



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM
FORMULAÇÃO COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE
Schinus terebinthifolius Raddi – ANACARDIACEAE**

ANA LOURDES RODRIGUES DOS SANTOS

NATAL – 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA LOURDES RODRIGUES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE EM
FORMULAÇÃO COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO
DE *Schinus terebinthifolius Raddi* – ANACARDIACEAE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Fernanda Nervo Raffin

NATAL - 2007

S586p

Santos, Ana Lourdes Rodrigues dos.

Avaliação do sistema conservante em formulação com extrato hidroalcóólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi - Anacardiaceae. Ana Lourdes Rodrigues dos Santos. — Natal-RN, 2007.

104f.: il.

Orientador: Prof^o. Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura.

Co-orientador: Prof^a Dr^a Fernanda Nervo Raffin.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde.

1. Anacardiaceae - Dissertação. 2. *Schinus terebinthifolius* Raddi - Dissertação. 3. Ação antimicrobiana - Dissertação. I. Moura, Túlio Flávio Accioly de Lima e. II. Raffin, Fernanda Nervo. III. Título.

UFRN

CDU: 615.014:618.1(043.3)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado saúde para iniciar e terminar mais essa etapa;

Ao Prof^o. Dr. Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura pela orientação neste trabalho, favorecendo para o meu desenvolvimento profissional no NUPLAM;

A todos do NUPLAM, pelo apoio e incentivo.

A Prof^a. Dr^a. Fernanda Nervo Raffin pela co-orientação e colaboração neste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

As minhas amigas que sempre me incentivaram; Ana Josane Fernandes, Lílian Solon, Fátima Duarte, Luciana Vilar, Aline Nara, Edivânia, Bruna;

A Aureliana pelo carinho e paciência com que sempre me tratou e a todos os alunos desse programa;

Ao Edivan, por ser sempre prestativo e amigo

A minha família que sempre me apóia;

Ao Miguel, pelo amor e paciência;

“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte”

Gandhi

RESUMO

Schinus terebinthifolius Raddi, conhecida popularmente como aroeira da praia, é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de lesões e úlceras de pele e mucosas, infecções do sistema respiratório, digestório e geniturinário. Atualmente, um dos maiores problemas enfrentados pela indústria de fitoterápicos com relação à qualidade das matérias-primas de origem vegetal é a contaminação microbiana. Este trabalho objetivou avaliar a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de aroeira, além de testar a eficácia do sistema conservante em formulação de hidrogel à base desse extrato. Os extratos foram obtidos por maceração na proporção de 1:10 de planta/solvente com álcool a 40%. Os métodos microbiológicos utilizados foram o de contagem de microrganismos em placa por “pour plate” e o da pesquisa de patógenos, analisando em triplicata cada uma das amostras. A atividade antimicrobiana dos extratos de aroeira foi avaliada através do método de difusão em ágar, empregando as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. A fórmula com aroeira foi avaliada pelo teste do desafio. Este método consistiu em contaminar artificialmente a amostra com inóculos separados de *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e determinar os sobreviventes pelo método de contagem por “pour plate”, durante os tempos 0, 24h, 48h, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias. Quanto aos resultados, verificou-se que o extrato de aroeira na concentração de 13,5 mg/mL apresentou atividade antimicrobiana para as cepas de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, produzindo halos de inibição, em média com 13 mm de diâmetro. No entanto não apresentou nenhuma atividade antifúngica. Quanto ao teste do desafio, verificou-se que a formulação com gel de aroeira associada aos conservantes metil e propilparabeno apresentou-se eficaz frente às cepas de *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Conforme o critério A da Farmacopéia Européia, adotado neste trabalho, verificou-se que esse produto mostrou-se eficaz para o teste do desafio durante o período dos 28 dias. No entanto, é interessante ampliar esse estudo, a fim de realizar a estabilidade acelerada e o teste de prateleira, para estabelecer a validade dessa formulação.

Palavras chaves: Anacardiaceae, *Schinus terebinthifolius* Raddi, ação antimicrobiana

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius Raddi is used in the treatment of skin and mucosal injuries, infections of respiratory, digestive and genitourinary systems. Currently one of the biggest problems faced for the industry of phytopharmaceuticals with regard to the quality of raw materials is the microbial contamination. The aim this study was to evaluate the antimicrobial action of the hidroalcoholic extract of aroeira, beyond testing the effectiveness of the preservative system in hidrogel to the base of this extract. The extracts were prepared by maceration in the ratio of 1:10 of solvent plant/with alcohol 40%. The methods for microbial count were pour plate and test for specific microorganisms, analyzing in third copy each one of the samples. The antimicrobial activity of aroeira extracts was performed using an agar diffusion method, using strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *T. rubrum*, *M. gypseum*, *A. flavus* and *A. niger*. The formula with aroeira was evaluated by the challenge test. This method consisted of artificial contamination the sample with separate inóculos of *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* aeruginosa and determinations of survivors for the method of counting for “pour plate”, during times 0, 24h, 48h, 7 days, 14 days, 21 days and 28 days. How much to the results, one verified that the extract of aroeira in the 13,5 concentration mg/mL presented antimicrobial activity for cepas of *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, producing inhibition zone, on average with 13 mm of diameter. However it did not present no fungi activity. The formula with aroeira containig both methylparaben and propylparaben showed a good efficacy in challenge test front to strains of *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*. The A criteria of European Pharmacopoeia, adopted in this work, was verified that this product revealed the good preservative efficacy for the challenge test, time interval of the 28 days. However, it is interesting to extend this study, in order to carry through the sped up stability and the test of shelf, to establish the validity of this formularization.

Words keys: Anacardiacea, *Schinus terebinthifolius* Raddi, antimicrobial action

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas, frutos e arbusto de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi	20
Figura 2 – Esquema de diluição de diluição do inóculo	50
Figura 3 – Avaliação da atividade antifúngica do extrato hidroalcolico de <i>S. terebinthifolius</i> contra <i>A. flavus</i> e <i>A. Níger</i>	69
Figura 4 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC x dia de fungos para a fórmula com extrato de <i>S. terebinthifolius</i>	76
Figura 5 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC x dia de bactérias para a fórmula com extrato de <i>S. terebinthifolius</i>	77
Figura 6 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC x dia de fungos para a fórmula sem extrato de <i>S. terebinthifolius</i> e sem conservantes	79
Figura 7 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC x dia de bactérias para a fórmula sem extrato de <i>S. terebinthifolius</i> e sem conservantes	80
Figura 8 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC x dia de fungos para a fórmula sem extrato de <i>S. terebinthifolius</i> e com conservantes	81
Figura 9 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC x dia de bactérias para a fórmula sem extrato de <i>S. terebinthifolius</i> e com conservantes	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diferenças entre os fitoterápicos e os fármacos sintéticos	15
Quadro 2 – Limites microbianos em fitoterápicos segundo a Farmacopéia Européia (2002)	26
Quadro 3 – Critério de aceitação para eficácia de conservantes em preparação tópica	28
Quadro 4 – Neutralizantes usuais de conservantes	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meios seletivos para o teste de fertilidade	41
Tabela 2 – Caracterização dos grupos de estudo para o teste de comprovação da inativação de conservante	47
Tabela 3 – Perda por dessecação para cascas de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	53
Tabela 4 – Teor de extrativos da matéria-prima <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	54
Tabela 5 – Resíduo seco dos extratos hidroalcoólicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	55
Tabela 6 – Contagem microbiana (bacteriana) nas amostras de gel base, extratos com álcool a 40% e 70% e nos géis com os mesmos extratos, expressos em unidades formadoras de colônias	56
Tabela 7 – Contagem microbiana nas amostras de cascas pulverizadas de aroeira não tratadas, autoclavadas e em microondas em potência de 540W por 2 minutos, expressos em unidades formadoras de colônias (UFC/g)	57
Tabela 8 – Resultados da contagem microbiana (bactérias) das cascas não tratadas e tratadas pelo método ANOVA	57
Tabela 9 – Resultados da contagem microbiana (fungos) das cascas não tratadas e tratadas pelo método ANOVA	58
Tabela 10 – Contagem microbiana de extratos hidroalcoólicos a 40%, 50%, 60% e 70%	60
Tabela 11 – Resultados da contagem microbiana (bactérias) dos extratos obtidos de cascas tratadas e não tratadas pelo método ANOVA	61
Tabela 12 – Resultados da contagem microbiana (fungos) dos extratos obtidos de	61

cascas tratadas e não tratadas pelo método ANOVA	
Tabela 13 - Determinação do teor de polifenóis totais, taninos totais e fração não tanante para diferentes extratos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi obtidos de cascas não tratadas	62
Tabela 14 – Resultados para taninos totais obtidos para extratos hidroalcóolicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi das cascas não tratadas pelo método ANOVA	63
Tabela 15 – Determinação do teor de polifenóis totais, taninos totais e fração não tanante para diferentes extratos de cascas tratadas de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	64
Tabela 16 – Resultados para taninos totais obtidos para extratos hidroalcóolicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi das cascas tratadas por autoclave pelo método ANOVA	65
Tabela 17 – Resultados para taninos totais obtidos para extratos hidroalcóolicos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi das cascas não tratadas e tratadas por autoclave pelo método ANOVA	66
Tabela 18 – Média dos halos de inibição (mm) da avaliação da CIM do extrato hidroalcóolico de <i>Schinus terebinthifolius</i> contra bactérias em meio sólido	67
Tabela 19 - Média dos halos de inibição (mm) da avaliação da CIM do extrato hidroalcóolico de <i>Schinus terebinthifolius</i> contra fungos em meio sólido	68
Tabela 20 – Contagens de microrganismos viáveis em UFC/mL dos inóculos nos grupos controle, teste, viabilidade e peptona.	71
Tabela 21 – Número de sobreviventes (UFC/g) de <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> no teste de eficácia de conservantes	73
Tabela 22 – Logaritmo (base10) de <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> no teste de eficácia de conservantes	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Atividade antimicrobiana de plantas	18
2.2. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	19
2.2.1. Aspectos botânicos	20
2.2.2. Propriedades farmacológicas	21
2.3. Outras espécies de aroeira	22
2.4. Composição química	22
2.5. Taninos e polifenóis	23
2.6. Conservação de medicamentos	24
2.7. Teste de eficácia do sistema conservante	26
2.7.1. Comprovação de neutralização	29
2.7. Géis	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Matérias-primas	33
4.2. Cepas padrões	33
4.3. Meios de cultura	34
4.4. Aparelhos e equipamentos	34
4.5. Reagentes e soluções	35
4.6. Métodos	35
4.6.1. Preparação do extrato hidroalcolólico das cascas pulverizadas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	35
4.6.2. Perda por dessecação (Farmacopéia Brasileira IV, 1988)	36
4.6.3. Determinação quantitativa de polifenóis totais e taninos por espectrofotometria através de leitura direta (VASCONCELOS, 2003)	36

4.6.4. Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)	37
4.6.5. Resíduo seco (HARTKE e MUTSCHLER)	38
4.6.5.1. Procedimento	38
4.6.6. Análise microbiológica (Farmacopéia Brasileira, 1988)	38
4.6.6.1. Preparo dos meios de cultura e de soluções	38
4.6.6.2. Contagem microbiana	39
4.6.6.2.1. Preparo de amostras	39
4.6.6.3. Pesquisa de patógenos	39
4.6.6.3.1. Preparação de amostras	39
4.6.6.4. Coloração de Gram para identificação da morfologia de bactérias	40
4.6.6.5. Teste de sensibilidade dos meios de cultura	40
4.6.7. Atividade antimicrobiana dos extratos de aroeira	41
4.6.7.1. Espécies bacteriana e fúngicas	41
4.6.7.2. Meios de cultura	41
4.6.7.3. Suspensão do microrganismos (inóculo)	42
4.6.7.4. Antimicrobianos utilizados	42
4.6.7.5. Difusão em meio sólido	43
4.6.8. Preparo dos géis	43
4.6.8.1. Parâmetros	44
4.6.8.1.1. Físicos	44
4.6.8.1.1.1. Aspecto	44
4.6.8.1.1.2. Cor	45
4.6.8.1.2. Físico – químicos	45
4.6.8.1.2.1. pH	45
4.6.8.1.3. Microbiológico	45
4.6.9. Teste de desafio do sistema conservante (“ Challenge test”)	46
4.6.9.1. Comprovação de inativação de neutralizante	46
4.6.9.1.1. Procedimento	47
4.6.9.1.2. Microrganismos	48
4.6.9.1.2.1. Preparação e padronização do inóculo	48
4.6.9.2. Procedimento do teste de eficácia de conservantes	51

4.6.9.2.1 Técnica	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. Perda por dessecação	53
5.2. Determinação do teor de extrativos	54
5.3. Determinação do resíduo seco	55
5.4. Análise microbiológica	55
5.5. Doseamento de polifenóis e taninos totais	62
5.6. Atividade antimicrobiana dos extratos de aroeira	66
5.7. Comprovação de neutralização	70
5.8. Eficácia do sistema conservante	72
6. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85
Anexo	96

1. INTRODUÇÃO

“O medicamento fitoterápico é obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3”(BRASIL, 2004a).

Os constituintes químicos responsáveis na maioria das vezes pela ação farmacológica não são conhecidos e acredita-se que a ação farmacológica desses produtos envolva a interação de inúmeras moléculas presentes no extrato (CALIXTO, 2001).

A qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico. No entanto essa qualidade não garante por si mesma a eficácia, segurança e a qualidade do produto final. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos e dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. Os ensaios de qualidade de matérias-primas vegetais relacionam-se com análise sensorial ou organoléptica, verificação da pureza com a pesquisa de contaminação microbiana, teor de umidade, teor de substâncias ativas presentes na planta e outros (FARIAS, 1999).

A planta medicinal utilizada em medicamentos é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo; nele introduzido com finalidades terapêuticas. Isto significa que pode apresentar substâncias potencialmente tóxicas. O uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e sua preconização ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso, devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (LAPA; SOUCCAR; LIMA-LANDMAN; GODINHO; NOGUEIRA, 1999).

Os produtos farmacêuticos para tornarem-se estáveis dependem de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas, químicas, de substâncias ativas, excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Há diferenças marcantes entre os fitoterápicos e os fármacos sintéticos que estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Diferenças entre os fitoterápicos e os fármacos sintéticos

Pontos de diferenças	Fitoterápicos	Sintéticos
Princípio ativo	Freqüentemente desconhecido	Sempre conhecido
Metodologia de controle de qualidade	Mais complexa	Menos complexa
Ensaio clínico e toxicológico	Raros	Freqüentes
Custo	Menor	Maior

Calixto (2000).

Um dos principais constituintes da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi são os taninos. Os taninos apresentam várias atividades biológicas como antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica, além de anticarcinogênica e antimutagênica (SIMÕES *et al.*, 1999). Como estão em grande quantidade nesta droga vegetal são considerados como marcadores químicos no controle de qualidade desta espécie (BRASIL, 1994).

Os constituintes das plantas medicinais variam consideravelmente, dependendo do estado da planta, temperatura, exposição à luz, teor de umidade, nutrientes do solo, período e método de coleta, além de secagem, acondicionamento e transporte (CALIXTO, 2000).

Conforme os estudos de Dall'Ágnol *et al.* (1998a) onde a qualidade microbiológica de plantas medicinais foi avaliada, houve contaminação por fungos e por *Escherichia coli*, demonstrando a necessidade de se estabelecer normas de boas práticas de cultivo, coleta, além de certificação de fornecedores.

Os limites de contaminação microbiana em plantas medicinais dependem do tipo de material vegetal e de seu uso, sendo assim, quando a planta apresenta-se em seu estado “cru”, os limites são de no máximo 10^4 UFC/g para *Escherichia coli* e para esporos de fungos filamentosos no máximo de 10^5 UFC/g. Já os limites microbianos para plantas medicinais utilizadas para uso tópico são de no máximo 10^7 UFC/g para bactérias aeróbicas e para leveduras e fungos de no máximo 10^4 UFC/g. Para *Escherichia coli* o limite máximo é de 10^2 UFC/g, não sendo admitida a presença de *Salmonella sp.* (WHO, 1998; BRASIL, 1999).

O estudo da contaminação em medicamentos não estéreis e cosméticos é realizado desde a década de 60 até os dias atuais, devendo-se principalmente às normas de boas práticas de fabricação e armazenamento. Além da qualidade microbiana adequada para comercialização, o medicamento ou o cosmético deve ser seguro ao consumidor, garantindo a manutenção dessa qualidade durante o uso, conforme a eficácia do conservante e outros adjuvantes adequados (OHARA; SAITO, 1984b; OHARA; FISCHER; SAITO 1991; SOUZA; OHARA; SAITO 1994b)

Há muitos fatores relacionados às formulações, tais como, o pH do produto, a adsorção pelo material de acondicionamento, o coeficiente de partição, a presença de tensoativos e agentes umectantes e a temperatura de fabricação e estocagem que podem afetar o comportamento de conservação dos produtos (SOUZA; OHARA; SAITO, 1994a).

Em 1999, o Ministério da Saúde instituiu a Resolução 481 de 23/09/99, na qual relatava os limites máximos de carga microbiana em produtos cosméticos, por grama ou mililitro de até 100.000 microorganismos viáveis, 10.000 leveduras ou fungos filamentosos e 10.000 enterobactérias. Os produtos não devem conter *Salmonella sp.*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e fungos do gênero *Aspergillus* (BRASIL, 1999).

Além dessa portaria, há a resolução RDC 48 de 16/03/04, que visa atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. Esse regulamento técnico é validado por levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3 (BRASIL, 2004a).

Além dessas normas, a ANVISA aprovou a resolução 90 de 16/03/04, cuja importância relaciona-se com a avaliação toxicológica preconizando testes para medicamentos fitoterápicos de uso tópico (BRASIL, 2004b).

Assim como Nostro *et al.* (2002) relataram que o óleo essencial de *Calamintha officinalis* apresenta ação antimicrobiana e pode ser utilizado como conservante em produtos cosméticos, muitas outras plantas podem ser utilizadas com esses mesmos propósitos.

A partir da leitura dos relatos das ações farmacológicas da *S. terebinthifolius*, houve o interesse em avaliar a eficácia do sistema conservante na formulação de hidrogel a base de extrato líquido de aroeira, cujo objetivo permitiu avaliar microbiologicamente desde as cascas pulverizadas que são matéria-prima para preparação dos extratos hidroalcoólicos, além de

verificar quais os métodos de esterilização seriam mais adequados e que não alterassem os marcadores químicos desta droga vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As diversas enfermidades têm sido tratadas com chás, infuso, decocto, macerado, sucos, tinturas, banhos, bem como, cataplasmas e unguentos, preparados a partir de partes de plantas (CALIXTO, 2001).

A pesquisa de substâncias antimicrobianas nos vegetais desenvolveu-se mais após a descoberta da penicilina. Os alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e óleos essenciais são compostos originários de várias vias metabólicas. Eles têm importância nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores. Essas substâncias podem apresentar também ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, *Mycobacterium*, leveduras e fungos filamentosos (CALIXTO, 2001).

As propriedades bacteriostáticas, bactericidas, fungistáticas e fungicidas a partir de produtos vegetais têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo mundo. Geralmente, são estudadas, avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos “in vitro” - testes de susceptibilidade ou sensibilidade. Os microrganismos padrão podem ser da American Type Culture Collection - ATCC ou Centralbureau voor Schimmelcultures-CBS ou microrganismos isolados de materiais biológicos. Nos testes de atividade antimicrobiana estão incluídas bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis* ou *M. phlei*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e fungos filamentosos (CALIXTO, 2001).

A ação antisséptica de plantas aromáticas e medicinais e seus extratos tem sido conhecida desde a antiguidade, enquanto a caracterização dessas ações em laboratório ocorreu

a partir do início do século XX. Os óleos essenciais são geralmente isolados de partes aéreas por métodos de destilação, usualmente por arraste a vapor ou hidrodestilação e são constituídos por uma mistura de terpenóides, monoterpenos e sesquiterpenos, embora os diterpenos possam também estar presentes e uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, álcoois, aldeídos, éster acíclico, cumarinas (MANOU *et al.*, 1998; DORMAN; DEANS, 2000).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos pode ser utilizada em muitas aplicações, incluindo como tempero e conservante de alimentos, em indústria farmacêutica e medicina alternativa (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; NOSTRO *et al.*, 2002).

Os extratos fluidos das folhas de *Acacia aroma* e as formulações em hidrogel mostraram eficácia antimicrobiana contra as bactérias Gram (+) e Gram (-), principalmente devido à presença de compostos flavonoídicos (ARIAS , 2004a, b).

Segundo Remili, Boussard e Devleeschouwer (1994), os extratos de plantas secos por aspersão apresentaram menor grau de contaminação que o pó dessas plantas.

De acordo com os estudos de Maccioni *et al.* (2002), a grande capacidade dos óleos essenciais testados nas formulações de hidrogéis de inibir o crescimento de bactérias Gram (+) e Gram (-) pode também ser atribuída à capacidade conservante de alguns componentes da estrutura do gel, especialmente o carbopol 940, o qual reforça a atividade dos óleos essenciais nessas formulações.

Martinez *et al.* (1996), testaram a atividade antimicrobiana de 12 espécies de plantas cubanas e a que apresentou melhor atividade foi *S. terebinthifolius*, embora nenhuma tenha inibido leveduras.

Em estudo feito por Amorim e Santos (2003), relataram que 84% das pacientes que utilizaram um gel com aroeira e 47% das que utilizaram o placebo não apresentavam mais vaginose bacteriana.

2.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Há várias espécies de aroeira, todas pertencentes à mesma família Anacardiaceae. Aroeira-mansa, aroeira-vermelha, aroeira-precoce, aroeira pimenteira e aroeira-do-campo,

constituem sinônimos da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi. Os nomes populares de *Astronium fraxinifolium* são aroeira-do-campo e aroeira-vermelha. Já os nomes populares de *Lithraea molleoides* são aroeira-branca, aroeira-brava, aroeirinha, aroeira-do-brejo e aroeira-da-capoeira (ÁRVORES BRASILEIRAS, 2005).

Conforme os estudos de Brandão *et al.* (2006), a espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi possui nome popular de aroeira vermelha e as cascas são as partes usuais.

Outro gênero que apresenta muitos nomes populares é a *Myracrodruon urundeuva*, sendo denominada de aroeira-do-sertão, aroeira-preta ou urundeíba (LIMA *et al.*, 2004).

Schinus molle tem nomes populares de aroeira-falsa, aroeira-salsa, aroeira-folha-de-salsa e aroeira-mole (ÁRVORES BRASILEIRAS, 2005).

A espécie *S. terebinthifolius* Raddi é uma árvore nativa do Brasil, Paraguai e Argentina e foi introduzida nos Estados Unidos no início do século XX, como planta ornamental. Segundo os estudos de Medal *et al.* (1999), a espécie *S. terebinthifolius* é uma planta agressiva que ameaça a biodiversidade da Flórida.

2.2.1 Aspectos botânicos

A espécie *S. terebinthifolius* pode ser encontrada na forma de arbusto ou árvore, com altura que variam de 3 a 10 m. A copa é ovóide no formato e com ramos desenvolvidos.



Figura 1- Folhas, frutos e arbusto de *S. terebinthifolius* Raddi

A casca apresenta-se em pedaços curvos ou enrolados em tubo, de comprimento variável, com 1 a 5 mm de espessura. Sua superfície externa é de cor pardo-acinzentada, profundamente fendida no sentido longitudinal e um tanto no sentido transversal. É muito rugosa, apresenta-se irregularmente com manchas mais claras e apresenta, de espaço em espaço, placas de líquens. A face interna é estriada longitudinalmente e de cor pardo-avermelhada. A casca é impregnada de matéria resinosa, que aparece frequentemente em sua superfície (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

As folhas apresentam-se compostas, imparipenadas, em geral com 5 a 7 folíolos alternados, oblongos ou obtusos e crenados nas margens (SANTOS, 1988).

Os frutos são cheios de grãos do tamanho de uma pimenta, a princípio verdes, depois vermelhos. A coloração vermelha é apenas no revestimento externo dos frutos, formando uma carapaça, que se abre espontaneamente e liberando os grãos (PISO, 1957).

2.2.2 Propriedades farmacológicas

A espécie *S. terebinthifolius* é utilizada no tratamento de lesões e úlceras de pele e mucosas, além de infecções do sistema respiratório, sistema digestivo e geniturinário (BACCHI, E.M., 1986).

Os estudos de Lucena *et al.* (2006); Santos *et al.* (2006) e Castelo Branco Neto *et al.* (2006), relataram que *S. terebinthifolius* apresenta ação cicatrizante, respectivamente, em feridas cirúrgicas de bexiga, estômago e de pele de ratos.

A aroeira tem uso popular por sua ação adstringente, tônica e antinevrálgica, além de possuir atividade inibidora de enzimas, sendo utilizada no tratamento de hiperuricemia, além de atividade antiúlcera (PORMIGONI; CARLINI, 1988; MAZZA *et al.* 1996).

O decocto das cascas de aroeira apresentou atividade citotóxica e mutagênica nos testes bacterianos realizados, sugerindo que essa citotoxicidade apresentada seja determinada por lesões letais sobre as bactérias, o que representa um benefício na aplicação dessa forma farmacêutica como cicatrizante de feridas (DE CARVALHO *et al.*, 2000, 2003).

Schmourlo *et al.* (2005) relataram a atividade antifúngica dos extratos aquosos de *Schinus terebinthifolius* e *Schinus molle* sobre a espécie de levedura *Candida albicans*.

Martinez *et al.* (1996) relataram ação antimicrobiana de algumas espécies de plantas cubanas e a que apresentou melhor atividade foi a *Schinus terebinthifolius* Raddi, sendo ativa contra *S. aureus*.

Os extratos alcoólico e aquoso de *Schinus terebinthifolius* incorporados em géis, apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas padrões de *S.aureus* ATCC 6538, ATCC 9144 (LEAL *et al.*, 1996).

Conforme o artigo de Melo Jr. *et al.* (2002), o extrato de *S. terebinthifolius* é eficaz como agente antimicrobiano contra bactérias Gram (+) e Gram (-) e cicatrizante em alveolites induzidas em ratos.

Os extratos alcoólico e aquoso de *Schinus terebinthifolius* Raddi não apresentam efeitos genotóxicos (RUIZ *et al.*, 1996).

2.3 Outras espécies de aroeira

Belém, Araújo e Lima (1996) verificaram que os extratos e óleos essenciais de *Schinus molle* L. (aroeira) não apresentam atividade antifúngica.

Os óleos essenciais das espécies de *S. longifolia* são constituídos dos seguintes compostos: alfa-pineno, beta-pineno, alfa-felandreno, mas, os da espécie de *S. fasciculata* apresentam o limoneno, beta-felandreno e alfa-felandreno (MURRAY *et al.*, 2005).

Os resultados dos estudos de Fontenele *et al.* (1994) relatam que o extrato hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* pode apresentar efeito inibitório de agregação plaquetária.

Conforme os estudos preliminares de Moura *et al.* (1994), a espécie *Myracrodruon urundeuva* (aroeira do sertão) apresentou efeitos antiinflamatórios na cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida. Os extratos hidroalcoólicos da entrecasca desta espécie sofrem alterações químicas e físicas, conforme o tempo e o tipo de acondicionamento, promovendo modificações nos efeitos farmacológicos (BANDEIRA *et al.*, 1994).

A casca da *Astronium urundeuva* é um produto utilizado na medicina popular, na forma de infusão ou decocto para o controle da diarreia e outras desordens gastrintestinais, além de não apresentar efeitos tóxicos (RAO; VIANA; GADELHA, 1988; CHAVES *et al.*, 1994; AGRA, 1996).

Os extratos de *Astronium urundeuva* possuem propriedades anti-histamínicas e antibradicinina (ALMEIDA, 1993; MENEZES *et al.*, 1994).

2.4. Composição química

Conforme os estudos de Santos, Alves e Souza (2000), os principais componentes voláteis das folhas da espécie *S. terebinthifolius* são o alfa-pineno correspondendo a 18,65%, assim como nos frutos cujo componente principal é o beta-eudesmol, correspondendo a 28,01%. Os estudos de Medeiros (1998) relataram que essa espécie de aroeira apresenta maior teor de taninos quando comparado com *Astronium urundeuva* Engl. A casca da planta *S. terebinthifolius* é muito rica em tanino e outras substâncias ativas, duas chalconas diméricas, as urundeuvinas A e B, de forte ação antiinflamatória (MATOS, 1994).

As atividades farmacológicas dos taninos podem ser atribuídas a três principais características que são a complexação com os íons metálicos; atividade antioxidante e seqüestraste de radicais livres e a capacidade de complexar outras moléculas incluindo as macromoléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos (SCALBERT, 1991).

2.5. Taninos e polifenóis

Os taninos são substâncias orgânicas de origem natural, amorfas, formadas por substâncias fenólicas, com massa molecular de 500 a 3000D. Classificam-se em taninos hidrolisáveis (galotaninos e os elargitaninos) e taninos condensados (catequinas). Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, cujas hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico. Os taninos condensados são mais complexos que os hidrolisados. Após a hidrólise ácida, básica ou enzimática dos taninos hidrolisáveis, há a liberação de ácido gálico e ou elágico e glicose (VITAL *et al.*, 2004).

Há várias pesquisas sobre atividade biológica dos taninos que evidenciaram importante ação antimicrobiana, atividade anticarcinogênica, além de antiinflamatórias e cicatrizantes (MONTEIRO *et al.*, 2005).

2.6. Conservação de medicamentos

Conservantes são substâncias empregadas para manter a integridade do produto farmacêutico durante o período de prateleira, bem como na fase de sua utilização pelo consumidor, além de promover a proteção do usuário contra a infecção acidental (SOUZA; OHARA; SAITO, 1994b).

Quando as preparações farmacêuticas não possuem elas próprias propriedades conservantes adequadas, podem adicionar-se-lhes agentes de conservação antimicrobianos, particularmente em preparações aquosas, com o fim de evitar ou limitar a proliferação microbiana que pode ocorrer nas condições normais de conservação e de emprego e assim apresentar um risco de infecção para o doente e deterioração da preparação, nomeadamente nos recipientes multidose. Os agentes de conservação antimicrobianos não são utilizados para substituir o cumprimento das boas práticas de fabricação. (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002, p. 470).

Conservantes antimicrobianos são incluídos em preparações farmacêuticas para matar ou inibir o crescimento de microrganismos durante a produção ou o uso dos mesmos. São utilizados em preparações estéreis e não estéreis, além de cosméticos e alimentos. Eles não devem ser utilizados indiscriminadamente (MARTINDALE, 1993).

As normas nacionais só estabelecem os limites permitidos de conservantes e não exigem declarar a concentração dos mesmos no rótulo do produto. Considera-se importante estabelecer um controle dos conservantes incorporados quanto a sua concentração e relacioná-los com a eficácia dos mesmos. A análise microbiológica é imprescindível como forma de se garantir a qualidade dos produtos de amplo uso no cuidado da pele (DE CURTIS; FRANCESCHI; DE CASTRO, 1992; GUIMARÃES *et al.*, 1982; OHARA; SAITO, 1984a).

Conforme o estudo de Marple, Roland e Benninger (2004), as formulações com cloreto de benzalcônio como conservantes eram seguras e não exacerbavam as rinites medicamentosas.

Segundo o trabalho de Seo *et al.* (2002), sobre o desenvolvimento de um sistema conservante, a mistura de quitosana e extrato de *Inula helenium L.* apresentou excelente efeito conservante em formulações cosméticas e transdérmicas.

O estudo da contaminação em medicamentos não estéreis e cosméticos é realizado desde a década de 60 até os dias atuais, devendo-se principalmente às normas de boas práticas

de fabricação e armazenamento. Além da qualidade microbiana adequada para comercialização, o medicamento ou o cosmético deve ser seguro ao consumidor, garantindo a manutenção dessa qualidade durante o uso, conforme a eficácia do conservante e outros adjuvantes adequados (OHARA; SAITO, 1984b; OHARA; FISCHER; SAITO 1991; SOUZA; OHARA; SAITO 1994b).

Todo sistema conservante necessita ser validado pelo teste de eficácia da atividade antimicrobiana, que consiste em contaminação artificial da preparação por microrganismos selecionados e monitoramento dos seus tempos de redução (FAVET; CHAPPUIS; DOELKER, 2001; ORTH; ECK, 2005).

De acordo com o artigo de Chapman, Diehl e Fearnside (1998), a tolerância a conservantes é definida como uma situação na qual o sistema conservante não controla por muito tempo o crescimento microbiano na formulação.

Conforme o estudo realizado por Behravan, Bazzaz e Malaekheh (2005), em levantamento de contaminação bacteriológica em cremes cosméticos no Irã, a incidência de contaminação por bactérias Gram (+) como *Staphylococcus aureus* foi maior em cosméticos em uso do que em cosméticos sem uso.

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação em seu recipiente específico ou sistema fechado de permanecer, no prazo de validade, dentro das especificações física, química, microbiológica, terapêutica e toxicológica (VADAS, 1995; LUSINA *et al.*, 2005).

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos contribui para auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade do produto (ANVISA, 2004).

Os fatores extrínsecos referem-se ao tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento e vibração. Além desses, há a contaminação por microrganismos. Os produtos que apresentam água em sua formulação, como emulsões, géis, suspensões ou soluções são os mais susceptíveis à contaminação microbiana. A utilização de sistemas conservantes adequados e validados como o teste do desafio do sistema conservante

- "Challenge test", assim como o cumprimento das boas práticas de fabricação (BPF) é necessário para a conservação adequada das formulações (ANVISA, 2004).

A partir do estudo de Bagel e Widemann (2004), em que observaram a estabilidade de soluções nasais sem conservantes através dos testes de monitoramento microbiológico; foi verificado que esta forma farmacêutica quando armazenada em recipiente multi-dose apropriado é estável por até 6 semanas depois de utilizado pela primeira vez.

Os conservantes em formulações farmacêuticas ou cosméticas além de atender a sua principal função que é inibir ou matar microrganismos, deve ser hipoalergênico. Há relatos na literatura de casos de alergia a géis de ultrassonografia que contêm o propilenoglicol, que tem características também de conservante. (HORIGUCHI *et al.*, 2005).

A qualidade do produto fitoterápico deve ser o resultado da somatória de esforços concentrados para melhoria da qualidade do processo produtivo como um todo, abrangendo desde a obtenção de espécie vegetal idônea até a manutenção da qualidade do produto final representado pelo produto destinado a infuso ou transformada em pó, comprimido e cápsula (FISCHER *et al.*, 1996).

Na fabricação, acondicionamento, estocagem e distribuição de preparações farmacêuticas deve ser garantida a qualidade microbiológica. As preparações farmacêuticas fitoterápicas devem estar em conformidade com os critérios do quadro 2.

Quadro 2 – Limites microbianos em fitoterápicos segundo a Farmacopéia Européia (2002)

Microrganismos	Fitoterápicos	Fitoterápicos
	com água quente	sem água quente
Bactérias aeróbias viáveis por g ou mL	10 ⁷ UFC	10 ⁵ UFC
Fungos	10 ⁵ UFC	10 ⁴ UFC
<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella sp</i> e <i>S. aureus</i>	Ausência	Ausência

2.7. Teste de eficácia do sistema conservante

O teste de eficácia do sistema conservante do tipo desafio consiste na contaminação proposital do produto com microrganismos específicos, além do monitoramento da amostra em intervalos de tempo definidos, com o objetivo de avaliar a eficácia do sistema conservante necessário à proteção do produto (PINTO, 2003; ANVISA, 2004).

É um procedimento no qual um produto é desafiado pela exposição a tipos específicos de bactérias e fungos para determinar se a conservação está adequada (RUSSEL, 2003; CRÉMIEUX; CUPFERMAN; LENS, 2005).

O melhor método para avaliar o sistema conservante em formulação de protetores solares é o método do desafio (BOU-CHACRA; PINTO; OHARA, 2003).

A eficácia antimicrobiana deve ser demonstrada para formulações farmacêuticas tópicas em embalagens multi-dose e orais, além de formulações oftálmicas, otológicas, nasais e de líquidos para diálise (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2002; TIRUMALAI, 2005).

A eficácia de conservantes antimicrobianos pode ser melhorada ou diminuída através dos constituintes ativos da preparação, pela formulação na qual é incorporada ou pelo recipiente em que é acondicionado. A atividade antimicrobiana da preparação no recipiente final é investigada excessivamente durante o período de validação para assegurar que tal atividade não tenha sido deteriorada pela estocagem. Durante o desenvolvimento de preparações farmacêuticas, deve ser demonstrado que a atividade antimicrobiana das preparações são destituídas de contaminação ou proliferação microbiana, durante a estocagem e uso da preparação. A eficácia da atividade antimicrobiana pode ser demonstrada através da contaminação com microorganismos padrões da formulação em seu recipiente final, a uma determinada temperatura e tempo. 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 (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2002).

Segundo a Farmacopéia Européia, 2002, os microorganismos padrões a serem utilizados são os seguintes:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82118.

Staphylococcus aureus ATCC 6538; NCTC 10788; NCIMB 9518; CIP 483.

Candida albicans ATCC10231; NCPF 3179; IP 4872.

Aspergillus niger ATCC 16404; IMI 149007; IP 143183.

Os critérios de aceitação do teste de eficácia do sistema conservante para preparações tópicas, segundo a Farmacopéia Européia, 2002, encontram-se no quadro 3. Esse critério é mostrado em termos de redução do número de microrganismos viáveis contra o valor obtido do inóculo.

Quadro 3 – Critério de aceitação para eficácia de conservantes em preparação tópica

		Redução de log			
		2 dias	7 dias	14 dias	28 dias
Bactérias	A	2	3	-	Nenhum aumento
	B	-	-	3	Nenhum aumento
Fungos	A	-	-	2	Nenhum aumento
	B	-	-	1	Nenhum aumento

Farmacopéia Européia, 2002

O critério A, expressa a eficácia recomendada a ser atingida. Em casos justificados, quando o critério A não puder ser atendido, por exemplo, por razões de aumento de risco de reações adversas, o critério B deve ser satisfeito (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2002).

No estudo de eficácia do sistema conservante de formulações é necessário considerar não somente a eficácia contra microrganismos, mas também, a compatibilidade dos componentes dos conservantes com outros materiais da formulação, além do seu antagonismo ou sinergismo, do processo de produção do produto e dos custos associados (ORUS; LEARANOZ, 2005).

Assim como no artigo de Hofstra, Van der Vossen e Van der Plas (1994), discutiu-se a necessidade de se implantar o conceito de análise do controle do ponto de risco crítico no monitoramento microbiológico para segurança alimentar das matérias-primas utilizadas nos processos de tecnologia de alimentos, da mesma forma deve se estender para o controle de medicamentos não estéreis também.

O teste do desafio pode ser executado não somente em produtos cosméticos intactos, mas também pode ser utilizado para avaliar a eficácia de proteção durante seu uso (CAMPANA; SCESA; PATRONE; VITTORIA; BAFFONE, 2006).

2.7.1 Comprovação da inativação

Conforme a USP 29 (2006), entende-se que se um produto possui propriedades antimicrobianas, quando há presença de conservante específico ou quando a própria formulação possui atividade antimicrobiana. Dessa forma, para se determinar o limite microbiano de um produto, deverá primeiramente neutralizar essa atividade antimicrobiana, a fim de se recuperar microrganismos viáveis. Esta neutralização pode ser conseguida pelo uso de neutralizadores específicos, pelo método de diluição ou pela combinação desses dois métodos. Alguns fatores podem influenciar a neutralização do conservante, tais como: a natureza dos microrganismos usados como organismos desafiadores; as condições específicas do teste, além das condições de recuperação dos microrganismos. Esses fatores também afetam os métodos de recuperação para produtos aquosos e não aquosos, sem levar em conta suas propriedades antimicrobianas. Assim, esse método deverá ser validado, tendo esses fatores em mente.

Cada microrganismo que for usado no teste deverá ser incluído na validação.

A preparação do inóculo de microrganismos desafiadores também afeta o teste de produtos que têm propriedades antimicrobianas. O crescimento e preparação dos microrganismos desafiadores determinam o estado fisiológico da célula. Este estado tem influência direta nos resultados de alguns testes de eficácia antimicrobiana. As condições de preparação de organismos e estocagem devem ser padronizadas para avaliação da neutralização e deve refletir as condições para o teste antimicrobiano.

As condições específicas do teste incluem o uso de tampão, água, condições de iluminação e temperatura, as quais devem ser reproduzidas no estudo de validação. Todas as condições também devem ser padronizadas e executadas no estudo de validação exatamente como são executadas no teste.

As condições de recuperação microbiana estão entre as mais cruciais na estimativa exata do número de microorganismos presentes na solução teste. A primeira consideração é o meio a ser usado como suporte de crescimento de sobreviventes. A segunda consideração são as condições de incubação. As condições ideais para crescimento devem estar presentes para assegurar completo crescimento e reprodutibilidade dos resultados.

Há vários métodos de neutralização das propriedades antimicrobianas, como diluição, filtração e lavagem, mas, a inibição química é o método preferível para teste de eficácia de antimicrobianos (USP 29, 2006).

O quadro 4 mostra os neutralizantes de conservantes mais usuais.

Quadro 4 – Neutralizantes usuais de conservantes

Neutralizante	Classe de biocidas	Potencial ação de biocida
Bissulfato	Glutaraldeído, mercuriais	Bactérias não esporuladas
Diluição	Fenólicos, álcool, aldeídos, sorbato	-
Glicina	Aldeído	Células em crescimento
Lecitina	QACS(compostos amônio quaternário); Parabenos, biguanidas	de Bactéria
Íons Mg^{+2} ou Ca^{+2}	EDTA	-
Polissorbato	QACS, iodo e parabenos	-
Tioglicolato	Mercuriais	Estafilococos e esporos
Tiosulfato	Mercuriais, Halogenados e aldeídos	Estafilococos

Handbook of excipients (1994).

2.8. Géis

As formulações farmacêuticas devem ser produzidas de acordo com as Boas Práticas de Fabricação e um dos critérios importantíssimos é a qualidade da água utilizada (SANTOS; CHEN, 1996). As formulações em géis podem ser lipofílicas ou oleogélicas cujas bases são

usualmente parafina líquida com polietileno gelificados com sabões de sílica ou alumínio. Além dessas há os géis hidrófilicos ou hidrogéis cujas bases consistem de água, glicerol ou propilenoglicol, gelificados com agentes gelificantes tais como derivados de celulose, silicatos de magnésio- alumínio ou amido (FARMACOPÉIA EUROPEIA, 2002).

A formulação utilizada foi a seguinte:

Plurigel.....2,0 %

Propilenoglicol.....5,0 %

Propilparabeno.....0,6 %

Metilparabeno.....0,3 %

NaOH solução 0,5% q.s.p até pH 6,0

Resíduo seco de *S.chinus terebinthifolis* Raddi.....31% (extrato concentrado em evaporador rotativo). Foi utilizado 16mL.

Plurigel é o polímero de acrilato, não-iônico, o qual se obtém um gel. Propilenoglicol tem sido amplamente utilizado como solvente e conservante em uma variedade de formulações parenterais e não parenterais (HANDBOOK OF EXCIPIENTS, 1994; HORIGUCHI, 2005).

A solução de hidróxido de sódio a 5% é utilizado para ajustar o pH da forma farmacêutica até a neutralidade.

O metilparabeno e propilparabeno apresentam função álcool em suas fórmulas estruturais. Eles agem sobre os constituintes citoplasmáticos como ribose. Foram introduzidos em formulações cosméticas, alimentos e em medicamentos tópicos e sistêmicos nos anos de 1930. Eles são mais efetivos contra fungos do que bactérias. E a atividade antibacteriana é maior contra Gram (+).

O metilparabeno, conhecido por nipagin, é muito utilizado em associação com o propilparabeno e apresenta propriedades semelhantes.

O propilparabeno exibe ação antimicrobiana em pH na faixa de 4 a 8. A sua atividade diminui com o aumento do pH, devido a formação do íon fenolato. São mais ativos contra fungos e leveduras do que bactérias.

Como as concentrações inibitórias do propilparabeno e de metilparabeno para *P. aeruginosa* ATCC 9027 encontram-se na faixa 4000µg/mL e para *S. aureus* ATCC 6538 é de 2000µg/mL e desta forma, foi utilizado a concentração de 0,5% nas formulações teste (HANDBOOK OF EXCIPIENTS, 1994).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do sistema conservante na formulação de hidrogel a base de extrato líquido de *S. terebinthifolius*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar microbiologicamente os extratos de *S. terebinthifolius* Raddi e suas matérias-primas;
- Identificar a concentração do extrato hidroalcoólico de aroeira que se vai trabalhar em função do melhor teor de polifenóis e ação antimicrobiana que expressam;
- Realizar a análise microbiológica da fórmula adotada como padrão e nas variações com os respectivos conservantes, verificando o limite microbiano de bactérias viáveis de até 100UFC/g ou mL, além de ausência de patógenos como *E. coli*, *Salmonella sp*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.
- Avaliar a influência do processo de autoclavação e microondas na qualidade microbiológica das cascas pulverizadas de aroeira, além de verificar se esses processos alteram o teor de polifenóis e taninos totais;
 - Avaliar o teor de umidade do material vegetal;
 - Avaliar o teor de extrativos e resíduo seco dos extratos de aroeira;
 - Avaliar a atividade antimicrobiana através concentração inibitória mínima do extrato selecionado contra espécies bacterianas e fúngicas;
- Preparar o gel de plurigel e incorporar o extrato de aroeira;
- Comprovar o método de neutralização, utilizando as cepas bacteriana e fúngicas;

- Contaminar artificialmente a amostra de gel com aroeira com inóculo padrão de 10⁶ UFC/mL dos inóculos bacterianos e fúngicos e monitorar o crescimento microbiano nos tempos zero, 24h, 48h, 7 dias, 14 dias e 21 dias;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

- Material vegetal: Cascas secas da *Schinus terebinthifolius* Raddi, coletadas na região da Mata Atlântica do Estado da Paraíba. A excicata desta, encontra-se depositada no Herbário Parque das Dunas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Agente complexante: Caseína Bovina (Sigma)
- Polímero de acrilato – Plurigel (Galena)
- Conservantes: Propilparabeno e Metilparabeno (Ueno Fine Chemicals Indústria Ltda)

4.2 Cepas padrões

Procedência: Fundação Oswaldo Cruz

Pseudomonas aeruginosa INCQS 00230 lote: 1205230;

Candida albicans INCQS 40006 lote: 030640006;

Aspergillus niger INCQS 40036 lote: 100440036;

Procedência: OXOID

Staphylococcus aureus ATCC 6538 lote: 609231

Escherichia coli ATCC 8738 lote: 699130

S. aureus ATCC 13150

P. aeruginosa ATCC 27853

E. coli ATCC 8739

B. subtilis ATCC 6633

C. albicans ATCC 90028

M. gypseum ATCC 131859

Procedência: Amostras clínicas

C. tropicalis LM 10

C. krusei LM 08

C. guilliermondii LM 12

T. rubrum LM 640

A. flavus FCF 126

A. niger LM 05

4.3 Meios de cultura

- Ágar caseína soja (Oxoid)
- Ágar Sabouraud-dextrose (Becton Dickinson)
- Ágar Vogel Johnson (Acumedia)
- Ágar cetrimida (Merck)
- Ágar Mac Conkey (Biobras)
- Caldo verde brilhante 2% (Acumedia)
- Caldo caseína soja (Acumedia)
- Caldo lactose (Acumedia)
- Ágar Mueller Hinton (Merck)

4.4 Aparelhos e equipamentos

- Agitador magnético FISATON, modelo 752
- Balança analítica GEHAKA, modelo BG 2000
- Autoclave FABBE, modelo 106 nº 4221
- Fluxo laminar TROX, modelo FLV classe II A
- Bico de Bunsen
- Alça bacteriológica com cabo de aço

- Erlenmeyer de plástico capacidade 250 mL
- Tubo com tampa rosqueável 21x 2 cm
- Tubo com tampa rosqueável 15x 1,5 cm
- Placa de petri 60 x 15 mm
- Pipeta graduada 10mL
- Chapa aquecedora QUIMIS, modelo Q 310-22B
- Microondas INVERTER PANASONIC, modelo N-N-G62BK, potência 900W/1450W
- Microscópio óptico QUIMIS, modelo Q 719K-AC
- Lâmina
- Lamínula
- pH metro QUIMIS, modelo SCO9, código S3OEOF
- Incubadora bacteriológica FANEM, modelo 002003
- Incubadora para fungos QUIMIS, Q 316M4
- Contador de colônias PHOENIX, modelo CP600 plus
- Aspirador de pipetas BRAND, modelo 26152
- Evaporador rotativo, TECNAL, modelo TE-211

4.5 Reagentes e soluções

- Álcool etílico PA (Dinâmica)
- Fosfato de potássio monobásico (CRQ – Cromato Produtos Químicos Ltda)
- Hidróxido de sódio (Dinâmica)
- Solução salina estéril
- Corantes de Gram: cristal violeta, lugol e fucsina (Nuclear)

4.6 MÉTODOS

4.6.1 Preparação do extrato hidroalcoólico das cascas pulverizadas de *Schinus terebinthifolius*

As cascas utilizadas foram previamente secas em estufa de ar circulante a 45°C, durante 5 dias, e pulverizadas em moinho de facas; sendo esterilizadas em autoclave a 121°C

durante 15 minutos e por microondas em potência de 450W e 540W por 1 a 2 minutos. Os macerados foram preparados numa proporção droga/solução alcoólica 1:10(m/v) a temperatura ambiente. O material vegetal ficou em maceração por cinco dias com agitação esporádica. Foram preparados os extratos hidroalcoólicos em concentrações de etanol decrescentes a 70%, 60%, 50% e 40%.

4.6.2 Perda por dessecação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988)

Em pesa-filtros previamente dessecados por 30 minutos e tarados, foram pesados 1 g da droga moída e colocados em estufa por 2 horas a 105°C. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 1 hora, repetindo-se o procedimento até peso constante. Para o cálculo da perda por dessecação foi utilizada a Equação .

$$PD = \frac{Pu - Ps}{Pa} \cdot 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde: Pa= peso da amostra

Pu= peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação

Ps= peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação

PD= Perda por dessecação

Este método é também descrito como teor de umidade (aquamетria), segundo Gil, E. S. *et al.*, 2005.

4.6.3 Determinação quantitativa de polifenóis totais e taninos totais por espectrofotometria através de leitura direta (VASCONCELOS, 2003)

Foram transferidos 10,0mL do extrato para balão volumétrico de 100,0mL e o volume completado com água destilada. Um alíquota de 3,0 mL desta solução foi diluída a 100,0 mL com água destilada. A absorvância foi determinada em 263nm, utilizando água como branco. Para determinação da fração não-tanante (FNT), 10,0mL da solução usada para determinação

de PFT, foram submetidos à agitação, em agitador magnético, com 150mg de caseína (agente complexante) durante 1h. Após agitação, a solução foi filtrada e desta, retirada uma alíquota de 5,0mL e diluída a 25,0mL com água destilada. A absorvância foi determinada em 263nm, utilizando água como branco.

Os resultados foram calculados segundo as equações 1, 2 e 3 e expressos em (g%) de ácido gálico, através da média de três determinações.

$$PFT = \frac{A_1 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_1^{1\%}} \quad (\text{Equação 1}) \qquad FNT = \frac{A_2 \cdot FD}{(m - p) \cdot A_1^{1\%}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$TT = PFT - FNT \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

PFT= Polifenóis Totais

FNT= Fração não-tanante (g%);

TT= Taninos totais (g%);

A_1 = Absorvância de polifenóis totais;

A_2 = Absorvância da fração não-tanante;

FD= Fator de diluição;

m= massa de matéria-prima vegetal (g);

p= perda por dessecação de matéria-prima (g);

$A_1^{1\%}$ = coeficiente de absorção específica do ácido gálico.

4.6.4 Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

O teor de extrativos foi determinado utilizando-se, 1 g da droga seca e moída, o qual foi aquecido à fervura com 100g de água por 10 minutos. Após o resfriamento, a massa correspondente à fervura foi completada e filtrada com papel de filtro, sendo desprezados os primeiros 20 mL. Em pesa-filtros previamente tarados, foram pesados 20mL do filtrado e colocados em banho-maria, sob agitação ocasional, para serem evaporados. Em seguida, os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105°C por 2 horas. Após serem resfriados em dessecador por 20 minutos, foram pesados e recolocados em estufa por mais 1 hora. A

operação foi repetida até peso constante. O teor de extrativos foi calculado segundo a equação 4, expressando a média de seis determinações.

$$TE = \frac{g \cdot 500}{p - PD} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

TE = Teor extrativo (% , m/m)

g = massa do resíduo seco (g)

p = massa da droga (g)

PD = perda por dessecação (% , m/m)

4.6.5 Resíduo seco (HARTKE e MUTSCHLER, 1986)

4.6.5.1 Procedimento

Em pesa-filtros, previamente tarados, foram colocados cerca de 20,0g de solução extrativa, exatamente pesados. Após evaporação em banho-maria, com agitação ocasional, os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105°C por 2 horas, resfriados em dessecador por 20 minutos e então pesados. Os pesa-filtros foram recolocados em estufa por mais 1 hora até que a variação de massa entre duas determinações sucessivas fosse igual ou inferior a 0,25%.

Os resultados foram expressos em porcentagem de resíduo seco (% ,m/m), pela média de seis determinações.

4.6.6 Análise microbiológica (Farmacopéia Brasileira, 1988)

A análise microbiológica das matérias-primas empregadas neste estudo, visou cumprir com o protocolo do teste de eficácia de conservante que determina a análise prévia de todas as substâncias empregadas na formulação do gel, com a finalidade de retirar qualquer interferente nos resultados finais.

Sendo assim, para se executar a análise, seguiram-se os seguintes passos:

4.6.6.1 Preparo dos meios de cultura e de soluções

Pesou-se a quantidade conforme especificação no rótulo de cada meio de cultura. Colocou-se em balão e esterilizou-se em autoclave a 121°C por 15 min. Distribuiu-se em placas de petri em ambiente asséptico (sala limpa). Após resfriamento, acondicionou-se as placas com papel filme, guardando-as em geladeira.

O preparo de soluções foi feito conforme especificação da técnica preconizada pela Farmacopéia Brasileira, 1988.

4.6.6.2 Contagem microbiana

O método utilizado foi o direto em placas, preconizado pela Farmacopéia Brasileira, 1988. Foram analisadas em triplicata cada uma das amostras. O método consiste na contagem da população de microorganismos que apresentem crescimento visível, em 4 dias em ágar caseína-soja (para bactérias) a 30-35°C e em 7 dias, em ágar Sabouraud-dextrose (para fungos) a 20-25°C.

4.6.6.2.1 Preparação de amostras

Transferiu-se 10g ou 10mL da amostra para um erlenmeyer de plástico de 250 mL, contendo 90mL de tampão fosfato pH 7,2 (diluição 1:10). Agitou-se até dissolução e ajustou-se o pH entre 6,5-7,5 com ácido clorídrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1M. Transferiu-se 1 mL desta diluição para 9mL de água (diluição 1:100) . Em seguida transferiram-se alíquotas de 1mL de cada diluição para 4 placas de Petri e adicionou-se a cada 2 delas ágar caseína-soja e às outras 2 ágar Sabouraud, ambos liquefeitos a 45°C. Misturou-se, homogeneamente, o ágar com a amostra e deixou-se solidificar. Incubou-se, contou-se as colônias e calculou-se o número de microorganismos.

4.6.6.3 Pesquisa de patógenos

4.6.6.3.1 Preparação de amostras

Transferiu-se 10g ou 10mL da amostra para erlenmeyer de plástico contendo 300mL de caldo de enriquecimento. Ajustou-se o pH para 6,5-7,5 com HCl 0,1M ou NaOH 0,1M. Incubou-se a 30-35°C, durante 24-48h.

Repicou-se para as placas com os meios Cetrimida, Vogel Jonhson, Verde brilhante e Mac Conkey, respectivamente para pesquisa de *Pseudomonas sp*, *S. aureus*, *Salmonela sp* e *E.coli*.

4.6.6.4 Coloração de Gram para identificação da morfologia de bactérias

É a mais comum das colorações utilizadas no laboratório de microbiologia. Foi planejada para diferenciação entre as bactérias que podem reter o corante cristal violeta, apresentando cor azulada intensa após a descoloração (Gram +) e aquelas que não retêm o corante e apresentam cor vermelha (Gram -) (KONEMAN *et al.*, 2001).

Com a alça de platina, retirou-se uma pequena quantidade da colônia isolada em meio seletivo e colocou-se em lâmina limpa e desengordurada e espalhou-se delicadamente, fazendo um esfregaço. Em seguida, esperou-se secar o esfregaço e fixou-o pelo calor, através da chama do bico de Bunsen. Após esfriar a lâmina, procedeu-se a coloração. Primeiramente com o corante cristal violeta por 1 minuto. Após esse tempo deixou-se escorrer e adicionou-se pequena quantidade de água para facilitar o escoamento do excesso do corante. Em seguida, utilizou-se o outro corante que é o lugol e deixou agir por 1 minuto. Lavou-se em seguida com água corrente e logo após com álcool a 96%. Cobriu-se com solução de fucsina diluída e deixou-se atuar por 10 segundos. Lavou-se em seguida com água corrente e deixou-se secar.

4.6.6.5 Teste de sensibilidade dos meios de cultura

Esta técnica baseou-se no princípio de que as bactérias presentes numa amostra a ser incubada num meio de cultura específico, apresentam crescimento com características específicas do meio de cultura apropriado, comprovando sua capacidade de crescimento bacteriano. Este teste foi sempre realizado quando houve preparo de meio de cultura.

Inoculou-se cepas padrões nos seguintes meios estéreis a fim de verificar o crescimento de microrganismos específicos para cada meio.

A fim de testar a fertilidade do meio de cultura foram realizadas as seguintes etapas:

- 1- Inoculou-se cada meio de cultura a ser testado com um microrganismo específico, verificando assim a presença ou ausência de crescimento típico do mesmo;
- 2- Inoculou-se em duplicata 1mL da solução padronizada da cepa. Verteu-se 20mL do meio de cultura a ser testado em placas de petri, previamente fundido e mantido a 45°C. Homogeneizou-se com movimentos rotatórios em forma de 8;
- 3- Após solidificação, inverteu-se a placa e incubou-se à temperatura adequada;
- 4- Semeou-se os meios seletivos, pelo método de estrias em superfície de duas placas do meio testado para verificar a presença ou ausência de crescimento típico;
- 5- O controle positivo foi realizado inoculando no meios de cultura 1mL de cada suspensão, para confirmação das contagens inoculadas;
- 6- O controle negativo, que teve como objetivo verificar a esterilidade do meio, contou de verter em dois tubos de ensaio 10mL do meio de cultura em teste, deixar solidificar em ângulo inclinado;
- 7- Incubou-se juntamente com os meios de cultura que estavam sendo testados;
- 8- Verificou-se a ausência (esterilidade do meio) ou presença de crescimento microbiano.

A tabela 1 relata os tipos de meios utilizados nos ensaios de análise microbiana dos extratos e suas matérias-primas. Sendo necessário realizar o teste de fertilidades dos meios.

Tabela 1 – Meios seletivos para o teste de fertilidade

Meio	Microorganismo	Temperatura de incubação
Agar sabourand	<i>Candida albicans</i>	20-25°C
Agar cetrimida	<i>P. aeruginosa</i>	30-35°C
Agar Vogel-Jonhson	<i>S. aureus</i>	30-35°C
Agar verde-brilhante	<i>Salmonela sp</i>	30-35°C
Agar Mac conkey	<i>E. coli</i>	30-35°C

4.6.7 Atividade antimicrobiana dos extratos de *S. terebinthifolius*

4.6.7.1 Espécies bacterianas e fúngicas

Para os ensaios microbiológicos, foram selecionados 12 cepas microbianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC – 13150), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC – 27853), *Escherichia coli* (ATCC – 8739), *Bacillus subtilis* (ATCC – 6633), *Candida albicans* (ATCC – 90028), *Candida tropicalis* (LM – 10), *Candida krusei* (LM – 08), *Candida guilliermondii* (LM – 12), *Trichophyton rubrum* (LM – 640), *Mycrosporium gypseum* (ATCC – 131859), *Aspergillus flavus* (FCF – 126) e *Aspergillus niger*(LM – 05). As cepas bacterianas foram mantidas em ágar Mueller Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud dextrose (fungos) a 4°C.

4.6.7.2 Meios de cultura

Os ensaios da avaliação de atividade antibacteriana e antifúngica do extrato hidroalcolico foram feitos em ágar Mueller Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud dextrose – ASD (fungos), ambos da DIFCO Laboratório e Comércio. Os mesmos foram preparados conforme as instruções do fabricante.

4.6.7.3 Suspensão dos microrganismos (inóculo)

O inóculo das bactérias e das leveduras foram obtidos de cepas a partir de repiques de 24 a 48horas submetidos a temperatura de 35°C. Já o inóculo de fungos filamentosos foram

obtidos de cepas a partir de repiques de 7 a 14 dias submetidos a temperatura ambiente. Ambos os inóculos foram preparados em solução fisiológica a 0,9% estéril. As mesmas foram comparadas ao tubo 0,5 da escala Mc Farland, correspondendo, aproximadamente a 10^6 UFC/mL (Cleeland e Squives, 1991; Greger e Hadaak, 2000; Amato neto *et al*, 1994).

4.6.7.4 Antimicrobianos utilizados

Para avaliação dos ensaios de atividade antimicrobiana do produto natural, foi feito um controle com antimicrobianos utilizando discos de cloranfenicol (30 μ g) e cetoconazol (50 μ g), obtidos da CECON/SP.

4.6.7.5 Difusão em meios sólidos

O ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* foi feito pelo método de difusão em meio sólido, fazendo uso da técnica da cavidade em placa (CLEELAND, SQUIRES, 1991; HADACEK, GREEGER, 2000; AMATO NETO *et al.*, 1994). Em placas de petri (90 x 15 mm) estéreis e descartáveis, foi colocado 1 mL da suspensão de cada microrganismo. Em seguida, foi adicionado aproximadamente, 20mL do ágar Mueller – Hinton (bactérias) e do ágar Sabouraud dextrose (fungos), fundidos a 50°C. Todo o conteúdo foi homogeneizado lentamente e deixado em repouso para solidificação. Sobre o meio solidificado, foram feitas cavidades com cânulas de vidro (8 x 8 mm de diâmetro), onde em seguida, foram colocados 50 μ L do extrato solubilizado em suas diferentes concentrações de 27mg/mL; 13,5mg/mL; 6,8mg/mL; 3,4mg/mL. Os discos de cloranfenicol (30 μ g) e cetoconazol (50 μ g) foram adicionados ao meio como controles durante o feitiço do teste.

Todo sistema do ensaio foi incubado a 35°C por 24 a 48 horas para bactérias e leveduras. Os fungos filamentosos foram incubados em temperatura ambiente por 7 a 14 dias. Os testes foram realizados em duplicatas, e o resultado foi considerado positivo quando o produto inibiu o crescimento do microrganismo produzindo halos de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro (NAQUI *et al.*, 1991; ALVES *et al.*, 2000). Paralelamente, foi feito controle, consistindo de 50 μ L do veículo do extrato que foi o álcool a 40%.

4.6.8. Preparo dos géis

As matérias-primas utilizadas para formular os géis foram: plurigel, propilparabeno, metilparabeno, propilenoglicol, hidróxido de sódio (solução aquosa a 0,5%), extrato hidroalcolico de *S. terebinthifolius* e água destilada estéril.

A matéria-prima do gel foi o Plurigel, um polímero de acrilato com grupos carboxila ativos, capazes de se intumescer rapidamente após neutralização com base adequada, não sendo necessário aquecimento.

Na preparação do gel foi utilizado 2 % de plurigel, 5 % de propilenoglicol e q.s de NaOH 0,5% para ajustar o pH a 6. Os conservantes utilizados foram propilparabeno, amplamente conhecido como nipazol e metilparabeno, conhecido como nipagin.

A formulação utilizada consta de

Plurigel.....	2,0g
Propilenoglicol.....	5,0g
Nipagin.....	0,6g
Nipazol.....	0,3g
Hidróxido de sódio em solução a 5% q.s. pH 6,0	
Água destilada estéril q.s.p.....	100mL

O gel foi manipulado pela dispersão de 2 g do polímero plurigel em aproximadamente 50mL de água destilada estéril. Homogeneizou-se com bastão de vidro, delicadamente. Colocou-se, em seguida a quantidade de água restante. Em separado colocou-se o propilparabeno e o metilparabeno e incorporou-se com o 5% de propilenoglicol. Após esse procedimento, verteu-se no sistema anterior. Homogeneizou-se. Adicionou-se quantidade suficiente de solução de hidróxido de sódio a 5% para favorecer a gelificação. O gel foi mantido em becker de 250mL, coberto com papel filme por 24h. Mediu-se o pH. Após 24h foi incorporado em 100g de gel o extrato seco de *S. terebinthifolius* na concentração que apresentou atividade antimicrobiana, correspondente a 2,7%.

4.6.8.1 Parâmetros

Os parâmetros avaliados nos géis foram o físico, físico-químicos e o microbiológico, onde foi realizado o teste do desafio.

4.6.8.1.1 Físicos

Os testes físicos estão relacionados a descrição do aspecto, cor e odor das amostras

4.6.8.1.1.1 Aspecto

As características da amostra serão observadas visualmente, verificando se ocorreram modificações macroscópicas. O aspecto do gel deve ser homogêneo e apresentar coloração marrom avermelhada, característica do extrato de *S. terebinthifolius*. O produto deve manter-se íntegro durante todo o teste, mantendo o seu aspecto inicial nas condições estabelecidas do teste.

4.6.8.1.1.2 Cor

Foi utilizado o método visual. Constatou-se através da comparação da cor da amostra com a do padrão estabelecido em um de frasco de mesma especificação. A fonte de luz será luz branca.

A amostra do produto pode ser avaliada como normal, sem alteração; levemente modificada; modificada e intensamente modificada. Devem permanecer estáveis até o final do teste.

4.6.8.1.2 Físico-químicos

Esses parâmetros permitem ao formulador detectar futuros problemas que podem afetar a estabilidade e a qualidade de seu produto. O teste abordado foi o pH.

4.6.8.1.2.1 pH

É medida através de potenciometria, pela diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo. A determinação do pH será feita diluindo-se a amostra 1:2, conforme BOU-CHA *et al.*, (2005).

Pesou-se 2g do gel e adicionou-se 18 mL de água destilada, afim de formar uma solução.

4.6.8.1.3 Microbiológico

Os produtos cosméticos devem ser produzidos, armazenados, transportados e distribuídos de forma segura, e devem atender à Resolução 481/99. Formulações a base de água e componentes orgânicos podem favorecer o crescimento de microrganismos. Em alguns casos, estes afetam a estrutura dos agentes conservantes influenciando na estabilidade do produto justificando a avaliação microbiológica do produto. Com o desenvolvimento das BPF, entende-se que a qualidade microbiológica de um cosmético não deve depender exclusivamente do seu sistema conservante. Entretanto, como não se pode prescindir de seu uso, a escolha dos conservantes deve ser adequada para que sejam efetivos. Além disso, deve-se considerar que os conservantes podem ser inativados, total ou parcialmente, deixando o produto sem a proteção esperada. Portanto, testes de eficácia para os conservantes devem ser parte essencial dos dados de segurança dos produtos cosméticos (ANVISA, 2006).

4.6.9. Teste de desafio do sistema conservante (“Challenge test”)

É necessário antes de iniciar os teste de desafio, primeiramente comprovar o método de inativação do neutralizante no crescimento microbiano.

4.6.9.1. Comprovação de inativação do neutralizante

A comprovação da inativação de cada cepa utilizada no teste do sistema conservante foi efetuada transferindo-se aproximadamente 100 células (UFC), provenientes da suspensão microbiana padronizada para placas de petri contendo 1 mL da diluição 1:10 do produto.

Neste estudo foram utilizados os conservantes metil e propilparabeno, e como neutralizante, o polissorbato 80. Foram realizados 5 grupos de estudo para cada microrganismo teste (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos grupos de estudo para o teste de comprovação da inativação de conservantes.

Grupos	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Teste 1					
Teste 2					
Teste 3					
Viabilidade					
Peptona					

Legenda:

Teste 1- gel com *S. terebinthifolius* mais conservante + inóculo + tampão com polissorbato 80

Teste 2- gel sem *S. terebinthifolius* e sem conservantes + inóculo + tampão com polissorbato 80

Teste 3 - gel sem *S. terebinthifolius* mais conservantes + inóculo + tampão com polissorbato 80

Viabilidade - inóculo + tampão sem polissorbato 80

Peptona - inóculo + tampão com polissorbato 80

4.6.9.1.1 Procedimento

Transferiu-se para placa de petri alíquotas de 1 mL das suspensão microbiana e da diluição 1:10 do produto. As alíquotas foram homogeneizadas com 15 a 20mL do meio de cultura e resfriado a 45°C. O ensaio foi incubado a 30-35°C por 48 horas e a 20-25°C por 5 dias, respectivamente para bactérias e fungos. Paralelamente, foram efetuados os controles

visando comprovação da não interferência dos neutralizantes utilizados no diluente, no crescimento microbiano.

O controle foi realizado com as três formulações, sem a presença dos microrganismos: gel com *S. terebinthifolius* mais tampão com polissorbato 80, gel sem *S. terebinthifolius* mais conservante mais tampão com polissorbato 80 e gel sem *S. terebinthifolius* e sem conservante mais tampão com polissorbato 80. Uma recuperação parecida entre o grupo teste e o grupo peptona demonstra uma eficácia adequada do neutralizador. E uma recuperação parecida entre o grupo peptona e o grupo viabilidade demonstra toxicidade adequada do neutralizador (USP 29, 2006).

4.6.9.1.2 Microorganismos

Os microrganismos empregados no desafio foram: *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ICQS 00230, *E. coli* ATCC8739, *C. albicans* ICQS e *A. niger* ICQS 40036. Todas procedentes do Instituto Oswaldo Cruz- RJ.

4.6.9.1.2.1 Preparação e padronização do inóculo

Primeiramente, hidratou-se a cepa liofilizada com cerca de 0,5 mL de solução salina estéril na própria ampola do liofilizado ou swab impregnado com a cepa em tubo de ensaio estéril. Ressuspendeu-se o sedimento homogenizando-o. Em seguida semeou-se com o a alça de platina para placas de petri contendo o meio de cultura tripticase soja (TSA) para bactérias ou ágar Sabouraud Dextrose (ASD) para fungos. As placas de ASD foram incubadas a 25°C durante 7 dias e as de TSA a 37°C durante 48 h.

Após essa etapa, seguiu-se a etapa do repique das cepas. Conforme o procedimento abaixo:

- 1- Preparam-se os meios de cultura de acordo com o especificado para cada microrganismo;
- 2- Dispensaram-se os meios em tubos de 15x180mm e esterilizaram-os a 121°C por 15 minutos;
- 3- Inclinar-se os tubos em um ângulo de $\pm 30^\circ$ até solidificação dos mesmos;
- 4- Na cabine de fluxo laminar, retirou-se com alça de platina uma porção da cultura desenvolvida na superfície da placa;

- 5- Semeou-se esta porção sobre a superfície do meio inclinado, iniciando do fundo até a porção anterior do tubo;
- 6- Identificou-se o tubo com o nome do microrganismo, nº da cepa e data do repique;
- 7- Os tubos foram armazenados em geladeira, a temperatura de 2° a 8°C e por no máximo 6 meses. Após essa etapa foi realizada a preparação do inóculo, conforme figura 2.

A fim de se estabelecer numericamente uma variação entre o crescimento em um meio e o microrganismo específico, fez-se uma série de contagens em placas a partir da diluição 10^{-6} e 10^{-8} , para determinar a densidade microbiana que foi de 100 células viáveis/mL no teste de comprovação de neutralização de conservantes e de 10^6 UFC/mL no teste do desafio.

Para coletar células de *A. niger*, usou-se salina estéril mais 0,05% de polissorbatato 80 e adicionou-se quantidade suficiente, a fim de se obter um inóculo de 1×10^8 UFC/mL.

A técnica foi efetuada da seguinte forma:

- 1- A partir da cultura em tubo inclinado guardado em geladeira, colocou-se 10 mL de solução salina estéril e transferiu-se para um tubo estéril. Em seguida, incubou-se a 25°C por 7 dias para fungos e a 37°C por 48h para bactérias;
- 2- Em seguida, transferiu-se essa suspensão para um erlenmeyer com 90 mL de solução salina estéril (diluição 10^{-1});
- 3- Prepararam-se uma seqüência de diluições a partir de 10^{-1} até 10^{-8} utilizando uma nova pipeta estéril a cada transferência;
- 4- Identificaram-se os tubos com os nomes dos microrganismos, data de preparação e a diluição contida no mesmo;
- 5- Assepticamente, transferiu-se 1mL das diluições 10^{-6} e 10^{-8} para placas de petri, em duplicata e verteu-se em cada placa 20mL de TSA (bactérias) e ASD (fungos), fundidos a 45°C, homogeneizando com movimentos rotatórios em forma de 8;
- 6- Identificaram-se as placas das diluições com o nome do microrganismo e a diluição usada;
- 8- As placas foram incubadas;
- 9- Decorrido o tempo de incubação, determinou-se a média da contagem por mL da suspensão utilizada;
- 10- Selecionou-se o tubo contendo a diluição de 10^2 UFC/mL para o teste de validação de contagem e de 10^6 UFC/mL para o teste do desafio.

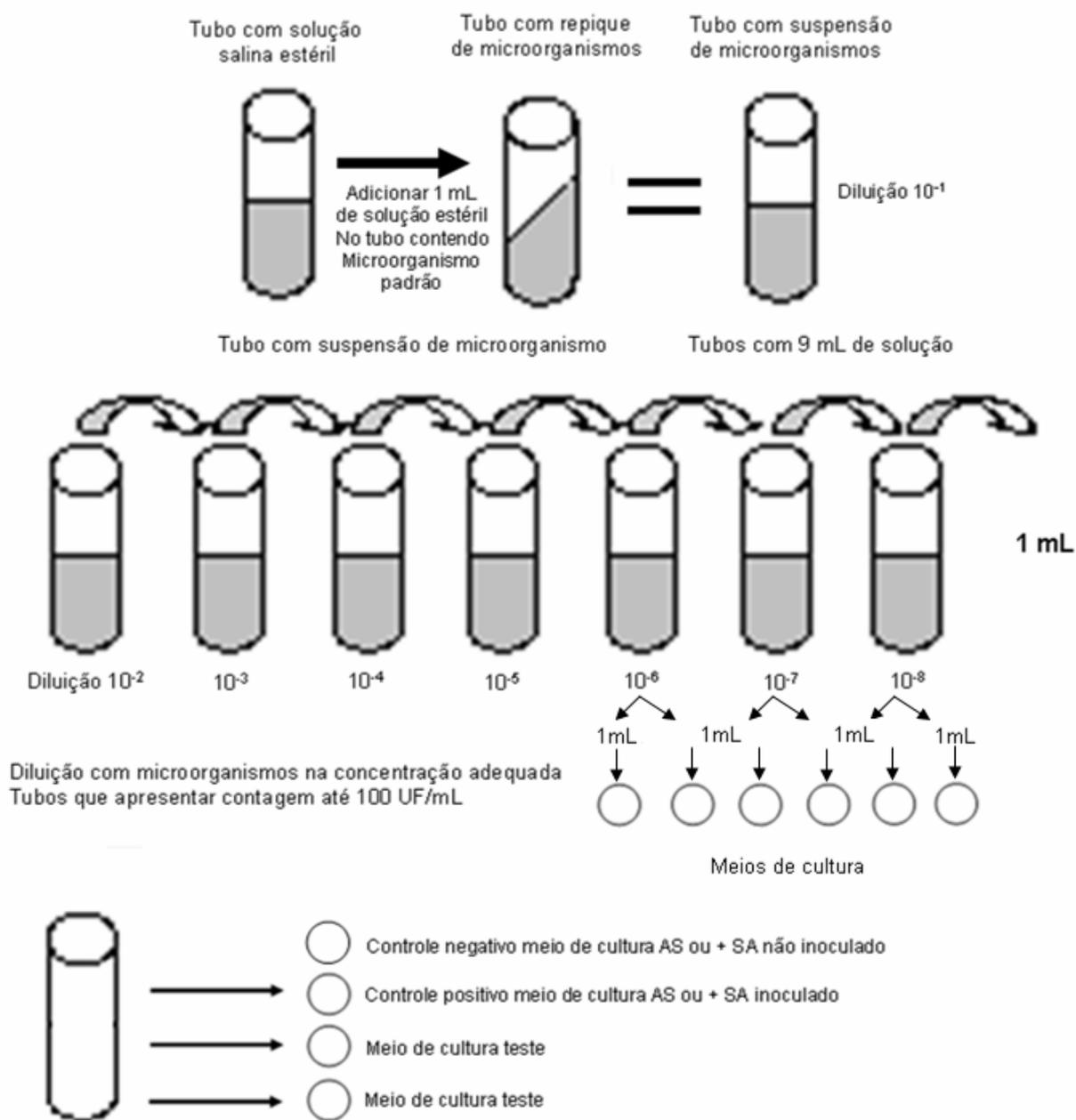


Figura 2 – Esquema de diluição para preparação do inoculo

4.6.9.2. Procedimento para o teste de eficácia de conservantes

Consiste na contaminação proposital do produto com microrganismos específicos e avaliação da amostra em intervalos de tempos definidos, com o objetivo de avaliar a eficácia do sistema conservante necessário à proteção do produto. Os conservantes utilizados devem estar em conformidade com o estabelecido na Resolução 162/01 e suas atualizações (BRASIL, 2001).

A estabilidade de produtos farmacêuticos é avaliada através da RE n. 1, de 29 de julho de 2005. A estabilidade depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens (BRASIL, 2005).

4.6.9.2.1 Técnica

Nos testes de eficácia antimicrobiana e limites microbianos, o número de microrganismos desafiadores no produto é estimado em vários intervalos de tempo e calculado a concentração em UFC/mL pelo método de contagem em placas. Pelo menos 3 replicações do experimento devem ser feitas, e cada um deverá demonstrar que a média ou UFC recuperado do produto desafiado deverá ser menor que 70% do que é recuperado do inóculo controle.

As amostras foram submetidas ao teste de eficácia do sistema conservante, segundo a Farmacopéia Européia, 2002, empregando-se as seguintes cepas: *S. aureus* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC, *E. coli* ATCC, *C. albicans* INCQS 40006 e *A. niger* INCQS 40036.

De cada amostra foram transferidas 5 porções de 50g para potes de 60g de polietileno estéreis. Em seguida, foi inoculada 500µL da suspensão de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e de *A. niger* na concentração de 10^8 UFC/mL, procurando ajustar a carga para cerca de 10^6 UFC/g de amostra, respeitando a proporção do inóculo em não mais que 1% (v/p).

Alíquotas de 500µL de suspensão microbiana padronizada (aproximadamente 10^8 UFC/mL) de cada microrganismos foi transferida para pote de polietilenoglicol com 50g de

gel de aroeira com e sem conservantes. As amostras foram imediatamente homogeneizadas manualmente, com auxílio de um bastão de vidro, durante cerca de 1 minuto. Em paralelo e no mesmo momento, volumes de 50 mL de tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,2 mais neutralizante estéril foram inoculados de forma à utilizada para o produto (controles). Tanto as amostras como o tampão foram submetidas à determinação da carga microbiana viável, pela técnica de “pour plate” em triplicata com 1g da amostra dispersa e diluída em tampão até 10^{-4} . Foi adicionado 15mL de ágar tripticase soja (TSA) para inóculos bacterianos e ágar Sabouraud dextrose (ASD) para cepas fúngicas. O acompanhamento do teste foi pela determinação periódica da carga microbiana de sobreviventes, nas amostras mantidas à temperatura ambiente (25°C). Esta periodicidade refere-se à avaliação imediatamente após a contaminação com inóculo, 24h, 48h e 7, 14, 21 e 28 dias. As condições de incubação foram de 37°C para bactérias e a 25°C para fungos.

No caso do controle, em que foi utilizado tampão de fosfato de potássio monobásico em pH 7,2 foram mantidos e analisados durante o período do teste. A eficácia antimicrobiana em cada amostra foi avaliada pelo critério de interpretação A da Farmacopéia Européia, 2002, na qual preconiza para bactérias, uma redução de 2 ciclos logarítmicos em 2 dias e de 3 ciclos logarítmicos em 7 dias e sem nenhuma alteração em 14 dias e nenhum aumento em 28 dias. Já para fungos, relata uma redução de 2 ciclos logarítmicos em 14 dias e nenhum aumento em 28 dias.

Do procedimento de contagem de colônias é possível calcular a redução log:

$$\log_{10} \text{UFC mL}^{-1} \text{ no tempo zero} - \log_{10} \text{UFC mL}^{-1} \text{ num dado tempo}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos constitui um dos atributos essenciais para o seu desempenho adequado, principalmente em relação à segurança, eficácia e aceitabilidade destes produtos. Neste trabalho, avaliou-se a qualidade microbiológica das matérias-primas que fizeram parte da formulação do gel com aroeira, desde a contagem de microrganismos viáveis, pesquisa de patógenos e teste de eficácia de conservantes.

5.1. Perda por dessecação

A tabela 3 mostra o resultado do teor de umidade das cascas pulverizadas de aroeira, através do método gravimétrico.

Tabela 3 - Perda por dessecação para cascas de *S. terebinthifolius* Raddi.

Método	Média (%)	Desvio padrão	CV (%)
Estufa	9,7%	1,584	0,1630

CV (%) - coeficiente de variação percentual para 6 amostras.

O teor de umidade das cascas foi de 9,7% e está dentro do esperado, conforme os estudos de Vasconcelos, 2003, no qual trabalhou com essa mesma droga vegetal.

Como há poucas referências em que relatam esse teste para a aroeira, utilizou-se a comparação com dados de outras plantas. Segundo os trabalhos de Melo *et al.*, 2004, em que determinou o grau de pureza de *Peumus boldus*, *Bauhinia spp* e *Ginko biloba* L., através dos teores de umidade e os mesmos estavam abaixo do limite máximo permitido que é de 8 a 14%. Resultado semelhante foi mostrado com os extratos de *S. terebinthifolius*, conforme Tabela 5.

A respeito do excesso de água em plantas medicinais, a WHO (1998); RDC 481 (1999); RDC 48 (2004), relatam que pode favorecer crescimento microbiano, além da presença de insetos e promover deterioração por hidrólise.

Já os estudos de Amaral *et al.*, 2003, constataram que o teor de umidade nas plantas medicinais adquiridas em feiras livres apresentou valores muito acima dos recomendados, em torno de 22%.

O excesso de umidade em matéria-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. O teor máximo de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias varia entre 8 e 14%. O método gravimétrico, também descrito nas Farmacopéias Britânica e Alemã e pela OMS, é mais adequadamente denominado perda por dessecação (FARIAS, M.R., 1999).

5.2. Determinação do teor de extrativos

A tabela 4 evidenciou o teor de extrativos da matéria-prima *S. terebinthifolius* Raddi.

Tabela 4 - Teor de extrativos da matéria-prima *S.terebinthifolius* Raddi

Teor de extrativos	Média (m/m %)	Desvio padrão	CV%
	27,68	0,000408	0,008138

CV% - Coeficiente de variação para 6 amostras

O teor de extrativos da matéria-prima foi de $27,68 \pm 0,0004$ (% m/m). Esta determinação apresenta grande importância, sendo um método auxiliar no controle da matéria-prima. Avalia a quantidade de substâncias extraídas em determinado líquido extrator, auxiliando na escolha do mais adequado (ZHI-CEN, 1980).

5.3. Determinação do resíduo seco

Quanto ao resíduo seco, verificou-se a importância desse dado, já que a partir desses valores pode-se avaliar a quantidade de droga vegetal presente no extrato. Sendo assim, os estudos de Vasconcelos *et al.*, 2005, mostram que os dados do resíduo seco são usados como critério de avaliação dos estudos da influência da temperatura de secagem por aspersão dos extratos secos de aroeira da praia. Serve também como critério de qualidade da matéria-prima vegetal, como nos estudos de Toledo *et al.*, 1998.

Tabela 5 - Resíduo seco dos extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Extratos	%(m/m)	Desvio padrão	CV%
Extrato não tratado	2,68	0,536667	0,99
Extrato tratado autoclavado 15 min	2,80	0,543333	1,00

CV% - Coeficiente de variação para 6 amostras

5.4. Análise microbiológica

As drogas vegetais podem conter um grande número de fungos e bactérias, geralmente provenientes do solo, pertencentes à microflora natural de certas plantas ou mesmo introduzidas durante a manipulação. Dependendo das condições de manejo, secagem e armazenamento, os microrganismos podem desenvolver-se, intensificando a contaminação (WHO, 1998).

Foram realizadas análises microbianas da droga vegetal (cascas), seus extratos e a forma farmacêutica gel de aroeira.

Os resultados da contagem de bactérias aeróbias presentes nos extratos e na forma farmacêutica gel de aroeira, encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Contagem microbiana (bactérias) nas amostras de gel base, extratos com álcool a 40% e 70% e nos géis com os mesmos extratos, expressos em unidades formadoras de colônias/g (UFC/g) ou (UFC/mL).

Amostras	UFC/g
Gel base	Nenhum crescimento
Gel com extrato a 40%	$0,27 \times 10^2$
Gel com extrato a 70%	Nenhum crescimento
Extrato a 40%	$0,25 \times 10^2$
Extrato a 70%	Nenhum crescimento
Controle negativo	Nenhum crescimento

Neste trabalho foi verificado que a contagem microbiana (bactérias) no extrato em álcool a 40% foi de $0,25 \times 10^2$ UFC/g. Resultados semelhantes foram verificados também no gel com o extrato incorporado, no qual apresentou $0,27 \times 10^2$ UFC/g. E já no extrato em álcool a 70%, não apresentou crescimento microbiano. O mesmo aconteceu quando o extrato foi incorporado no gel, conforme Tabela 9. Isso mostra que a contaminação do gel foi devido ao extrato.

Os limites das contagens microbianas, segundo a WHO, (1998) e a RDC 481 de 1999, para plantas medicinais a serem utilizadas em preparações de uso tópico são de 10^7 UFC/g para bactérias aeróbicas e de 10^4 UFC/g para fungos e leveduras.

Através desses resultados, verificou-se que os valores da contagem bacteriana dos extratos em álcool a 40%, 70% e em seus respectivos géis, encontram-se dentro dos limites preconizados por WHO, 1998 e RDC 481/99.

O que se percebe claramente é que o álcool a 70% tem ação antisséptica, promovendo neste caso uma ação também conservante presente no respectivo extrato e gel. E o fato de haver um crescimento bacteriano no extrato em álcool a 40% e, em seu respectivo gel, não reprová, já está dentro dos limites estabelecidos. Sendo, portanto, possível de ser utilizado em preparações fitoterápicas, já há menor quantidade de álcool na preparação do extrato.

Para avaliar de onde provinha a contaminação do extrato a 40%, foi realizada a análise microbiológica das cascas pulverizadas de aroeira e também submetidas ao processo de esterilização por autoclave e microondas conforme a tabela 7.

Tabela 7 – Contagem microbiana (UFC/g) nas amostras de cascas pulverizadas de *S. terebinthifolius* não tratadas, autoclavadas e em microondas em potência de 540W por 2 minutos.

Cascas pulverizadas	Agar Sabouraud (Fungos)	Agar TSA (Bactérias)
Não tratadas	0,26 x10 ² UFC/g	3,68 x10 ² UFC/g
Autoclavadas	Nenhum crescimento	0,12 x10 ² UFC/g
Em microondas 540W 2 min	0,10 x10 ² UFC/g	0,50 x10 ² UFC/g

A tabela 7 mostrou que, as cascas pulverizadas de aroeira, quando não tratadas apresentaram a formação de 3,68x10² UFC/g de bactérias e 0,26x10² UFC/g de fungos. Comparando-se esses resultados com a contagem microbiana nos pós submetidos ao processo de esterilização por autoclavação, verificou-se que não apresentaram crescimento de fungos. Mas, apenas um pequeno crescimento bacteriano de 0,12x10² UFC/g. Já na contagem microbiana nos pós tratados por microondas, observou-se um crescimento de 0,50 x10² UFC/g para bactérias e 0,10 x10² UFC/g para fungos. Verificou-se dessa forma que, houve uma redução da carga microbiana quando se comparam os pós tratados com os não tratados.

Com a intenção de verificar se os resultados são estatisticamente significativos, foi realizado ANOVA, cujo resultado está apresentado na tabela 8 e 9.

Tabela 8 – Resultados da contagem microbiana (bactérias) das cascas não tratadas e tratadas pelo método ANOVA.

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F	Valor-P	F-crítico
Entre grupos	16,89813	1	16,89813	9,348519	0,012095	4,96459
Dentro dos grupos	18,07573	10	1,807573			1
Total	34,97387	11				

* Significativo para $\alpha= 0,05$

A ANOVA, para contagem microbiana (bactérias e de fungos) de cascas não tratadas e tratadas, mostrou que as diferenças entre as amostras foram estatisticamente significativas, já que o valor de F foi maior do que o valor de F- crítico (Tabela 8 e 9).

Tabela 9 – Resultados da contagem microbiana (fungos) das cascas não tratadas e tratadas pelo método ANOVA.

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F	Valor-P	F-crítico
Entre grupos	0,090133	1	0,090133	10	0,01012	4,9645
Dentro de grupos	0,090133	10	0,009013			91
Total	0,180267	11				

* Significativo para $\alpha= 0,05$

Resultado semelhante foi encontrado por Sousa *et al.*, 2006, que analisaram a carga microbiana por contagem de microrganismos viáveis da droga vegetal *Phyllanthus niruri* e

verificaram um valor em torno de 10^5 de bactérias, o que está dentro do especificado pela WHO, 1998.

Segundo a WHO, 1998, o material vegetal não tratado, coletado em condições higiênicas e que foi processado, incluindo procedimentos de descontaminação química ou física, como por exemplo, aquecimento, extração com álcool e outros podem apresentar *E. coli* até no máximo 10^4 UFC/g e fungos até 10^5 UFC/g e não apresentar espécies de *Salmonella*.

Conforme a Tabela 6 mostrou que o extrato em álcool a 40% apresentou um crescimento de $0,25 \times 10^2$ UFC/g, apresentando dados semelhantes quando incorporado em gel de Plurigel de $0,27 \times 10^2$ UFC/g. E visto que no extrato a 70% não apresentou crescimento, sendo da mesma forma quando incorporado em gel. A partir desses dados, pode-se supor que a contaminação seja proveniente da matéria-prima vegetal, já que houve maior crescimento microbiano nas amostras não tratadas.

Percebe-se que para se obter matérias-primas de origem vegetal em boas condições sanitárias é necessário estabelecer normas de boas práticas de cultivo, coleta, processos de secagem, transporte e armazenamento, além de certificar fornecedores (DALL ÁGNOL *et al.*, 1998a; 1998b).

As técnicas de determinação da carga microbiana estão descritas na publicação da WHO, 1998, bem como na Farmacopéia Européia (2002). A Farmacopéia Brasileira não estabelece limites específicos para drogas vegetais, sendo detalhadamente descritos os métodos de filtração por membrana, contagem em placa ou em tubos múltiplos, aplicáveis à contagem de microrganismos viáveis em produtos que não necessitam cumprir com o teste de esterilidade. A WHO, (1998) e RDC 481, (1999), diferencia os limites de acordo com o destino do material.

Os limites microbianos preconizados por essas normas variam de 10^2 UFC/mL até 10^4 UFC/mL para *E. coli*; e de 10^4 UFC/mL até 10^5 UFC/mL para fungos, em ambas com ausência de *Salmonella*. Já os limites da Farmacopéia Européia são de ausência de *E. coli*, *P. aeruginosa* e de *S. aureus*, apresentando até 10^5 de bactérias aeróbias e 10^4 de fungos.

De outra forma os resultados de outros autores (Andrade *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2004; Zaroni *et al.*, 2004, Yamamoto *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2001 e Bugno *et al.*, 2005) verificaram que as condições de algumas drogas vegetais não estão de acordo com os padrões

de qualidade microbiológico adotados pela WHO, 1998 para plantas medicinais utilizadas para comercialização *in natura* ou na fabricação de produtos em farmácia com manipulação.

A partir dos resultados anteriores das cascas tratadas e não tratadas e a fim de verificar a influência do álcool presente nos extratos hidroalcoólicos obtidos dessas amostras, foi realizado a contagem microbiana dos extratos em álcool a 40, 50, 60 e 70% (Tabela 10).

Tabela 10 – Contagem microbiana de extratos hidroalcoólicos a 40%, 50%, 60% e 70%.

Amostras	ASD	TSA	ASD	TSA
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
	Não tratada	Não tratada	Autoclave	Autoclave
Extrato 40%	0,4x10 ²	0,41x10 ²	NC	NC
Extrato 50%	0,16x10 ²	0,55x10 ²	2,9x10 ²	4,6x10 ²
Extrato 60%	NC	0,33x10 ²	1,2x10 ²	5,8x10 ²
Extrato 70%	NC	NC	NC	NC
Controle	NC	NC	NC	NC

Legenda: NC: Nenhum Crescimento

As amostras de extratos hidroalcoólicos obtidos de cascas tratadas apresentaram menor contaminação microbiana que os obtidos de cascas não tratadas.

Com a intenção de verificar se os resultados são estatisticamente significativos, foi realizado ANOVA, cujo resultado está apresentado na tabela 11 e 12.

Tabela 11 - Resultados da contagem microbiana (bactérias) dos extratos obtidos de cascas tratadas por autoclave e não tratadas pelo método ANOVA.

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F	Valor-P	F-crítico
Entre grupos	104,3769	7	14,91099	8,118124	3,99E-06	2,2490
Dentro dos grupos	73,47013	40	1,836753			24
Total	177,8471	47				

* Significativo para $\alpha=0,05$

A ANOVA, para contagem microbiana (bactérias e de fungos) de extratos hidroalcoólicos obtidos de cascas não tratadas e tratadas por autoclave, mostrou que as diferenças entre as amostras foram estatisticamente significativas, já que o valor de F foi maior do que o valor de F-crítico (Tabela 11 e 12).

Tabela 12 - Resultados da contagem microbiana (fungos) dos extratos obtidos de cascas tratadas e não tratadas pelo método ANOVA.

Fonte de variação	SQ	Gl	MQ	F	Valor-P	F-crítico
Entre grupos	19,42156	6	3,236927	8,603967	8,93E-06	2,3717
Dentro dos grupos	13,16747	35	0,376213			85
Total	32,58903	41				

* Significativo para $\alpha=0,05$

Os resultados de Dall Ágnol *et al.*, (1998a; 1998b); Galina *et al.*,(1998) e Amaral *et al.*, (2001), demonstraram a necessidade de se implementar programas de fiscalização, vigilância e controle de qualidade em material vegetal disponibilizados em feiras livres.

5.5. DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS

Conforme a hipótese que foi levantada quanto aos processos de esterilização por microondas e autoclave serem efetivos ou não para as cascas pulverizadas de aroeira; um outro parâmetro importante que deve ser levado em consideração é o doseamento dos marcadores desta planta que são os taninos e polifenóis.

Já que os pós foram submetidos a processos com elevada temperatura e umidade na autoclave, além da presença de radiação proveniente do microondas. Esses processos poderiam promover alterações nas estruturas desses marcadores, como reações de hidrólise. Os resultados do doseamento nas amostras dos extratos em álcool a 40%, 50%, 60% e 70% de cascas não tratadas encontram-se na tabela 13.

Tabela 13 – Determinação do teor de polifenóis totais, taninos totais e fração não tanante para diferentes extratos de *S.terebinthifolius* obtidos de cascas não tratadas

Concentração dos extratos	PFT g%	FNTg %	TT g%
40%	8,53±0,09 (0,0107%)	1,44±0,14 (0,0998%)	7,09±0,13 (0,0184%)
50%	10,43±0,25 (0,0246%)	1,08±0,12 (0,1137%)	9,35±0,31 (0,0336%)
60%	10,51±0,04 (0,0039%)	1,44±0,19 (0,1371%)	9,06±0,23 (0,0261%)
70%	7,88±0,08 (0,0113%)	1,28±0,25 (0,2007%)	6,61±0,34 (0,0517%)

As amostras dos extratos em álcool a 50% e a 60% de cascas não tratadas apresentaram maior teor de polifenóis e taninos totais que os outros extratos a 40% e a 70%.

Com a intenção de verificar se os resultados são estatisticamente significativos, foi realizado ANOVA, cujo resultado está apresentado na tabela 14.

Tabela 14 – Resultados para taninos obtidos para os extratos hidroalcólicos de *S. terebinthifolius* das cascas não tratadas pelo método ANOVA.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor-P	F-crítico
Entre grupos	15,30772	3	5,102573	0,300352	0,824739	3,098393
Dentro dos grupos	339,7728	20	16,98864			
Total	355,0805	23				

* Significativo para $\alpha=0,05$

A ANOVA, para taninos totais obtidos para os extratos hidroalcólicos de *S. terebinthifolius* das cascas não tratadas, mostrou que as diferenças entre os extratos não foram estatisticamente significativas, já que o valor de F foi menor do que o valor de F-crítico.

Em função destes resultados, apenas os extratos a 50% e 60% foram analisados quanto a eventual influência da autoclavação e microondas sobre o teor de Taninos e Polifenóis Totais. Os resultados estão na tabela 15.

Tabela 15 – Determinação do teor de polifenóis totais, taninos totais e fração não tanante para diferentes extratos de cascas tratadas de *S. terebinthifolius*

Tipos de extratos		PFT g%	FNT g%	TT g%
Extratos de cascas autoclavadas 121°C 15 min	AU 40%	10,69±0,11	2,18± 0,61	8,51±0,49
	AU 50%	11,17±0,12 (0,011%)	1,57±0,04 (0,0307%)	9,60±0,17 (0,0178%)
	AU 60%	11,56±0,26 (0,0228%)	1,66±0,12 (0,0779%)	9,90±0,36 (0,036%)
	AU 70%	10,70±0,10 (0,009%)	1,74±0,199 (0,114%)	8,95±0,21 (0,0239%)
*Extratos de cascas submetidas ao microondas a 540W	MO 1 min 50%	11,78±0,01 (0,0009%)	1,87±0,15 (0,0844%)	9,91±0,15 (0,0152%)
	MO 2 min 50%	11,08±0,07	1,41±0,04	9,68±0,11
	MO 1 min 60%	11,26±0,13	1,38±0,10	9,87±0,24
	MO 2 min 60%	11,21±0,38 (0,0346%)	1,34±0,15 (0,1184%)	9,87±0,40 (0,0405%)

* Por Problemas técnicos não foi possível realizar os extratos em álcool a 40% e a 70% de cascas submetidas a microondas

Legenda: AU40% - álcool a 40% de cascas submetidas em autoclave; AU50% - álcool a 50% de cascas submetidas em autoclave; AU60% - álcool a 60% de cascas submetidas em autoclave; AU70% - álcool a 70% de cascas submetidas em autoclave; MO 1 min 50% - álcool a 50% de cascas submetidas a microondas por 1 min; MO 2 min 50% - álcool a 50% de cascas submetidas a microondas por 2 min; MO 1 min 60% - álcool a 60% de cascas submetidas a microondas por 2 min; MO 2 min 60% - álcool a 60% de cascas submetidas a microondas por 2 min

O teor de polifenóis e taninos totais foi superior nas amostras dos extratos de cascas previamente submetidas a microondas e autoclavação, quando comparado com os outros extratos de cascas não tratadas.

O que se pode supor que os processos de esterilização não alteraram o teor dos marcadores desta planta, podendo-se continuar os estudos para avaliar se futuramente pode ser utilizado como método de esterilização para plantas medicinais.

A fim de verificar se os resultados são estatisticamente significativos, foi realizado ANOVA, cujo resultado está apresentado na tabela 16.

Tabela 16 – Resultados para taninos totais dos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* das cascas tratadas por autoclave pelo método ANOVA.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	2,944297	3	0,981432	0,044442	0,987173	3,098393
Dentro dos grupos	441,6678	20	22,08339			
Total	444,6121	23				

* Significativo para $\alpha=0,05$

Os resultados obtidos pelo método ANOVA quanto a presença de taninos totais dos extratos hidroalcoólicos das cascas de *S. terebinthifolius* submetidas à autoclavação, mostrou que as diferenças entre os extratos não foram estatisticamente significativas, já que o valor de F foi menor do que o valor de F- crítico.

Para avaliar se os resultados do doseamento de taninos totais entre os grupo de cascas não tratadas e tratadas são estatisticamente significativos entre si foi realizado ANOVA, cujo resultado apresenta-se na tabela 17.

Tabela 17 – Resultados para taninos obtidos dos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* das cascas não tratadas e tratadas por autoclave, pelo método ANOVA.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor-p	F crítico
Entre grupos	26,30788	7	3,758269	0,192376	0,985401	2,249024
Dentro dos grupos	781,4406	40	19,53601			
Total	807,7485	47				

* Significativo para $\alpha=0,05$

A ANOVA, para taninos totais obtidos dos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* das cascas não tratadas e tratadas por autoclave, mostrou que as diferenças entre os extratos não foram estatisticamente significativas, já que F foi menor que o F crítico.

Os estudos de Medeiros *et al.*(1998), relataram que o teor de taninos totais para os extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* Raddi foi de 6,3%.

5.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *S. terebinthifolius*

Segundo os estudos de Lima *et al.* (2004) e Martinez *et al.* (1996), os extratos de aroeira apresentam atividade antimicrobiana. A partir daí houve o interesse em verificar se os extratos hidroalcoólicos de aroeira não tratada e tratada apresentavam essa atividade. Assim, os extratos foram testados com 12 espécies microbianas.

Das 4 espécies bacterianas ensaiadas, todas elas foram sensíveis aos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* obtidos de cascas tratadas e não tratadas na concentração de 27mg/mL. Porém a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato, obtido de cascas tratadas por autoclave a 121°C por 15 min, para *E. coli* e *B. subtilis* foi de 27mg/mL. Os outros extratos de cascas não tratadas e de cascas tratadas por autoclave a 121°C por 20 minutos apresentou uma CIM de 13,5mg/mL para todas as cepas bacterianas utilizadas neste ensaio, como pode ser observado na tabela 18.

Os resultados foram expressos em termos do diâmetro da zona de inibição: < 9mm, inativo; 9-12mm, parcialmente ativo; 13-18mm, ativo; > 18mm, muito ativo (ALVES *et al.*, 2000).

Tabela 18: Média dos halos de inibição (mm) da CIM do extrato hidroalcolico de *S.terebinthifolius* contra bactérias, em meio sólido.

Extratos (mg/mL)		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtili</i>
Não tratada	13,5	11	12	12	12
	6,8	7	10	-	10
	3,4	7	7	-	-
Autoclave 15 min	27	12	14	10	12
	13,5	11	12	8	8
	6,8	10	9	-	-
Autoclave 20min	3,4	8	8	-	-
	27	14	14	12	13
	13,5	11	11	10	10
Cloranfeni col	6,8	10	10	8	-
	3,4	8	7	-	-
	Etanol a 40%	0	0	0	0

Os extratos hidroalcolicos de *S. terebinthifolius*, expressaram suas atividades contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *B. subtilis*, produzindo halos de inibição, em média, com 13mm de diâmetro.

De modo geral, os resultados estão compatíveis com os estudos de Lima *et al.* (2004), em que estudaram o espectro de ação antimicrobiana do extrato aquoso *S. terebinthifolius* frente as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Os resultados obtidos por estes autores mostraram sensibilidade de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*. Outros trabalhos confirmam a sensibilidade de bactérias Gram- positivas e Gram- negativas, conforme os tipos de espécies de Anacardiaceae estudada (LEAL *et al.*, 1996).

Leal *et al.* (1996), verificaram a atividade antiestafilocócica de extratos e do gel de *S. terebinthifolius*, sendo tais produtos hábeis para produzir halos de inibição, respectivamente de 20 e 10 mm de diâmetro.

Resultado semelhante foi relatado por Martinez *et al.* (1996), quando testaram a atividade antimicrobiana de 12 espécies de plantas cubanas e a que apresentou melhor atividade contra *S. aureus* foi a *Schinus terebinthifolius*. No estudo desses autores, relataram também que essa atividade não foi devido a presença de etanol presente no extrato. No entanto, não apresentou atividade antifúngica.

Quanto aos resultados da atividade antifúngica frente aos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* não tratada e tratada, estão evidenciados na Tabela 19.

Tabela 19: Média dos halos de inibição (mm) da CIM do extrato hidroalcólico de *S. terebinthifolius* contra fungos, em meio sólido.

Extratos mg/mL		<i>C. albica ns</i>	<i>C.t ro pic ali s</i>	<i>C kr us ei</i>	<i>Cg uil lie rm on dii</i>	<i>T.r ub ru m</i>	<i>M. gys ipi um</i>	<i>A.f lav us</i>	<i>A. nig er</i>
Não tratada	27	-	-	-	-	-	-	-	-
	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6,8	-	-	-	-	-	-	-	-
	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Autoclave 15 min	27	-	-	-	-	-	-	-	-
	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6,8	-	-	-	-	-	-	-	-
	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Autoclave 20min	27	-	-	-	-	-	-	-	-
	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda (-): sem halo de inibição.

Os extratos hidroalcólicos de cascas tratadas e não tratadas de aroeira não apresentam nenhuma atividade antifúngica, já que não houve formação de halo inibitório, conforme demonstrado na Tabela 23. Esses resultados estão compatíveis com os estudos de Martinez *et al.* (1996), em que verificaram que a *S. terebinthifolius* não apresenta ação contra *C. albicans*.

No entanto, diferem dos estudos de Schmourlo *et al.* (2005), em que relataram que extratos aquosos de *S. terebinthifolius* inibem *C. albicans*. Além dos estudos de Lima *et al.* (2004), que relataram ação contra *T. rubrum*, *M. canis*, *E. floccosum* e *C. albicans*.

A atividade antimicrobiana do extrato de aroeira neste estudo não foi devido ao etanol, já que não houve formação de nenhum halo de inibição do etanol a 40%, que foi o veículo utilizado neste estudo. Resultado encontrado também por Martinez *et al.* (1996).

A atividade antibacteriana dos extratos de *S. terebinthifolius*, possivelmente, está associada à presença de certos compostos químicos, em especial, de taninos (MATOS, 1994). Estes compostos são considerados responsáveis pelas atividades antibacteriana e antiinflamatória, o que confere largo uso desta planta no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias (SIMÕES *et al.*, 1999; BACCHI, E.M., 1986; MELO Jr. *et al.* 2002). Esses resultados demonstram que a qualidade da matéria-prima para o extrato estava em boas condições de uso. Mas, por outro lado demonstrou que não apresentou atividade sobre fungos, usados nesse experimento (Figura 3).



Figura 3 – Avaliação da atividade antifúngica do extrato hidroalcolico de *S. terebinthifolius* contra *A. flavus* (esquerda) e *A. niger* (direita)

5.7 COMPROVAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO

Este teste constou da avaliação da neutralização do sistema conservante. O polissorbato 80 foi utilizado como agente neutralizante dos conservantes empregados. Foi empregado na concentração de 1% (p/v) e adicionado ao diluente (tampão fosfato de potássio monobásico em pH 7,2), a fim de neutralizar o sistema conservante presente nas formulações com gel com *S. terebinthifolius* e com conservantes, gel sem *S. terebinthifolius* e sem conservantes e gel sem *S. terebinthifolius* e com conservantes.

A eficácia da neutralização foi testada inoculando separadamente o microrganismo teste (1 mL da suspensão padronizada com menos de 100UFC/mL) em cada placa de petri, juntamente com 1 mL do produto diluído a 10^{-1} . A sobrevivência dos microrganismos foi subsequentemente determinada através do método “pour plate”, o qual mostrou resultados satisfatórios quando as UFC obtidas são similares a da suspensão microbiana original.

O teste também foi realizado, da mesma forma, porém sem a presença de microrganismos no grupo controle. Como neste trabalho, utilizaram-se 3 formulações, o grupo controle também apresentou 3 variações. Controle 1: gel com *S. terebinthifolius* com conservantes, adicionado de tampão com neutralizante; Controle 2: gel sem *S. terebinthifolius* e sem conservantes e o controle 3: gel sem *S. terebinthifolius* e sem conservantes.

A tabela 20, mostra os valores das contagens em UFC/mL dos inóculos nos grupos controle, teste, viabilidade e peptona. Os resultados das contagens evidenciaram que o grupo controle não apresentou crescimento microbiano, como era de se esperar. Por outro lado, os grupos testes, viabilidade e peptona apresentaram crescimento microbiano dentro das expectativas esperadas.

Tabela 20 – Contagens de microrganismos viáveis em UFC/mL dos inóculos nos grupos teste, viabilidade e peptona.

Grupos	Inóculo de:				
	<i>A. niger</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	30UFC	75 UFC	100UFC	100 UFC	160 UFC
Teste 1	30UFC	20UFC	100UFC	100 UFC	80UFC
Teste 2	10 UFC	10UFC	100UFC	100 UFC	160 UFC
Teste 3	22UFC	16 UFC	100UFC	100 UFC	80UFC
Viabilidade	30 UFC	60 UFC	100UFC	100 UFC	85UFC
Peptona	30 UFC	60 UFC	100UFC	100 UFC	100UFC

Legenda:

Teste 1- gel com *S. terebinthifolius* com conservante + inóculo + tampão com neutralizante

Teste 2 - gel sem *S. terebinthifolius* sem conservantes + inóculo + tampão com neutralizante

Teste 3 - gel sem *S. terebinthifolius* com conservantes + inóculo + tampão com neutralizante

Viabilidade - inóculo + tampão sem neutralizante

Peptona - inóculo + tampão com neutralizante

O ensaio para comprovação da inativação do sistema conservante demonstrou eficiência do sistema neutralizante utilizado. Este resultado é condizente com o preconizado pela USP 29, 2006.

Segundo a USP 29, uma recuperação parecida entre o grupo teste e o grupo peptona demonstra uma eficácia adequada do neutralizador. E uma recuperação parecida entre o grupo peptona e o grupo viabilidade demonstra toxicidade adequada do neutralizador.

Resultados semelhantes foram verificados por Bou-Cha, N. *et al.* (2003) e Seo, S. B. *et al.* (2002), que utilizaram como agente neutralizador de conservantes, o polissorbato 80. Segundo esses autores, o polissorbato 80 apresentou eficácia de neutralização dos conservantes.

5.8 EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE

Todo sistema conservante necessita ser validado pelo teste de eficácia da atividade antimicrobiana, que consiste em contaminação artificial da preparação por microrganismos selecionados e monitoramento dos seus tempos de redução (FAVET; CHAPPUIS; DOELKER, 2001; ORTH; ECK, 2005).

Os conservantes utilizados neste estudo foram o propilparabeno e metilparabeno, cuja classe de conservante que compõe é álcool.

A interpretação dos resultados foi fundamentada na contagem de microrganismos viáveis durante o acompanhamento do teste do desafio.

Os valores do controle agem como referência para estabelecer a redução microbiana devido a conservantes (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21 – Número de sobreviventes (UFC/g) de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger* no teste de eficácia de conservantes

Gel	Microrganismos	Inóculo	Tempo						
			0	24h	48h	7 dias	14dias	21dias	28dias
Gel com <i>S. terebinthifolius</i> + conservantes	<i>A. niger</i>	9,1x10 ⁴	9x10 ⁴	6,5x10 ²	3x10 ¹	4x10 ¹	5x10 ¹	1x10 ¹	<10
	<i>C. albicans</i>	7,2x10 ⁹	8x10 ⁵	2x 10 ³	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>E. coli</i>	9x10 ⁷	1x10 ²	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>P. aeruginosa</i>	6x10 ⁹	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>S. aureus</i>	1,6x10 ¹⁰	5x10 ²	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Gel sem <i>S. terebinthifolius</i> e sem conservantes	<i>A. niger</i>	9,1x10 ⁴	5x10 ²	3x10 ³	2x10 ⁵	1x10 ³	1x10 ³	7x10 ³	8x10 ³
	<i>C. albicans</i>	7,2x10 ⁹	8x10 ⁵	3x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶
	<i>E. coli</i>	9x10 ⁷	4x10 ³	3x10 ³	3x10 ³	1x10 ⁴	<10	6x10 ³	1,3x10 ⁴
	<i>P. aeruginosa</i>	6x10 ⁹	8x10 ¹	<10	1x10 ³	<10	<10	<10	<10
	<i>S. aureus</i>	1,6x10 ¹⁰	4x10 ⁶	2x10 ³	<10	<10	<10	1,5x10 ⁴	2x10 ⁴
Gel sem <i>S. terebinthifolius</i> + conservantes	<i>A. niger</i>	9x10 ⁴	5x10 ²	3,1x10 ²	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>C. albicans</i>	8x10 ⁹	1x10 ¹	9x10 ¹	<10	<10	1x10 ¹	<10	<10
	<i>E. coli</i>	5x10 ⁹	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>P. aeruginosa</i>	2x10 ¹⁰	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>S. aureus</i>	1x10 ¹⁰	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Controle (tampão + neutralizante)	<i>A. niger</i>	9,1x10 ⁴	9,1x10 ⁴	3x10 ⁴	6x10 ⁴	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶
	<i>S. aureus</i>	1,6x10 ¹⁰	2x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶

A eficácia antimicrobiana em cada amostra foi avaliada pelo critério de interpretação A da Farmacopéia Européia, (2002), na qual preconiza para bactérias, uma redução de 2 ciclos logarítmicos em 2 dias; e de 3 ciclos logarítmicos em 7 dias; e sem nenhuma alteração em 14 dias e permanecendo até o 28º dia. Já para fungos, relata uma redução de 2 ciclos logarítmicos em 14 dias; e nenhum aumento em 28 dias.

A análise dos resultados para as bactérias revelou redução de 2 ciclos logarítmicos em 48 horas para a formulação do gel com *S. terebinthifolius* e manteve-se sem alteração até os 28 dias de teste, conforme tabela 22. E para o fungo verificou-se que houve redução de 3 ciclos logarítmicos em 14 dias e de 5 para a levedura, mantendo sem alteração até os 28 dias de teste.

Tabela 22 – Logaritmo (base 10) do número de sobreviventes (Log UFC/g) de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger* no teste de eficácia de conservantes.

Gel	Microrganismos	Tempo						
		0	24h	48h	7 dias	14dias	21dias	28dias
Gel com <i>S. terebinthifolius</i> + conservantes	<i>A. niger</i>	4,95	2,81	1,47	1,60	1,69	1	0
	<i>C. albicans</i>	5,90	3,30	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	2,00	0	0	0	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	0 2,69	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Gel sem <i>S. terebinthifolius</i> E sem conservantes	<i>A. niger</i>	2,69	3,47	5,30	3,00	3,00	3,84	3,90
	<i>C. albicans</i>	5,90	6,47	5,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	<i>E. coli</i>	3,60	3,47	3,47	4,00	0	3,77	4,11
	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	1,90 6,60	0 3,30	3,00 0	0 0	0 0	0 4,17	0 4,30
Gel sem <i>S. terebinthifolius</i> + conservantes	<i>A. niger</i>	2,69	2,49	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	1,00	1,95	1,95	0	1,00	0	0
	<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Controle (tampão + neutralizante)	<i>A. niger</i>	4,95	4,47	4,77	6,00	6,00	6,00	6,00
	<i>C. albicans</i>	5,90	5,96	4,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	<i>E. coli</i>	6,30	6,30	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	<i>P. aeruginosa</i>	6,00	6,30	4,30	6,079	6,10	6,10	6,10
	<i>S. aureus</i>	6,30	6,30	6,00	6,30	6,30	6,30	6,30

Ao confrontarmos os dados experimentais com as normas da Farmacopéia Européia, (2002), foi concluído que o gel com conservante e extrato de aroeira, apresenta eficácia satisfatória para *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Isto pode ser constatado quando representamos em gráfico o número de sobreviventes no decorrer do tempo de observação (figura 4 e 5). Pois para bactérias, na contagem de 24 horas não foram detectados sobreviventes. A exigência oficial é que com dois dias de contato seja constatada a redução de pelo menos 2 ciclos logarítmicos e de 3 ciclos em 7 dias de contato.

Quanto ao comportamento de *A. niger* nesta formulação, verificou-se que houve redução de 3 ciclos em 14 dias e nenhum aumento até os 28 dias, conforme o preconizado na Farmacopéia Européia, (2002). Esses resultados mostram que essa formulação também é eficaz para *A. niger*. O que pode ser verificado através do gráfico da figura 4 que mostra o

perfil de letalidade de fungos em Log UFC x dia em formulação com gel com extrato de *S. terebinthifolius* e conservantes (Figura 4).

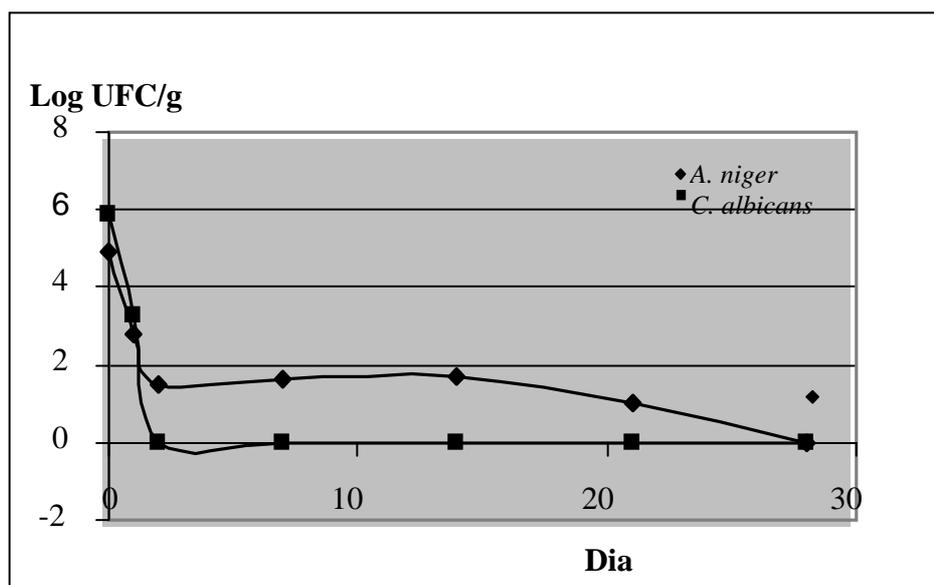


Figura 4 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC/g x dia de fungos para a fórmula com extrato de *S. terebinthifolius*.

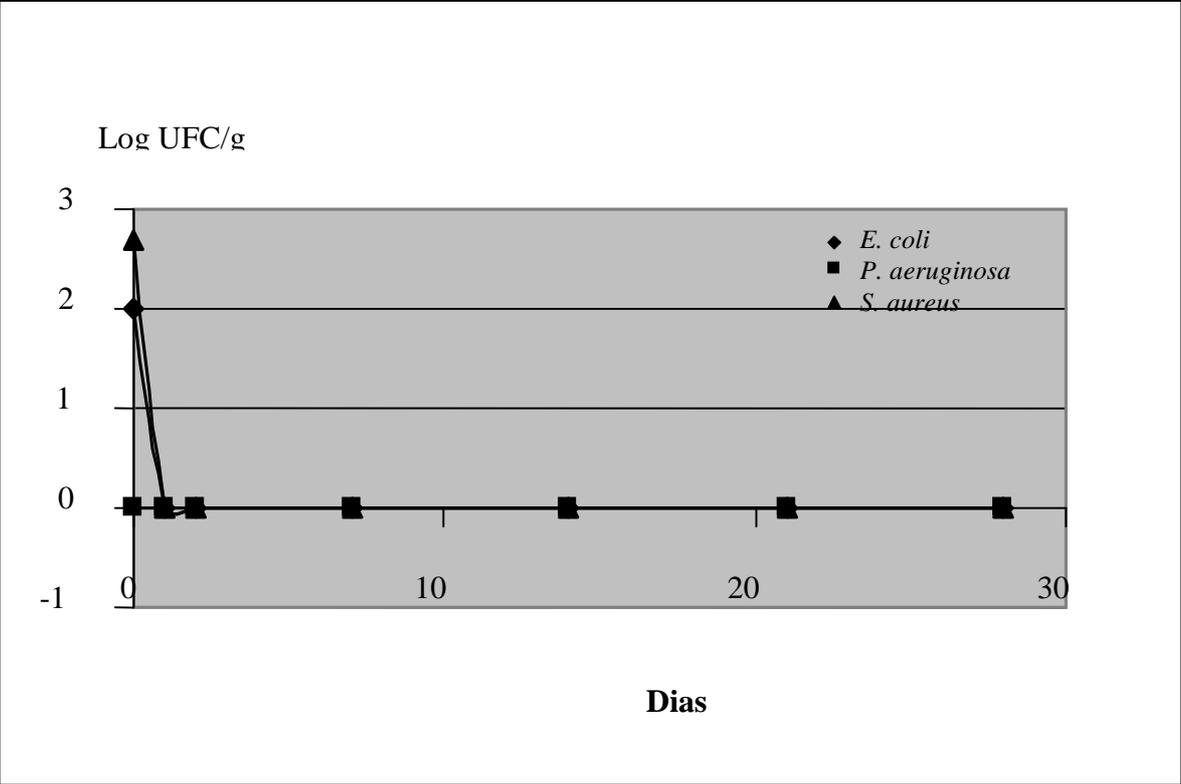
Resultados semelhantes foram verificados por Remili *et al.* (1994), com extratos de outras plantas medicinais. Estes autores relataram que os extratos de 9 plantas medicinais, tratados por spray-dried, evidenciaram atividade bactericida através do teste do desafio, empregando as cepas de *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 8539.

Os resultados deste trabalho também são condizentes com os estudos de Seo *et al.* (2002). Segundo esses autores, desenvolveram um sistema conservante, que constou de uma mistura de quitosana e extrato de *Inula helenium L*, cujo resultado apresentou excelente efeito conservante em formulações cosméticas e transdérmicas no teste do desafio frente as cepas de *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Assim como os resultados acima, os estudos de Bou-Cha *et al.* (1999), com o teste do desafio em formulação de sabonete líquido, relataram eficácia do sistema conservante frente

as bactérias *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10536 além de levedura *C. albicans* ATCC 10231 e fungo filamentosos *A. niger* ATCC 16404.

A formulação do gel incorporado com o extrato hidroalcolico de aroeira apresentou-se satisfatório com relação ao critério A para os microrganismos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger*, conforme o preconizado pela Farmacopéia Européia,(2002) para as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Figura 5).



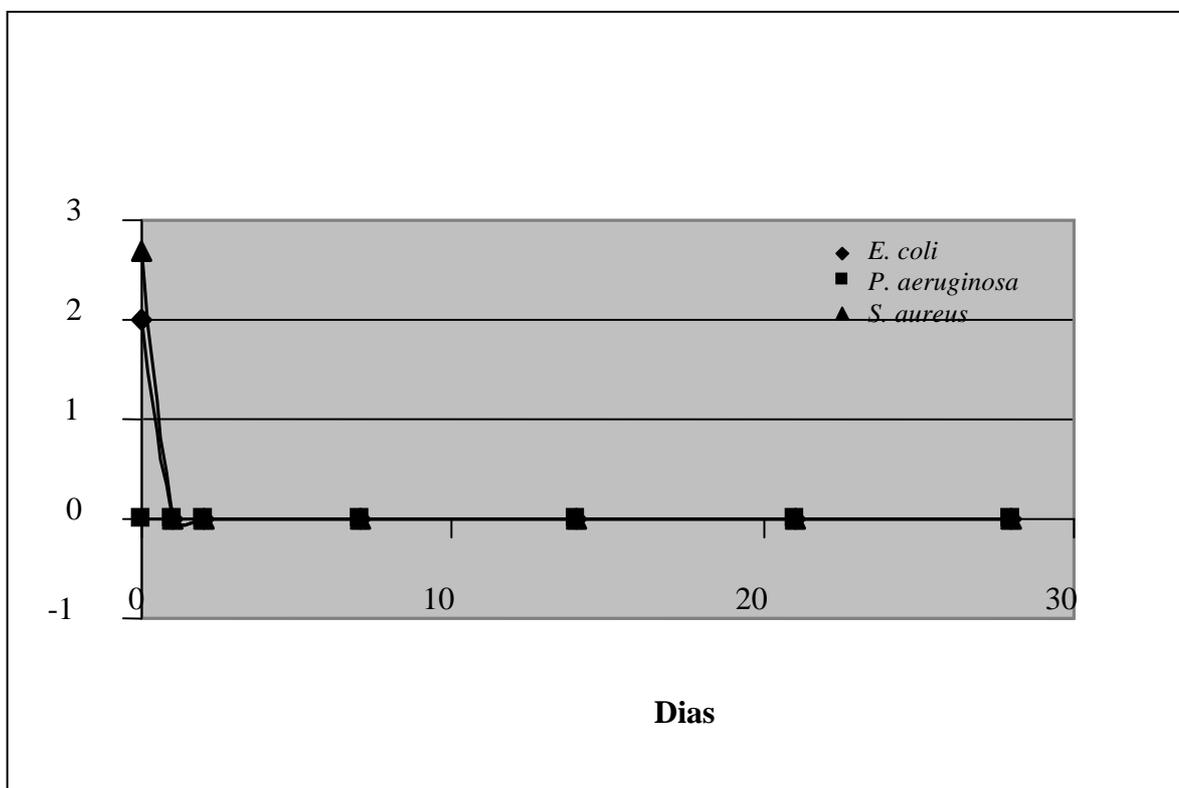


Figura 5 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC/g x dia de bactérias para a fórmula com extrato de aroeira.

Estes resultados apresentam-se compatíveis com os existentes na literatura para o teste do desafio, utilizando extratos vegetais (MANOU, 1998; NOSTRO, 2002; ARIAS, 2004b; SOUZA, 2007).

Leal *et al.*(1996), estudaram a atividade antimicrobiana de formas geleificadas de uso vaginal de *Schinus terebinthifolius*. Os resultados obtidos por esses autores mostraram sensibilidade frente ao *S. aureus*.

Os estudos de Amorim *et al.* 2003, revelaram que o gel com *S. terebinthifolius* pode ser utilizado para o tratamento de vaginose bacteriana em mulheres não gestantes, apresentando um percentual de cura de 84%.

Os estudos realizados por Melo Jr. *et al.* (2002), os autores relataram que o extrato de *S. terebinthifolius* incorporados com gel apresentou atividade contra *S. aureus*. Estudos

semelhantes foram relatos por Arias *et al.* (2004b), em que avaliaram a atividade antimicrobiana de um hidrogel associado com extratos hidroalcolico de *Acacia aroma*. E os resultados obtidos mostraram que esta formulação apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Quanto à formulação sem conservantes e sem extrato de aroeira, verificou-se que não houve redução de carga microbiana, conforme a tabela 21. É verificado também na tabela 22, que não há redução de ciclos logarítmicos durante todo o período do teste do desafio.

No confronto de dados experimentais com as normas da Farmacopéia Européia (2002), foi verificado que o gel sem conservante e sem extrato de *S. terebinthifolius*, não apresenta eficácia satisfatória para os microrganismos testados neste ensaio. Isto pode ser constatado quando na representação em gráfico (figura 6 e 7). Pois para bactérias e fungos, até a contagem dos 28 horas foram detectados sobreviventes.

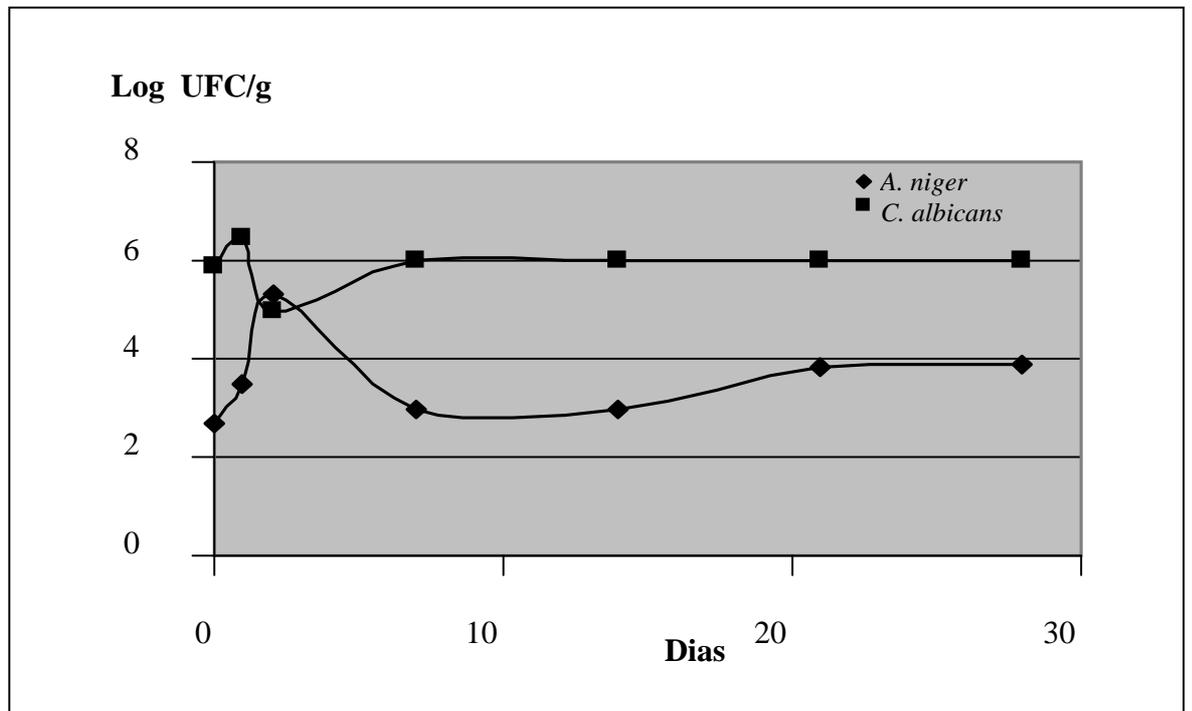


Figura 6 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC/g x dia de fungos para a fórmula sem extrato de *S. terebintifolis* e sem conservantes

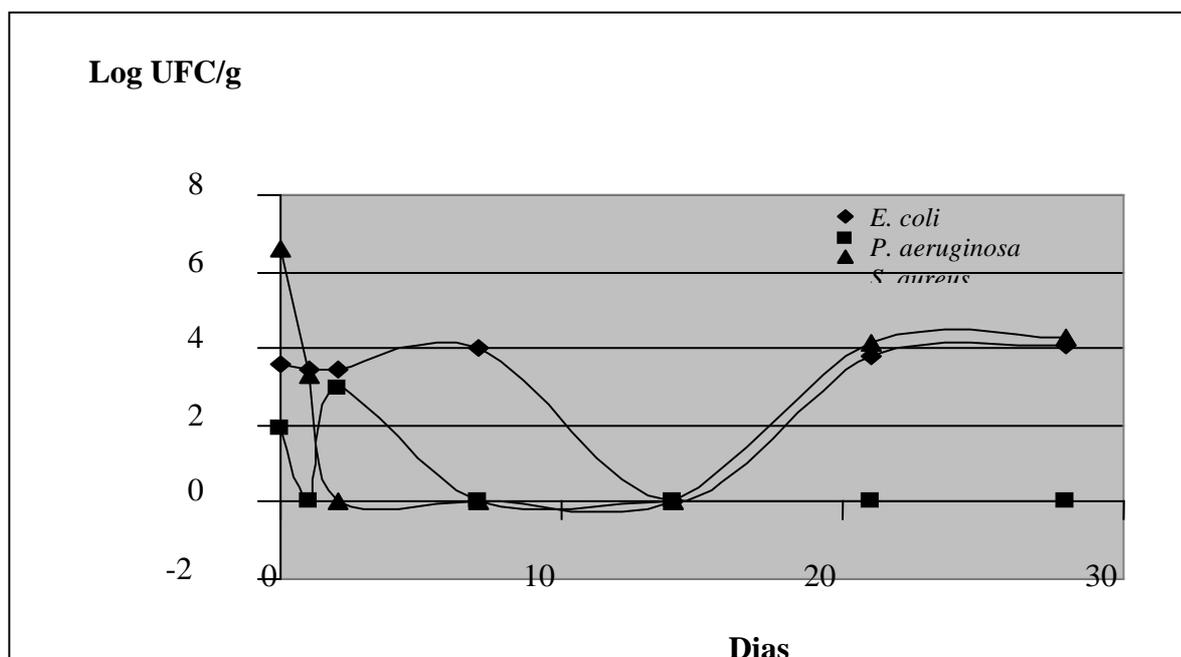


Figura 7 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC/g x dia de bactérias para a fórmula sem conservantes e sem extrato de aroeira

Com relação ao gel com conservantes, verificou-se que houve redução de 2 ciclos logarítmicos para *A. niger* em 14 dias, no entanto não houve redução para *C. albicans* neste mesmo período(Tabela 22). Quanto às bactérias, este gel mostrou-se bem conservado, já que não foi evidenciado nenhum crescimento bacteriano durante todo o período do teste.

Quanto ao comportamento de *A. niger* nesta formulação, verificou-se que houve redução de 2 ciclos em 48 dias e nenhum aumento até os 28 dias. No entanto, resultados mostram que essa formulação não é eficaz para o *C. albicans*. O que pode ser verificado através do gráfico da figura 8 que mostra o perfil de letalidade de fungos em Log UFC x dia em formulação com gel só com conservantes.

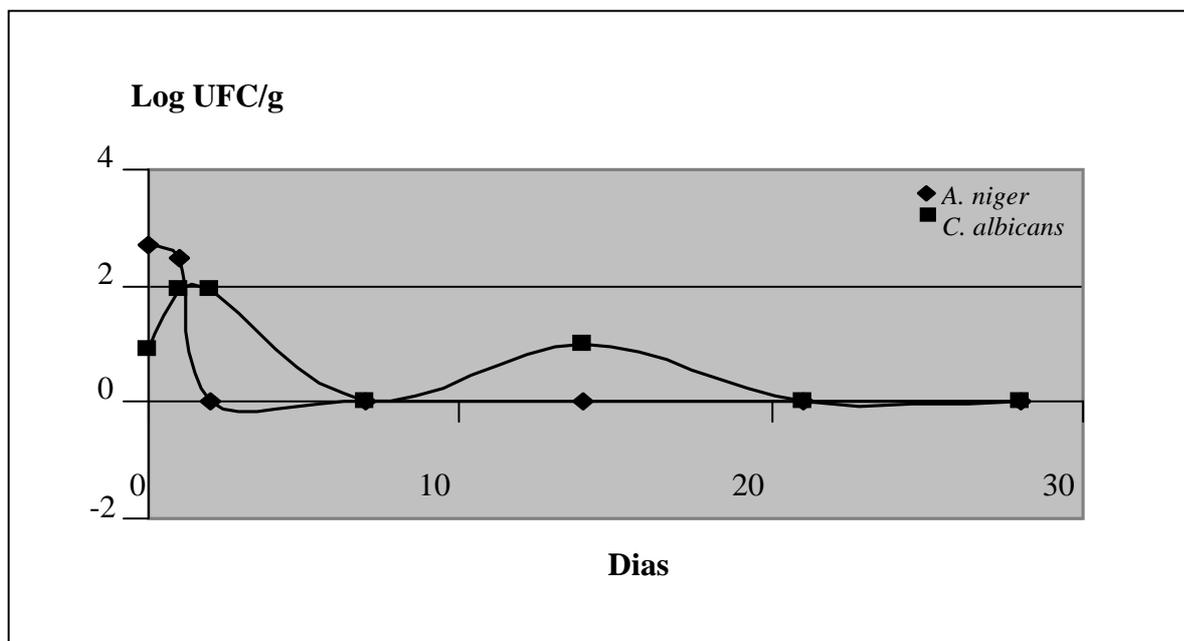


Figura 8 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC/g x dia de fungos para a fórmula sem extrato de *S. terebinthifolius* e com conservantes

Comparando-se os dados experimentais com as normas da Farmacopéia Européia (2002), concluiu-se que o gel só com conservantes apresentou eficácia satisfatória para *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Isto pode ser confirmado na representação em gráfico, o número de sobreviventes no decorrer do tempo de observação (figura 9). Pois para bactérias, na contagem de 24 horas não foram detectados sobreviventes. A exigência oficial é que com dois dias de contato seja constatada a redução de pelo menos 2 ciclos logarítmicos e de 3 ciclos em 7 dias de contado.

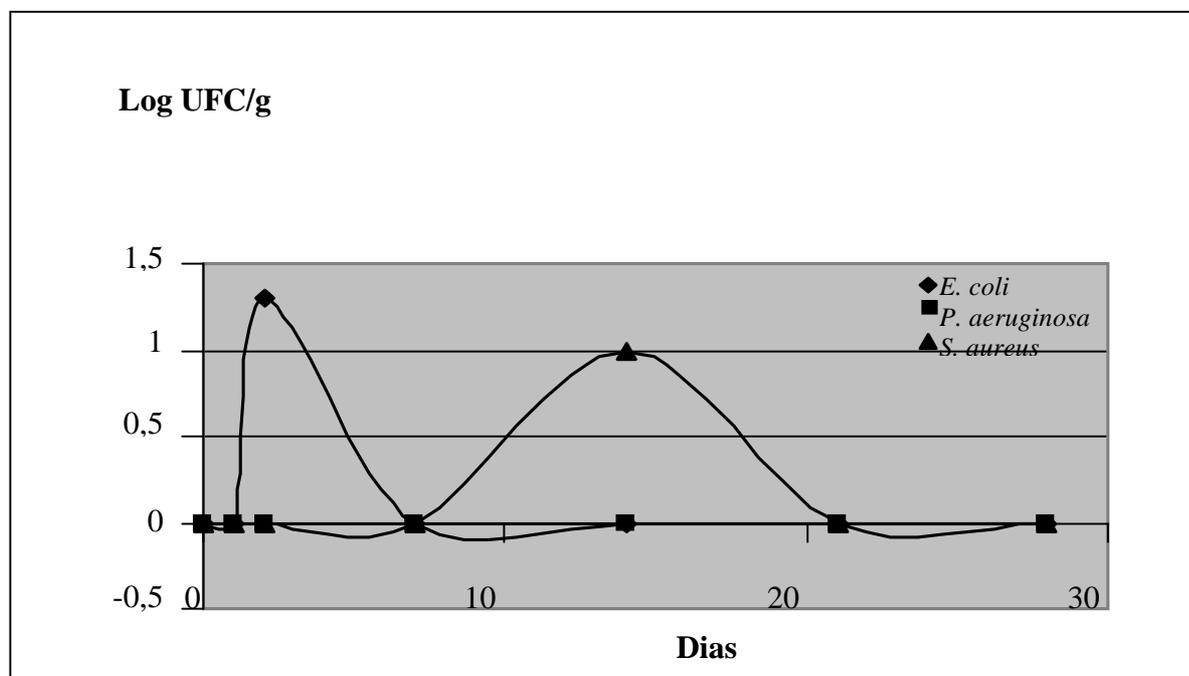


Figura 9 – Perfil das curvas de letalidade Log UFC/g x dia de bactérias para a fórmula sem extrato de *S. tereinthifolis* e com conservantes

De modo geral, esses resultados estão compatíveis com os estudos de Campana *et al.* 2006. Esses autores relataram que as formulações com metilparabeno associado com propilparabeno evidenciaram grande espectro de atividade antimicrobiana frente as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*. Também, estão compatíveis com os resultados obtidos por Guimarães *et al.*, (1982). Segundo esses autores, o resultado do teste do desafio em suspensão de caulim, onde utilizaram uma mistura de metil e propilparabeno, além de ácido sórbico, revelaram em eficácia desse sistema conservante frente as cepas de *A. niger*, *C. albicans* e *S. aureus*.

6. CONCLUSÕES

◆ Os extratos em álcool a 70% promoveram ação conservante, e o de 40% apesar de ocorrer crescimento microbiano, poderá ser utilizado na preparação de fitoterápicos;

◆ Os extratos de cascas pulverizadas submetidas previamente a microondas e autoclave não apresentaram redução de polifenóis e taninos totais;

◆ O teor de taninos totais entre as amostras de cascas não tratadas não apresentou diferença significativa, conforme o teste ANOVA;

◆ O resultado do doseamento de taninos totais entre as amostras de cascas tratadas não apresentou diferença significativa, conforme o teste ANOVA;

◆ O teor de taninos totais entre os grupos de cascas tratadas e não tratadas não apresentou diferença significativa entre si, conforme o teste ANOVA.

◆ Os extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius* não tratado e tratado apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, produzindo halos de inibição em média com 13mm de diâmetro.

◆ O método do teste do desafio permitiu a avaliação do sistema conservante da fórmula com gel de *S. terebinthifolius* em 28 dias do teste. A fórmula foi considerada adequadamente conservada segundo o critério A, preconizado pela Farmacopéia Européia (2002), frente as cepas de *A. niger*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*. Possivelmente, as propriedades antibacterianas do gel de *S. terebinthifolius* foram proporcionadas pela presença de metabólitos secundários da classe dos taninos.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F. **Plantas da medicina popular dos cariris velhos: Paraíba – Brasil espécies mais comuns.** João Pessoa. 1996.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos.** São Paulo: HEMUS, 1993.

ALVES, T. M. A. ; SILVA, A. F. ; BRANDÃO, M. ; GRANDI, T. S. MA. ; SMÂNIA, E. F. A. ; SMÂNIA JR, A. ; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

AMARAL, F.M.M. ; ROSA, L. M. V. ; COUTINHO, D. F. ; GONÇALVES, L. H. ; RIBEIRO, M. N. Qualidade microbiológica das cascas do caulo de *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Grseb. Comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 65-70, 2001.

AMARAL, F.M.M. ; COUTINHO, D.F. ; RIBEIRO, M.N.S. ; OLIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 27-30, 2003.

AMATO NETO, V.; LEVI, G. C. ; LOPES, H. V. ; MENDONÇA, J. S. ; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na prática médica.** 4ª. Ed. São Paulo: Roco. 1994.

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 2, p. 95-102. 2003.

ANDRADE, F.R.O.; SOUZA, A.A.; ARANTES, M.T.F. Análise microbiológica de matérias-primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, V. 2, N. 2, P. 38-44, 2005.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos.** 2004, v. 1, 52 p. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em 20 jun. 2006.

ARIAS, M. E.; GOMEZ, J. D.; CUDMANI, N. M.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill ex Hook et Arn. **Life Science**, v. 75, p. 191-202. 2004a.

ARIAS, M. E.; GOMEZ, J. D.; CUDMANI, N. M.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Formulation and conservation of pharmaceutical form with leaf extracts from *Acacia aroma* Gill ex Hook et Arn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, Supl. 01, p. 30-32. 2004b.

ARRUDA, T. A. ; ANTUNES, R. M. P. ; CATÃO, R. M. R. ; LIMA, E. O. ; SOUSA, D. P. ; NUNES, X. P. ; PEREIRA, M. S. V. ; BARBOSA-FILHO, J. M. ; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 307-311, 2006.

ÁRVORES BRASILEIRAS. Família Anacardiácea. Disponível em:
<<http://www.polmil.sp.gov.br/unidades/cpfm/plantas/aroeira.htm>> Acesso em: 12 maio 2005.

BACCHI, E. M. Ação anti-úlceras e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, 1986.

BAGEL, S.; WIEDEMANN, B. Extension of in-use stability of preservative-free nasal spray. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 353-358. 2004.

BANDEIRA, H. A. H., MOURA, L. C., VIANA, G. S. B., MATOS, F. J. A. Avaliação química e farmacológica do tempo de alteração do extrato hidroalcoólico da entrecasca de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1994, Fortaleza. **Resumo de Temas Diversos**, Fortaleza, 1994, p.252..

BEHRAVAN, J.; BAZZAZ, B. S. F.; MALAEKEH, P. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran (2000). **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 6, p. 482-485. 2005.

BELÉM, L. F.; ARAÚJO, E.; LIMA, E. O. Estudo da atividade *in vitro* de produtos vegetais contra fungos de armazenamento isolados de sementes de *Vigna unguiculata*, *Zea mays* e *Arachis hypogaea*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Programa e Resumos**. Florianópolis, 1996, p. 32.

BOU-CHACRA, N. A.; CORRÊA, C.J.F. ; OHARA, M. T. ; PINTO, T.J. Avaliação de sistemas preservantes por regressão linear. **Cosmetics & Toiletries**, v. 11, p. 44-48, mar/abr. 1999.

BOU-CHACRA, N. A.; PINTO, T.J.; OHARA, M. T. Evaluation of preservative systems in a sunscreen formula by the linear regression method. **Journal of Cosmetic Science**, v. 54, p. 1-7, jan/feb. 2003.

BOU-CHACRA, N. A.; GOBI, S.S.; OHARA, M.T.; PINTO, T.J.A. Atividade antimicrobiana de quatro formulações diferentes de géis dentais em bactérias cariogênicas avaliadas pelo método de regressão linear. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, July/sept. 2005.

BRANDÃO, M. G. L. ; COSENZA, G. P. ; MOREIRA, R. A. ; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 1 de 29 de julho de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 123 de 19 de outubro de 1994. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 481 de 23 de setembro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 48 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 90 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 162 de julho de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.

BUGNO, A. ; BUZZO, A. A. ; NAKAMURA, C. T. ; MATOS, T. C. P. D. ; PINTO, T. J. A. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 4, São Paulo, 2005.

BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE(Hrsg.). **Deutscher Arzneimittel – Codex. 1986**. Frankfurt; Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986. v. 1: Codex – Probe 4, 9.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189. 2000.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais**. Santa Catarina: ARGOS, 2001. p. 297-316.

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

CASTELO BRANCO NETO, M. J. ; SANTOS, O. J. ; RIBAS FILHO, J. M. ; MALAFAIA, O. ; OLIVEIRA FILHO, M. A. ; CZECKO, N. G. ; AOKI, S. ; CUNHA, R. ; FONSECA, V. R. ; TEIXEIRA, H. M. ; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 17-22.2006.

CHAVES, M. C.; RAO, V. S. N.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Avaliação experimental da *Astronium urundeuva* (Aroeira) – Atividade antidiarréica. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza. **Resumo de Temas Diversos**. Fortaleza, 1994, p.261.

CHAPMAN, J. S.; DIEHL, M. A.; FEARNSIDE, K. B. Preservative tolerance and resistance. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 31-39. 1998.

CLEELAND, R. ; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infection. In: Lorian, v. Antibiotics in laboratory medicine. New York: Williams e Wilkins. 1991.

CRÉMIEUX, A.; CUPFERMAN, S.; LENS, C. Method for evaluation of the efficacy of antimicrobial preservatives in cosmetic wet wipes. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 223-236. 2005.

DALL' ÁGNOL, L. ; NASCIMENTO, T. S. R. S. Avaliação da qualidade microbiológica de plantas medicinais, In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos**, Águas de Lindóia, 1998a, p.199.

DALL' ÁGNOL, L. ; ALVES, L. Qualidade das plantas aromáticas comercializadas em Curitiba-PR, In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos**, Águas de Lindóia, 1998b, p.199.

DE CARVALHO, M. C. R. D.; BARCA, F. N. T. V.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, p. 185-191. 2003.

DE CARVALHO, M. C. R. D.; LIMA, L. F. A.; MEDEIROS, S. R. B. Avaliação do potencial mutagênico da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. **Livro de Resumo**. Recife, 2000, p. 214.

DE CURTIS, M. L.; FRANCESCHI, O.; DE CASTRO, N. J. Qualidade microbiológica de cremas y lociones faciales elaboradas em Venezuela. **Revista de la O.F.I.L**, v. 2, n. 4, p. 219-224, 1992.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matéria-primas vegetais In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1999. Cap. 12. p. 263-288.

FARMACOPÉIA AMERICANA. 29^a ed. Validation of microbial recovery . p. 3053-3054, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4 ed. Conatagem de microrganismos viáveis em produtos

que não necessitam cumprir com o teste de esterilidade. V. 5.1.6. 1988.

FARMACOPÉIA EUROPÉIA. 4ªed. Dosage forms. p. 560, 2002

FARMACOPÉIA PORTUGUESA VII: Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 7. ed. p. 470 - 471, 2002.

FAVET, J.; CHAPPUIS, M. L.; DOELKER, E. A case study of preservation of semi-solid preparations using the European Pharmacopoeia test: comparative efficacy of antimicrobial agents in zinc gelatin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 255-259, 2001.

FISCHER, D. C. H. ; OHARA, M. T. ; SEITO, T. Padrão microbiano em medicamentos não estéreis de uso oral. Enquadramento de produtos fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, 1996.

FONTENELE, J.B.; BANDEIRA, M. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Efeitos farmacológicos de *Myracrodruon urundeuvar*. Fr. All.em traquéia e pulmão isolados de cobaias e na agregação plaquetária. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, ---., 1994, Fortaleza. **Resumos e Temas Livres, 13.**, Fortaleza, 1994. p.208.

GALINA, K. J. ; GONÇALVES, R. C. R. ; KIMURA, E. ; DIAS FILHO, B. P. ; ABREU FILHO, B. A. ; MELLO, J. C. P. Avaliação biológica e da qualidade da espécie vegetal *Porophyllum ruderale* (JACQ.) CASS., ASTEREACEAE , In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos**, Águas de Lindóia, 1998, p.201.

GIL, E. S. ; ORLANDO, R. M. ; MATIAS, R. ; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: UNIDERP, 2005. 437p.

GUIMARÃES, E. M. P.; SANTOS, M. M.; BARDUK, O.; PINTO, T. J. A.; BERTUZZI, H. J.; SAITO, T. Eficácia de conservantes em suspensão de caulim. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 18, n. 1, p. 28-38, jan/jun. 1982.

HADACEK, F. ; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choise. **Phytochemical Analysis**, n. 3, v. 11, p. 137-147, 2000.

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

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS. 2ª. Ed. 651p, 1994

HARTKE, K.; MUTSCHLER, E. Deutsches Arzneibuch-9. Augabe 1986. Kommentar. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1986. p. 305-307.

HOFSTRA, H.; VAN DER VOSSEN, J. M. B.; VAN DER PLAS, J. Microbes in food processing technology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 175-183, oct. 1994.

HORIGUCHI, Y.; HONDA, T.; FUJII, S.; MATSUSHIMA, S.; OSAKI, Y. A case of allergic contact dermatitis from propylene glycol in na ultrasonic gel, sensitized at a leakage skin injury due to transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. **The International Society of Dermatology**, v.44, p. 681-683, 2005.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1999. Cap. 11. p. 247-262.

LEAL, L. B.; CAETANO, N.; ARAÚJO, E.; SANTANA, D. P. Preparação e avaliação antimicrobiana de formas geleificadas de uso vaginal da aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Programa e Resumos**, Florianópolis, 1996. p. 154.

LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiano de seu extrato aquoso. **Infarma**, v.16, n. 7-8, 2004.

LUCENA, P. L. H. ; RIBAS FILHO, J. M. ; MAZZA, M. ; CZECZKO, N. G. ; DIETZ, U. A. ; CORREA NETO, M. A. ; HENRIQUES, G. S. ; SANTOS, O. J. ; CESCHIN, A. P. ; THIELE, E. S. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, suppl. , 2, p. 46-51, São Paulo, 2006.

LUSINA, M.; CINDRIC, T.; TOMAIC, J.; PEKO, M.; POZAIC, L.; MUSULIN, N. Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 291, p. 127-137, 2005.

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

MANOU, I.; BOUILLARD, L.; DEVLEESCHOUWER, M. J.; BAREL, A. O. Evaluation of the preservative properties of *Thimus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 368-376, 1998.

MARPLE, B.; ROLAND, P.; BENNINGER, H. Safety review of benzalckonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: An over view of conflicting data and opinions. **Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 130, n. 1, p. 130-141, jan. 2004.

MARTINDALE, W. **British library cataloguing in publication data**. 30nd. ed. London: Pharmaceutical Press, 1993. 2363 p.

MARTINEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; GONZALEZ, N. A.; JAUREGUI, A. Screening of some cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 171-174, 1996.

MARTINS, H. M. ; MARTINS, M. L. ; DIAS, M. I. ; BERNARDO, F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 149-153, 2001.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza: EUFC, 2. ed. 1994. 320p.

MAZZA, M. C. M.; RODIGHIERI, H. R.; MAIA, C. M. B. F.; BAGGIO, A. J.; CURCIO, G. R.; RACHWAL, M. F. G. Potencial de aproveitamento de espécies da submata dos bracingais para uso medicinal. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Programa e Resumo**, Florianópolis, 1996, p. 53.

MEDAL, J. C.; VITORINO, M. D.; HABECK, D. H.; GILLMORE, J. L.; PEDROSA, J. H.; DE SOUSA, L. P. Host specificity of *Heteroperreya hubrichi* Malaise (*Hymenoptera: Pergidae*) a potential biological control agent of Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Biological Control**, v. 14, p. 60-65. 1999.

MEDEIROS, M. G. F. Avaliação de extratos hidroalcoólicos da aroeira do sertão e aroeira da praia (*Astronium urundeuva* Engl. e *Schinus terebinthifolius* Raddi). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998. Águas de Lindóia. **Programa e Resumos**, Águas de Lindóia, 1998, p.203.

MELO Jr., E. J. M.; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J. A.; DINIZ, M. F. A.; MARCELINO Jr., C. A. C.; SANT'ANA, A. E. G. Medicinal plants in the healing of drug socket in rats. Microbiological and Microscopic Analysis **Phytomedicine**, v. 9, p. 109-116, 2002.

MELO, J. G. ; NASCIMENTO, V. T. ; AMORIM, E. L. C. ; ANDRADE LIMA, C. S. ; ALBUQUERQUE, U. F. Avaliação de qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp*) e gínco (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 2004.

MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. N.; GADELHA, M. G. T.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Atividade anti-histamínica e antibradicinina de *Astronium urundeuva* (aroeira). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1994, 13., Fortaleza. **Resumos e Temas Livres**, Fortaleza, 1994, p.26.

MONTEIRO, J. M. ; ALBUQUERQUE, U. P. ; ARAÚJO, E. L. ; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. , 2005.

MOURA, C. L.; SOUZA FILHO, M. V. P.; GOMES, T. N. A.; RIBEIRO, R. A.; VIANA, G. S. B. Efeito do extrato da *Myracrodruon urundeuva* na cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza. **Resumo de Temas Livres**, Fortaleza, 1994, p. 314.

MURRAY, A. P.; FRONTERA M. A.; TOMAS, M. A.; MULET, M. C. Gas chromatography-mass spectrometry study of the essential oils of *Schinus longifolia* (Lindl.) Speg., *Schinus fasciculata* (Grisels) I. M. Johnst., and *Schinus areira* L. Zeitschrift für naturforschung C-A **Journal of Biosciences**, v. 60, n. 1-2, p. 25-29, jan-feb. 2005.

NAQUI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Antibacterial, antifungal and antihelmintic investigation on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 62, n. 3, p. 221-228, 1981.

NOSTRO, A.; CANNATELLI, M. A.; MORELLI, I.; CIONI, P. L.; BADER, A.; MARINO, A.; ALONZO, V. Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with and without EDTA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 385-389, 2002.

OHARA, M. T.; FISCHER, D. C. H.; SAITO, T. Contaminação microbiana em condicionadores de cabelos. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.27, n. 1, p. 28-36, jan/jun. 1991.

OHARA, M. T.; SAITO, T. Medicamentos não estéreis. Contaminação microbiana em soluções para uso oral. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 20, n. 1, p. 17-27, jan/jun. 1984a.

OHARA, M. T.; SAITO, T. Medicamentos não estéreis. Características intrínsecas e contaminação microbiana em soluções para uso oral. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 20, n. 2, p. 158-168, jul/dez. 1984b.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: EDITORA ATHENEU, 1998.

ORTH, D. S.; ECK, K. S. Use of triphenyltetrazolium chloride in preservative efficacy testing. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 56, n. 27, p. 353-353, mai/jun. 2005.

ORUS, P.; LEARANOZ, S. Current trends in cosmetic microbiology. **International Microbiology**, v. 8, p.77-79, 2005.

PISO, G. **História natural e médica da Índia Ocidental**. Trad. Mário Lobo Leal. Rio de Janeiro IMEC/INL, 1957.

PINTO, T. J. A. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 324 p.

PORMIGONI, M. L. O.; CARLINI, E. A. Efeitos dos decoctos de aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e da aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva* Eng) sobre a úlcera

experimental em ratos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, ----, 1990 Salvador. **Resumos e Temas Livres**, 13., Salvador, 1990. p.15.

RAO, V. S.; VIANA, G. S. B.; GADELHA, M. G. T. Estudos toxicológicos com *Astronium urundeuva* (aroeira). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10., 1988. São Paulo. **Programa e Resumos**, São Paulo, 1988, p. 13.

REMILI, H.; BOUSSARD, P.; DEVLEESCHOUWER, M. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plant extrates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 265-268, 1994.

ROCHA, L. O. ; SOARES, M. M. S. R. ; CORRÊA, C. L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cássia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, oct/dec, 2004.

RUIZ, A. R.; DE LA TORRE, R. A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Sreening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 123-127, 1996.

RUSSEL, A. D. Challenge testing: principles and practice. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 25, p. 147-153, 2003.

SANTOS, A. L. R.; CHEN, M. A. C. **Análise microbiológica de águas utilizadas na produção de medicamentos. 1996. 34 f.** Monografia (Especialização em Farmácia Hospitalar) - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 1996.

SANTOS, O. J. ; RIBAS FILHO, J. M. ; CZECKO, N. G. ; CASTELO BRANCO NETO, M. J. ; NAUFEL Jr. , C. ; FERREIRA, L. M. ; CAMPOS, R. P. ; MOREIRA, H. ; PORCIDES, R. D. ; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de aroeira no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, suppl. 2, p. 39-45, 2006.

SANTOS, C. A. M. **Plantas medicinais: herbarium, flora et scientia.** São Paulo: Ícone, 1988.

SANTOS, W. O.; ALVES, P. B.; SOUZA, K. R. Estudo comparativo dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas e frutos da aroeira da praia. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000. Recife. **Livro de Resumos**,. Recife, 2000, p.144.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 563-568, 2005.

SEO, S. B.; RYU, C. S.; AHN, G. W.; KIM, H. B.; JO, B. K.; LEE, J. D.; KAJIUCHI, T. Development of a natural preservative system using the mixture of chitosan- *Inula helenium l.* extract. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, n. 4, p. 195, aug. 2002.

SIMÕES, C. M. ; SCHENKEL, E. P. ; GOSMANN, G. ; MELLO, J. C. P. ; MENTZ, L. A. ; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS EDITORA, 1999. 1102p.

SOUZA, M. R. S. E. L. ; OHARA, M. T.; SAITO, T. Avaliação da eficácia antimicrobiana em emulsões cosméticas para aplicação dérmica. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 30, n.2, p. 55-61, jul/dez. 1994a.

SOUZA, M. R. S. E. L.; OHARA, M. T.; SAITO, T. Contaminação microbiana em emulsões cosméticas para aplicação dérmica. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 30, n. 1, p. 23-28, jan/jun. 1994b.

SOUZA, T.P.; LIONZO, M.I.Z.; PETROVICK, P.R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 94-98, 2006

TIRUMALAI, R. S. **Antimicrobial effectiveness testing**. In: WORKSHOP FEBRAFARMA/U.S. PHARMACOPEIA. VALIDAÇÃO DE TESTES MICROBIOLÓGICOS FARMACOPÉICOS. São Paulo, 2005. p. 3.

TOLEDO, C. E. M. ; SANTOS, F. S. ; MELLO, J. C. P. Controle de qualidade da matéria-prima vegetal *Stryphnodendron adstringens* (MARTIUS) COVILLE, MIMOSACEAE (BARBATIMÃO) , In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos**, Águas de Lindóia, 1998, p.200.

VADAS, E. B. Stability of Pharmaceutical products. In: GENNARO, A. R. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 19nd. ed. Easton, Pennsylvania: MACK Publishing Company, 1995. p. 639-647.

VASCONCELOS, E. A. F. **Caracterização de extrato seco por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi e validação de metodologia analítica para doseamento de taninos totais**. 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN. F.N. ; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de Aerosil ® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 3, p.243-249, 2005.

VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. C. O. ; PIMENTA, A. S. ; DELLA LUCIA, R. .Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. **Revista Árvore**, v. 28, n.4, p. 571-582, 2004. Viçosa-MG.

WHO. **Quality control for medicinal plant materials**. WHO/PHARM/92.559, 1998.

YAMAMOTO, C. H. ; PINTO, T. J. A. ; MEURER, V. M. ; CARVALHO, A. M. Controle de Qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na Zona da Mata, MG. In: ANAIS DO 2º CONGRESSO BRASILEIROS DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DE BELO HORIZONTE, 2. , 2004, Belo Horizonte. **Anais**, Belo Horizonte, 2004.

ZARONI, M. ; PONTAROLO, R. ; ABRAHÃO, W. S. M. ; FÁVERO, M. L. D. ; CORREA JÚNIOR, C. ; STREMEL, D. P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p.29-39, 2004.
ZHI-CEN, L. **General control methods for vegetable drugs**. WHO. p. 71-75, 1980.

ANEXO

MANUSCRITO I: Avaliação da ação antimicrobiana do extrato hidroalcolico de *Schinus terebinthifolius* Raddi - Anacardiaceae

A.L.R. SANTOS, F. N. RAFIN, M.T.B. OLIVEIRA , E.O.LIMA, T. F.A. L. MOURA.

Artigo em preparação para ser submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia

Avaliação da ação antimicrobiana do extrato hidroalcólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae

Ana Lourdes Rodrigues dos Santos, Fernanda Nervo Rafin, Maria Tereza Barreto Oliveira, Edeltrudes Oliveira Lima, Túlio Flávio Aaccioly Lima e Moura.

RESUMO: Este trabalho descreve a avaliação do espectro de ação antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius*, conhecida popularmente como aroeira da praia. É muito utilizada no tratamento de lesões e úlceras de pele e mucosas, infecções do sistema respiratório, sistema digestivo e geniturinário. As cascas utilizadas neste trabalho, foram previamente secas em estufa de ar circulante a 45°C, durante 5 dias e pulverizadas em moinho de facas. Os métodos microbiológicos utilizados foram o de contagem de bactérias e fungos em placa por “por plate” e o da pesquisa de patógenos, conforme a Farmacopéia Brasileira, IV edição, analisando em triplicata cada uma das amostras. E difusão em meio sólido para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcólicos.

Unitermos: *Schinus terebinthifolius* Raddi, atividade antimicrobiana, extrato hidroalcólico.

INTRODUÇÃO:

Schinus terebinthifolius (aroeira), é uma espécie vegetal muito utilizada na medicina popular, sendo o seu uso principal como antiinflamatório dos distúrbios do trato geniturinário feminino (BACCHI, E.M., 1986).

É uma árvore nativa do Brasil, Paraguai e Argentina e foi introduzida nos Estados Unidos no início do século XX, como planta ornamental (Medal *et al.*, 1999). Pode ser encontrada na forma de arbusto ou árvore, com altura que variam de 3 a 10 m. A copa é ovóide no formato e com ramos desenvolvidos (Oliveira; Akisue; Akisue, 1998).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi apresenta ação cicatrizante em feridas cirúrgicas em bexiga, estômago e de pele de ratos, respectivamente (Lucena *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006).

A aroeira tem uso popular por sua ação adstringente, tônica e antinevrálgica, além de possuir atividade inibidora de enzimas, sendo utilizada no tratamento de hiperuricemia, além de atividade antiúlcera (Formigoni & Carlini, 1988; Mazza *et al.*, 1996).

Um dos principais constituintes da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi são os taninos. Os taninos apresentam várias atividades biológicas de caráter antiinflamatório, antibacteriano e antifúngico, além de ação anticarcinogênica e antimutagênica (Simões *et al.*, 1999). Como estão em grande quantidade neste extrato vegetal são considerados como marcadores químicos no controle de qualidade desta espécie (Brasil, 1994).

MATERIAIS E MÉTODOS

Local do trabalho:

O trabalho foi realizado junto aos Laboratórios de Microbiologia do NUPLAM que pertence A Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/ Centro de Ciências da Saúde/ Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Todas as atividades foram executadas durante o período de junho de 2006.

Material vegetal:

As cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi., foram coletadas na região da Mata Atlântica, estado da Paraíba, em agosto de 2005. A espécie foi identificada e registrada no herbário Parque das Dunas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob número tal. COLOCAR O NÚMERO! As cascas foram secas em estufa de ar circulante a 45°C durante 5 dias e pulverizadas em moinhos de facas. Posteriormente as amostras foram trituradas em moinho de facas até obtenção de um pó semi-fino. O extrato não tratado foi preparado com a droga pulverizada sob maceração por 5 dias em álcool a 40%. E os extratos tratados foram preparados com a droga pulverizada previamente submetida a esterilização por autoclave a 121°C durante 15 minutos ou 20 minutos

O extrato hidroalcolico de *Schinus terebinthifolius* apresentou resíduo seco com rendimento de 2,7%, sendo utilizado para os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica, na concentração inicial de 27mg/mL, onde em seguida foram realizadas diluições seriadas na

razão de 2, em água destilada estéril, obtendo-se 13,5; 6,8 e 3,4mg/mL (Amato Neto *et al.*, 1994).

Espécies bacterianas e fúngicas:

Para os ensaios microbiológicos, foram selecionados 12 cepas microbianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC – 13150), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC – 27853), *Escherichia coli* (ATCC – 8739), *Bacillus subtilis* (ATCC – 6633), *Candida albicans* (ATCC – 90028), *Candida tropicalis* (LM – 10), *Candida krusei* (LM – 08), *Candida guilliermondii* (LM – 12), *Trichophyton rubrum* (LM – 640), *Mycrosporium gypseum* (ATCC – 131859), *Aspergillus flavus* (FCF – 126) e *Aspergillus niger*(LM – 05). As cepas bacterianas foram mantidas em ágar Mueller Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud dextrose (fungos) a 4°C.

Meios de cultura

Os ensaios da avaliação de atividade antibacteriana e antifúngica do extrato hidroalcolico foram feitos em ágar Mueller Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud dextrose – ASD (fungos), ambos da DIFCO Laboratório e Comércio. Os mesmos foram preparados conforme as instruções do fabricante.

Suspensão dos microrganismos (inóculo)

O inóculo das bactérias e das leveduras foram obtidos de cepas a partir de repiques de 24 a 48 horas submetidos a temperatura de 35°C. Já o inóculo de fungos filamentosos foram obtidos de cepas a partir de repiques de 7 a 14 dias submetidos a temperatura ambiente. Ambos os inóculos foram preparados em solução fisiológica a 0,9% estéril. As mesmas foram comparadas ao tubo 0,5 da escala Mc Farland, correspondendo, aproximadamente a 10⁶ UFC/mL (Cleeland e Squives, 1991; Greger e Hadaak, 2000; Amato Neto *et al.*, 1994).

Antimicrobianos padrão

Para avaliação dos ensaios de atividade antimicrobiana do produto natural, foi feito um controle com antimicrobianos utilizando discos de cloranfenicol (30µg) e cetoconazol (50µg), obtidos da CECON/SP.

Metodologia: difusão em meios sólido

O ensaio para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico de *Schinus terebinthifolius* foi feito pelo método de difusão em meio sólido, fazendo uso da técnica da cavidade em placa (Cleeland & Squires, 1991; Hadacek & Greeger, 2000; Amato Neto *et al.*, 1994). Em placas de petri (90 x 15 mm) estéreis e descartáveis, foi colocado 1 mL da suspensão de cada microrganismo. Em seguida, foi adicionado aproximadamente, 20mL do ágar Mueller – Hinton (bactérias) e do ágar Sabouraud dextrose (fungos), fundidos a 50°C. Todo o conteúdo foi homogeneizado lentamente e deixado em repouso para solidificação. Sobre o meio solidificado, foram feitas cavidades com cânulas de vidro (8 x 8 mm de diâmetro), onde em seguida, foram colocados 50 µL do extrato solubilizado em suas diferentes concentrações de 27mg/mL; 13,5mg/mL; 6,8mg/mL; 3,4mg/mL. Os discos de cloranfenicol (30µg) e cetoconazol (50µg) foram adicionados ao meio como controles durante o feitió do teste.

Todo sistema do ensaio foi incubado a 35°C por 24 a 48 horas para bactérias e leveduras. Os fungos filamentosos foram incubados em temperatura ambiente por 7 a 14 dias. Os testes foram realizados em duplicatas, e o resultado foi considerado positivo quando o produto inibiu o crescimento do microrganismo produzindo halos de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro (Naqui *et al.*, 1991; Alves *et al.*, 2000). Paralelamente, foi feito controle, consistindo de 50µL do veículo do extrato que foi o álcool a 40%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 4 espécies bacterianas ensaiadas, todas elas foram sensíveis aos extratos hidroalcolicos de *S. terebinthifolius* obtidos de cascas tratadas e não tratadas na concentração de 27mg/mL. Porém a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato, obtido de cascas

tratadas por autoclave a 121°C por 15 min, para *E. coli* e *B. subtilis* foi de 27mg/mL. Os outros extratos de cascas não tratadas e de cascas tratadas por autoclave a 121°C por 20 minutos apresentou uma CIM de 13,5mg/mL para todas as cepas bacterianas utilizadas neste ensaio, como pode ser observado na tabela 1.

Os resultados foram expressos em termos do diâmetro da zona de inibição: < 9mm, inativo; 9-12mm, parcialmente ativo; 13-18mm, ativo; > 18mm, muito ativo (Alves *et al.*, 2000).

Tabela 1: Média dos halos de inibição (mm) da avaliação da CIM do extrato hidroalcolóico de *Schinus terebinthifolius* contra bactérias em meio sólido.

Extratos (mg/mL)		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtili</i>
27	Não tratada	13	13	14	15
13,5		11	12	12	12
6,8		7	10	-	10
3,4		7	7	-	-
27	Autoclave	12	14	10	12
13,5	15 min	11	12	8	8
6,8		10	9	-	-
3,4		8	8	-	-
27	Autoclave	14	14	12	13
13,5	20min	11	11	10	10
6,8		10	10	8	-
3,4		8	7	-	-
Antibiótico	Cloranfenicol	22	17	16	21
o	l				
Etanol a 40%		-	-	-	-

Os extratos hidroalcolóicos de *S. terebinthifolius* Raddi expressaram suas atividades contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, produzindo halos de inibição, em média, com 13mm de diâmetro.

De modo geral, os resultados estão compatíveis com os estudos de Lima *et al.*, (2004), em que estudaram o espectro de ação antimicrobiana do extrato aquoso *S. terebinthifolius*

Raddi frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados obtidos por estes autores mostraram sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outros trabalhos confirmam a sensibilidade de bactérias Gram- positivas e Gram- negativas, conforme os tipos de espécies de Anacardiaceae estudada (Leal *et al.*, 1996).

Leal *et al.*, 1996, verificaram a atividade antiestafilocócica de extratos e do gel de *S. terebinthifolius* Raddi, sendo tais produtos hábeis para produzir halos de inibição, respectivamente de 20 e 10 mm de diâmetro.

Resultado semelhante foi relatado por Martinez *et al.*, (1996), quando testaram a atividade antimicrobiana de 12 espécies de plantas cubanas e a que apresentou melhor atividade contra *S. aureus* foi a *Schinus terebinthifolius*. No estudo desses autores, relataram também que essa atividade não foi devido a presença de etanol presente no extrato. No entanto, não apresentou atividade antifúngica.

Quanto aos resultados da atividade antifúngica frente aos extratos hidroalcológicos de aroeira não tratada e tratada, estão evidenciados na Tabela 2.

Tabela 2: Média dos halos de inibição (mm) da avaliação da CIM do extrato de hidroalcólico de *Schinus terebinthifolius* contra fungos, em meio sólido.

Extratos mg/mL		<i>C.a</i> <i>lbic</i> <i>ans</i>	<i>C.t</i> <i>rop</i> <i>ical</i> <i>is</i>	<i>C</i> <i>kru</i> <i>sei</i>	<i>Cg</i> <i>uill</i> <i>ier</i> <i>mo</i> <i>ndi</i> <i>i</i>	<i>T.r</i> <i>ubr</i> <i>um</i>	<i>M.g</i> <i>ysip</i> <i>ium</i>	<i>A.fl</i> <i>avu</i> <i>s</i>	<i>A.n</i> <i>ige</i> <i>r</i>
27	Não tratada	-	-	-	-	-	-	-	-
13,5		-	-	-	-	-	-	-	-
6,8		-	-	-	-	-	-	-	-
3,4		-	-	-	-	-	-	-	-
27	Autoclave 15 min	-	-	-	-	-	-	-	-
13,5		-	-	-	-	-	-	-	-
6,8		-	-	-	-	-	-	-	-
3,4		-	-	-	-	-	-	-	-
27	Autoclave 20min	-	-	-	-	-	-	-	-
13,5		-	-	-	-	-	-	-	-
6,8		-	-	-	-	-	-	-	-
3,4		-	-	-	-	-	-	-	-
Antifúngico	Cetoconazol	21	20	23	22	18	21	16	15
Etanol a 40%		-	-	-	-	-	-	-	-

Os extratos hidroalcólicos de cascas tratadas e não tratadas de aroeira não apresentam nenhuma atividade antifúngica, já que não houve formação de halo inibitório. Esses resultados estão compatíveis com os estudos de Martinez *et al.*, (1996), em que verificaram que a *S. terebinthifolius* não apresenta ação contra *C. albicans*

No entanto, diferem dos estudos de Schmourlo *et al.* (2005), em que relataram que extratos aquosos de *Schinus terebinthifolius* inibem *Candida albicans*. Além dos estudos de Lima *et al.*,(2004), que relataram ação contra *T. rubrum*, *M. canis*, *E. floccosum* e *C. albicans*

A atividade antimicrobiana do extrato de aroeira neste estudo não foi devido ao etanol, já que não houve formação de nenhum halo de inibição do etanol a 40%, que foi o veículo utilizado neste estudo. Resultado encontrado também por Martinez *et al.*, (1996).

A atividade antibacteriana dos extratos de *S. terebinthifolius* Raddi, possivelmente está associada à presença de certos compostos químicos, em especial de taninos (Matos, 1994). Estes compostos são considerados responsáveis pelas atividades antibacteriana e antiinflamatória, o que confere largo uso desta planta no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias (SIMÕES *et al.*, 1999; BACCHI, E.M., 1986; Melo Jr. *et al.* 2002).

Esses resultados demonstram que a qualidade da matéria-prima para o extrato estava em boas condições de uso. Mas, por outro lado demonstra que não tem nenhuma atividade sobre fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. M. A. ; SILVA, A. F. ; BRANDÃO, M. ; GRANDI, T. S. MA. ; SMÂNIA, E. F. A. ; SMÂNIA JR, A. ; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

AMATO NETO, V.; LEVI, G. C. ; LOPES, H. V. ; MENDONÇA, J. S. ; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na prática médica**. 4ª. Ed. São Paulo: Roco. 1994.

BACCHI, E. M. Ação anti-úlceras e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 123 de 19 de outubro de 1994. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1994.

CLEELAND, R. ; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infection. In: Lorian, v. Antibiotics in laboratory medicine. New York: Williams e Wilkins. 1991.

FORMIGONI, M. L. O.; CARLINI, E. A. Efeitos dos decoctos de aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e da aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva* Eng) sobre a úlcera experimental em ratos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, ---., 1988, São Paulo. **Resumos e Temas Livres**, 13., São Paulo, 1988. p.15.

HADACEK, F. ; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, n. 3, v. 11, p. 137-147, 2000.

LEAL, L. B.; CAETANO, N.; ARAÚJO, E.; SANTANA, D. P. Preparação e avaliação antimicrobiana de formas geleificadas de uso vaginal da aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Programa e Resumos**, Florianópolis, 1996. p. 154.

- LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiano de seu extrato aquoso. **Infarma**, v.16, n. 7-8, 2004.
- LUCENA, P. L. H. ; RIBAS FILHO, J. M. ; MAZZA, M. ; CZECZKO, N. G. ; DIETZ, U. A. ; CORREA NETO, M. A. ; HENRIQUES, G. S. ; SANTOS, O. J. ; CESCHIN, A. P. ; THIELE, E. S. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, suppl. , 2, p. 46-51, São Paulo, 2006.
- MARTINEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; GONZALEZ, N. A.; JAUREGUI, A. Screening of some cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 171-174, 1996.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza: EUFC, 2. ed. 1994. 320p.
- MAZZA, M. C. M.; RODIGHERI, H. R.; MAIA, C. M. B. F.; BAGGIO, A. J.; CURCIO, G. R.; RACHWAL, M. F. G. Potencial de aproveitamento de espécies da submata dos bracatingais para uso medicinal. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Programa e Resumo**, Florianópolis, 1996, p. 53.
- MEDAL, J. C.; VITORINO, M. D.; HABECK, D. H.; GILLMORE, J. L.; PEDROSA, J. H.; DE SOUSA, L. P. Host specificity of *Heteroperreyia hubrichi* Malaise (*Hymenoptera: Pergidae*) a potential biological control agent of Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Biological Control**, v. 14, p. 60-65. 1999.
- MELO Jr., E. J. M.; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J. A.; DINIZ, M. F. A.; MARCELINO Jr., C. A. C.; SANT'ANA, A. E. G. Medicinal plants in the healing of drug socket in rats. Microbiological and Microscopic Analysis **Phytomedicine**, v. 9, p. 109-116, 2002.
- OLIVEIRA, F. ; AKISUE, G. ; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: EDITORA ATHENEU, 1998.
- SANTOS, O. J. ; RIBAS FILHO, J. M. ; CZECKO, N. G. ; CASTELO BRANCO NETO, M. J. ; NAUFEL Jr. , C. ; FERREIRA, L. M. ; CAMPOS, R. P. ; MOREIRA, H. ; PORCIDES, R. D. ; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de aroeira no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, suppl. 2, p. 39-45, 2006.
- SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 563-568, 2005.
- SIMÕES, C. M. ; SCHENKEL, E. P. ; GOSMANN, G. ; MELLO, J. C. P. ; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS EDITORA, 1999. 1102p.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)