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos.** Porto Alegre: Artmed, 2006.

ZANIN, S.M.W. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica.** Curitiba, v. 2, n. 2, p. 47-58, 2001.

ZANON, A.B. **Aspectos teóricos e práticos sobre a avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia.** 2010. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

ZAVASCKI, A.P. **Fatores de risco para aquisição de Pseudomonas aeruginosa resistente a impenem em pacientes hospitalizados.** 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Médicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Composição (% p/p) da emulsão Lanette® H/L**FASE A (oleosa)**

Cera Lanette®	15%
BHT.....	0,03%
Nipazol.....	0,04%

Fase B (aquosa)

Propilenoglicol.....	6%
Nipagin.....	0,15%
EDTA.....	0,06%
Água	q.s.p