

JULIANA MARIA ROCHA E SILVA CRESPO

**APLICAÇÃO DO EXTRATO DA *Allamanda cathartica* L.,
NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA, PARA
ANTISSEPSIA DAS MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C921d
2012

Crespo, Juliana Maria Rocha e Silva, 1972-

Desenvolvimento de formulação fitocosmética à base de extrato de *Allamanda cathartica* L. para antissepsia de mãos de manipuladores de alimento. / Juliana Maria Rocha e Silva Crespo. – Viçosa, MG, 2012.

xiv, 65f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Paulo César Stringheta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 57-65.

1. Cosméticos - Biotecnologia. 2. Cosméticos de ervas.
 3. *Allamanda cathartica*. 4. Manipuladores de alimentos.
 5. Alimentos - Contaminação. 6. Segurança alimentar.
 7. Segurança nutricional. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22. ed. 615.2

JULIANA MARIA ROCHA E SILVA CRESPO

**APLICAÇÃO DO EXTRATO DA *Allamanda cathartica* L.,
NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA, PARA
ANTISSEPSIA DAS MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de fevereiro de 2012.

Tânia Toledo de Oliveira

Afonso Mota Ramos

Nélio José de Andrade
(Coorientador)

Miriam Aparecida Oliveira Pinto
(Coorientadora)

Paulo César Stringheta
(Orientador)

**Aos meus amados filhos,
Maria Clara e Bernardo,
fontes de amor, carinho e apoio
em todos os momentos da minha vida.**

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou

Construir um castelo...

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar no caminho do bem e me fazer acreditar... “confie Nele e Ele tudo fará”.

Agradeço à minha mãe e ao meu pai, Joana e Luiz, por sempre me incentivarem a trilhar os caminhos da ciência, mesmo quando obstáculos os obstruíam. Muito obrigada!

Aos meus filhos queridos, Maria Clara e Bernardo, razão da minha vida, obrigada pelos beijinhos, carinhos e sorrisos nos momentos de difícil caminhada e por terem suportado minha ausência para dedicação a esse projeto.

Ao meu marido, Marcelo, um obrigado especial pela paciência, dedicação e incentivo nessa jornada que, no princípio, parecia impossível de ser concluída. Obrigada!

Aos meus irmãos Leonardo e Otávio pela eterna amizade, companheirismo, amor, apoio, conselhos e torcida, e às minhas cunhadas Elaine e Rafaela pela amizade.

Agradeço, ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Stringheta, pela amizade, paciência, dedicação e valiosa orientação, nessa jornada.

Agradeço aos Professores Doutores Nélio Andrade e Míriam Aparecida de Oliveira Pinto, meus co-orientadores, que contribuíram substancialmente para melhorias neste trabalho.

Agradeço ao Anderson Rodrigo da Silva pela gentil contribuição no delineamento estatístico do experimento.

Um obrigado especial aos professores da FAMINAS Adriana Freitas, Samuel Ferreira, Alexandre Bittencourt e Micheline Lopes, pelo incentivo e auxílio na concretização deste trabalho.

Agradeço imensamente à doutoranda Patrícia Érika e às estagiárias Lorena e Flávia, pela preciosa colaboração na realização deste trabalho. Muito obrigada!

Muito obrigada ao meu orientado de TCC e agora colega farmacêutico Felipe Moreira, pela ajuda nas análises físico-químicas do produto.

Agradeço ao meu também ex-aluno e agora colega farmacêutico Wellington Braga, pela ajuda nas análises farmacognósticas desse trabalho.

A todos os meus alunos da FAMINAS, pelo incentivo à melhoria contínua.

A todos os meus novos colegas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, pela amizade e convivência agradável.

Um obrigado muito especial aos meus treze voluntários na análise de uso simulado, Flávia, Renam, Viviane, Jéssica, Beatriz, Angélica, Lívia, Valério, Juliana, Mariana, Renata, Célio e Paulo Henrique, pela preciosa contribuição durante as sete semanas de análise.

À Fernanda, minha prima e amiga que sempre me incentivou, obrigada pelo carinho e amizade.

Aos meus tios Gérson e Maria Alice, obrigada pela amizade, carinho, paciência e apoio incondicional.

A Alessandra, minha prima, obrigada pelo apoio e amizade.

Aos meus padrinhos, Evandro e Valéria e à Tia Lídia, que sempre demonstraram orgulho pelo meu trabalho.

A minha querida avó Nair, aonde quer que esteja, pelo amor que sempre me dedicou e por estar, de algum modo, sempre ao meu lado.

A todos os funcionários do DTA, pelo auxílio na concretização deste trabalho.

Enfim, meu muito obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste projeto.

BIOGRAFIA

JULIANA MARIA ROCHA E SILVA CRESPO, filha de Luiz Gonzaga da Silva e Joana D`Arc Rocha e Silva, nasceu em Muriaé, Minas Gerais, em 27 de maio de 1972.

Em 1990, iniciou o curso de Farmácia e Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora, graduando-se em 1994 como Bacharel em Farmácia e Bioquímica, em Farmácia Industrial e em Análises Clínicas.

Trabalhou no segmento de farmácia de 1994 a 2011, como sócia-proprietária e diretora farmacêutica de um grupo de farmácias magistrais.

Em 2003, recebeu o título de especialista em Farmácia Magistral Alopática, pela ANFARMAG — Associação Nacional de farmacêuticos Magistrais.

Em 2006, ingressou na área acadêmica, como professora do Curso de Farmácia da Faculdade de Minas — FAMINAS, em Muriaé, Minas Gerais.

Em agosto de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação, *strictu sensu*, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 03 de fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	04
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3.1 A higienização das mãos como fator de controle da contaminação na indústria de alimentos	05
3.2 Plantas medicinais como fonte de novos fármacos: o potencial da <i>Allamanda cathartica</i> L.....	06
3.3 A descoberta de novos agentes antimicrobianos	09
3.4 Os fitocosméticos.....	11
3.5 Ensaio físico-químico de estabilidade de fitocosméticos.....	12
3.6 Testes microbiológicos para avaliação de atividade antimicrobiana de produtos sanificantes.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Matéria-prima.....	17
4.2 Obtenção do extrato fluido da <i>Allamanda cathartica</i> L.....	17
4.3 Análise farmacognóstica e triagem fitoquímica.....	18
4.4 Desenvolvimento da formulação fitocosmética.....	21
4.5 Testes de estabilidade da formulação fitocosmética.....	23
4.5.1 Teste da Centrífuga.....	24
4.5.2 Teste de estabilidade preliminar.....	24
4.5.3 Teste de estabilidade acelerada.....	25

4.5.4	Análises dos parâmetros de estabilidade.....	26
4.5.4.1	Aspecto.....	26
4.5.4.2	Cor.....	26
4.5.4.3	Odor.....	26
4.5.4.4	pH.....	26
4.5.4.5	Densidade.....	27
4.5.4.6	Viscosidade.....	27
4.5.5	Análise estatística.....	28
4.6	Controle de qualidade microbiológico.....	28
4.6.1	Preparo da amostra.....	28
4.6.2	Contagem do número total de micro-organismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras.....	28
4.6.3	Pesquisa de micro-organismos patogênicos.....	29
4.6.3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
4.6.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
4.6.3.3	Coliformes totais e termotolerantes.....	29
4.7	Avaliação da atividade anti-séptica do extrato glicólico de <i>Allamanda cathartica</i> e do produto fitocosmético contendo esse extrato.....	30
4.7.1	Teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar.....	30
4.7.1.1	Preparo do meio.....	31
4.7.1.2	Preparo do inóculo.....	31
4.7.1.3	Inoculação das Placas-Teste.....	31
4.7.1.4	Determinação dos halos de inibição das dispersões diante das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	32
4.7.1.5	Análise estatística.....	32
4.7.2	Teste de uso simulado, pela avaliação da eficiência do sabonete líquido com o extrato de <i>Allamanda cathartica</i> , sobre suspensões bacterianas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , aplicadas nas mãos de voluntários.....	33
4.7.2.1	Preparo das suspensões bacterianas.....	33

4.7.2.2 Procedimento padronizado para limpeza das mãos dos voluntários.....	34
4.7.2.3 Aplicação das suspensões nas mãos dos voluntários.....	34
4.7.2.4 Aplicação das amostras.....	34
4.7.2.5 Avaliação da eficiência das amostras.....	34
4.7.2.6 Análise dos resultados.....	36
4.7.2.7 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Análises de controle de qualidade físico-química do extrato glicólico de <i>Allamanda cathartica</i>	37
5.2 Análise Farmacognóstica e Triagem Fitoquímica.....	38
5.3 Análises de controle de qualidade microbiológica do sabonete líquido contendo o extrato glicólico de <i>Allamanda cathartica</i> L. a 3%.....	40
5.4 Testes de estabilidade da formulação fitocosmética.....	41
5.5 Avaliação da atividade antisséptica do extrato puro de <i>Allamanda cathartica</i> e do sabonete líquido contendo o mesmo extrato.....	48
5 CONCLUSÃO.....	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição das matérias-primas, funções e respectivas concentrações dos componentes nas formulações.....	22
Tabela 2	Resumo dos resultados das análises de controle de qualidade físico-químico do extrato glicólico de <i>Allamanda cathartica</i>	37
Tabela 3	Resumo dos resultados da análise farmacognóstica da <i>Allamanda cathartica</i> L.	39
Tabela 4	Resumo dos resultados das análises de controle de qualidade microbiológica do sabonete líquido contendo EGAC a 3%.....	40
Tabela 5	Evolução da densidade, pH e viscosidade medidos durante os 60 dias de estudo da estabilidade do sabonete líquido contendo EGAC a 3%, em 5 diferentes condições de exposição de temperatura.....	43
Tabela 6	Resumo da análise de variância para as variáveis densidade, pH e viscosidade.....	44
Tabela 7	Resumo da análise de variância para a variável tamanho do halo (em cm) de <i>Staphylococcus aureus</i> e de <i>Escherichia coli</i> , após contato com os produtos contendo o EGAC.....	49
Tabela 8	Comparações entre médias de tamanho do halo (em cm) das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , após contato com os produtos contendo o EGAC.....	49
Tabela 9	Resumo da análise de variância para as variáveis reduções logarítmicas de <i>Staphylococcus aureus</i> e de <i>Escherichia coli</i> , após o teste em uso simulado.....	51
Tabela 10	Comparações entre médias de ciclos de reduções logarítmicas das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , após o teste em uso simulado.....	51
Tabela 11	Resumo das médias de tamanho do halo de inibição (em cm) das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Escherichia coli</i> , frente ao extrato puro de <i>Allamanda cathartica</i> L..	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Flor da <i>Allamanda cathartica</i> L.....	08
Figura 2	Estrutura química do plumerídeo da <i>Allamanda cathartica</i> L.....	09
Figura 3	Metodologia do <i>swab</i> para coleta em superfícies de mãos.....	35
Figura 4	Dispersão dos valores de densidade em função do tempo de avaliação, em 5 diferentes temperaturas.....	44
Figura 5	Dispersão dos valores de pH em função do tempo de avaliação, em 5 diferentes temperaturas.....	45
Figura 6	Dispersão dos valores de viscosidade em função do tempo de avaliação, em 5 diferentes temperaturas.....	45
Figura 7	Dispersão dos valores de tamanho de halo (em cm) das espécies <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , em função da concentração do extrato glicólico de <i>Allamanda cathartica</i> L. no sabonete líquido proposto.....	50
Figura 8	Imagem do halo de inibição contra <i>S. aureus</i> , utilizando-se as três concentrações do EGAC no sabonete líquido.....	50
Figura 9	Imagem do halo de inibição contra <i>E. coli</i> , utilizando-se o EGAC....	53

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

DOU – Diário Oficial da União

DTA – Departamento de Tecnologia de Alimentos

EGAC – Extrato glicólico de *Allamanda cathartica* L.

FB – Fórmula base

GEAC – Glycolic extract of *Allamanda cathartica* L.

LESS – Lauril Éter Sulfato de Sódio

RD – Reduções decimais

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RPM – Rotações por minuto

SAS – Statistical Analysis System

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UFV – Universidade Federal de Viçosa

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

USP – Universidade de São Paulo

WHO – World Health Organization

RESUMO

CRESPO, Juliana Maria Rocha e Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Aplicação do extrato da *Allamanda cathartica* L., no desenvolvimento de formulação fitocosmética, para antissepsia das mãos de manipuladores de alimentos.** Orientador: Paulo César Stringheta. Coorientadores: Miriam Aparecida Oliveira Pinto e Nélio José de Andrade.

A antissepsia das mãos de manipuladores de alimentos pode ser considerada um aspecto fundamental para a redução da microbiota presente em ambiente de processamento de alimentos, garantindo, assim, a segurança alimentar. Nesse contexto, a busca de produtos naturais com atividade antimicrobiana tem motivado a realização de pesquisas para o desenvolvimento de formulações fitocosméticas ou saneantes que possam ser utilizados na indústria de alimentos e em serviços de alimentação, com o objetivo de reduzir a incidência de enfermidades veiculadas por alimentos e as perdas por deterioração. A espécie *Allamanda cathartica* L., pertencente à família *Apocynaceae*, também conhecida como alamanda-amarela, é nativa da Mata Atlântica brasileira. Possui flavonoides e cumarinas, dentre outros metabólitos secundários primordiais, possíveis responsáveis por sua atividade farmacológica. A atividade antimicrobiana do extrato glicólico da *Allamanda cathartica* L. (EGAC) e a atividade antisséptica do sabonete líquido contendo o extrato foram avaliadas pelo método de difusão em ágar e pela avaliação da atividade por uso simulado do produto. Tanto o EAC, quanto o sabonete líquido contendo o mesmo extrato apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* no teste de difusão em ágar. No teste de uso simulado, o sabonete líquido contendo o EGAC apresentou resultados similares ao controle positivo, representado por um sabonete líquido contendo triclosan a 1%. Os resultados da análise demonstraram níveis satisfatórios de redução decimal frente às mesmas bactérias. O produto também foi avaliado quanto à sua estabilidade físico-química, durante 60 dias de análise e submetido a cinco temperaturas diferentes, mostrando-se estável em relação às variáveis pH, densidade, viscosidade, aspecto, cor e odor, com coeficiente de variação menor que 10%, em relação às médias dos valores encontrados para as variáveis descritas.

ABSTRACT

CRESPO, Juliana Maria Rocha e Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Antiseptic activity evaluation of the extract of *Allamanda cathartica* L., in phytocosmetic formulation development, for antiseptics of the hands of food handlers.** Adviser: Paulo César Stringheta. Co-advisers: Miriam Aparecida Oliveira Pinto and Nélio José de Andrade.

The antiseptics of the hands of food handlers can be considered a fundamental aspect for the reduction of microbial flora present in the food processing environment, thus ensuring food security. In this context, the search for natural products with antimicrobial activity has motivated us to conduct researches to develop phytocosmetics or sanitizing formulations that can be used in the food industry and food services, in order to reduce the incidence of diseases transmitted by food and impairment losses. *Allamanda cathartica* L. specie belonging to the family *Apocynaceae*, also known as yellow allamanda, is native to the Brazilian Atlantic Forest. It has flavonoids and coumarins, among other main secondary metabolites, possibly responsible for its pharmacological activity. The antimicrobial activity of glycolic extract of *Allamanda cathartica* L. (GEAC) and the activity of the antiseptic liquid soaps containing its extracts were evaluated by agar diffusion method and by the evaluation of the activity for simulated use of the product. Both the GEAC, as the liquid soap containing the same extract showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in the agar diffusion test. The simulated use of the the liquid soap containing GEAC showed similar results to the positive control represented by a liquid soap containing 1% triclosan. The analysis results showed satisfactory decimal reduction levels front of the same bacterias. The product was also evaluated for its physical and chemical stability during 60 days of analysis and subjected to five different temperatures, showing stable with respect to pH, density, viscosity, appearance, color and odor, with a coefficient of variation less than 10%, in terms of average values for the variables described.

1 INTRODUÇÃO

A busca de produtos naturais, com atividade antimicrobiana, tem motivado a realização de pesquisas para o desenvolvimento de formulações fitocosméticas ou saneantes que possam ser utilizados na indústria de alimentos e em serviços de alimentação, com o objetivo de reduzir a incidência de intoxicações veiculadas por alimentos e as perdas por deterioração.

Há indícios do uso de plantas capazes de produzir efeito terapêutico no tratamento de doenças, desde a era paleolítica, comprovados por achados antropológicos, paleontológicos, arqueológicos e por estudos das tradições de diversos povos (CASTRO, 1981). Entretanto, foi a partir do século XIX que se iniciou a procura pelos princípios ativos das plantas, iniciando-se a produção de medicamentos a partir de plantas medicinais (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

As plantas usadas na medicina popular são importantes para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas, também, como matérias-primas para a síntese ou protótipos de compostos farmacologicamente ativos (BRASIL, 2009).

Uma pesquisa realizada em 2007, nos EUA, revelou que 42% da população utilizara plantas medicinais pelo menos uma vez, no ano anterior, como alternativa aos tratamentos médicos. Esse percentual foi 33,3% maior em relação ao resultado obtido pela mesma pesquisa em 1997 (FUNARI, 2005).

A definição de planta medicinal pela OMS — Organização Mundial da Saúde é: “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”.

A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta, para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. De acordo com a SVS/MS, em sua portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é:

"todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente.

Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas".

Neste último caso, define-se o fitofármaco, que é "a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal".

O uso de ingredientes de origem natural em cosméticos ganhou popularidade e, dentre eles, podem ser citados os extratos vegetais, óleos vegetais, óleos essenciais e seus derivados que, incorporados nas formulações, agregam bioatividade, funcionalidade e apelo de *marketing* (ISAAC *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana é uma das propriedades das plantas medicinais mais pesquisadas na atualidade, uma vez que um dos maiores problemas de Saúde Pública, enfrentados nas últimas décadas, foi o agravamento da resistência bacteriana (ALVES; UENO, 2010).

No Brasil, deve-se enfatizar a busca de novos agentes antimicrobianos de origem vegetal, uma vez que o país dispõe da maior biodiversidade de flora do planeta. Ademais, muitas plantas já vêm sendo vastamente utilizadas e testadas há centenas de anos, com as mais diversas finalidades, por populações do mundo inteiro (FERRONATTO *et al.*, 2007).

Em locais onde há responsáveis que zelam pela saúde da população como, por exemplo, em serviços de alimentação, a garantia da qualidade é prioridade, uma vez que a cada dia, acentua-se o hábito da população urbana em realizar suas refeições fora do lar (SILVESTRIN, 2007).

Portanto, para evitar a ocorrência de doenças de origem alimentar, ações preventivas devem ser desenvolvidas, visando à segurança do consumidor. Nesse sentido, o manipulador de alimentos, estando doente ou sendo portador assintomático de alguma bactéria patogênica, é o responsável por até 26 % dos surtos de enfermidades bacterianas veiculadas por alimentos, por apresentar hábitos higiênicos inadequados ou, ainda, pelo uso de métodos anti-higiênicos na preparação dos alimentos (ALVES; UENO, 2010). O hábito de lavar e, posteriormente, desinfetar as mãos é uma das ações preventivas de melhor resultado. Por isso, é imprescindível a orientação e treinamento dos manipuladores, no sentido de se estabelecer este hábito durante todo o processo de manipulação dos alimentos (AKUTSU *et al.*, 2005).

A antissepsia das mãos, antes da manipulação de alimentos e, principalmente, após qualquer interrupção, é indispensável para o controle higiênico-sanitário dos alimentos prontos para o consumo. Assim, pela grande frequência desse procedimento, espera-se que o uso de um bom produto antisséptico, com princípio(s) ativo(s) de origem

vegetal, que garanta a higiene e, ao mesmo tempo, mantenha a hidratação e emoliência necessárias à integridade da pele, será de grande importância para uso em estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos.

2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um sabonete líquido com atividade antisséptica contendo, como princípio ativo, o extrato glicólico da *Allamanda cathartica* L. (EGAC), para uso na antissepsia das mãos de trabalhadores de restaurantes e estabelecimentos industrializadores de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os constituintes fitoquímicos bioativos da *Allamanda cathartica* L., através da análise farmacognóstica do extrato seco da planta;
- Estimar a atividade antibacteriana do EGAC;
- Desenvolver a formulação de um produto fitocosmético — Sabonete líquido antisséptico — contendo, como princípio ativo, o EGAC;
- Realizar os testes de controle de qualidade físico-químicos e microbiológicos do produto fitocosmético, conforme exigência da Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, da ANVISA;
- Realizar os testes de estabilidade físico-química para produto fitoterápico, exigidos e descritos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA;
- Determinar a atividade antibacteriana do sabonete líquido contendo, como princípio ativo, o EGAC, através do teste de difusão em ágar;
- Avaliar a eficiência do sabonete líquido com EGAC sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, aderidas nas mãos de voluntários.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A higienização das mãos como fator de controle da contaminação na indústria de alimentos

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento das DTA, relacionado a diversos fatores, como a expansão do comércio alimentar, o aumento do consumo de alimentos industrializados ou semiprontos, modificações dos hábitos alimentares e o aumento das refeições fora do domicílio. As fontes de contaminação desses alimentos podem ser o solo, a água, as plantas, a pele dos animais, o ar, a poeira e os utensílios, que devem passar por uma higienização adequada, para evitar a contaminação cruzada. Entretanto, os principais responsáveis pela contaminação alimentar e, conseqüentemente, as infecções, são os agentes biológicos representados, em sua maioria, por bactérias e parasitos intestinais (CUSTÓDIO, 2009; MUNDY, 2008).

Os serviços de alimentação coletiva vêm aumentando, cada vez mais, em todo o mundo, inclusive no Brasil. Os profissionais envolvidos nesses serviços desempenham importante função na preservação da higiene (SILVA *et al.*, 2005). De acordo com a inspeção sanitária, é considerado manipulador qualquer indivíduo que esteja em contato direto ou indireto com os alimentos.

A higienização dos manipuladores de alimentos é essencial para a produção segura e inócua de qualquer tipo de produto alimentício. Existem muitos casos de doenças de origem alimentar apontadas, atualmente, pela Organização Pan-americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde como causas importantes na perda de vidas humanas (LIMA, 2007).

A importância da transmissão de doenças infecciosas, pelas mãos de manipuladores, foi demonstrada, há 120 anos, por Semmelweis. Mas foi Price (1938), *apud* Crisley e Foter (1965), quem realmente estudou os tipos de bactérias na pele, classificando-as em microbiota residente e a transitória. A microbiota residente que se multiplica, persistindo sobre a pele, é mais difícil de ser removida e, normalmente, não está associada a infecções cruzadas. Localiza-se, em torno das unhas, em maior quantidade. Cerca de 10 a 20% encontra-se nas fendas das mãos ou no interior dos folículos pilosos, onde os lipídeos e os epitélios superficiais podem dificultar sua remoção. Já a microbiota transitória é constituída por micro-organismos depositados sobre a pele, sem que ocorra colonização, sendo responsável por transportar patógenos em serviços hospitalares e de alimentação coletiva, por meio de mãos contaminadas

(ALMEIDA *et al.*, 1995). A microbiota transitória localiza-se na superfície da pele, junto às gorduras e sujidades, portanto, é de mais fácil remoção pela lavagem das mãos e é, frequentemente, adquirida pelo contato das mãos com superfícies contaminadas (MUNDY, 2008; SILVESTRIN *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado a eficácia do uso de antissépticos na higienização das mãos de manipuladores de alimentos (STILES; SHEENA, 1987). Demonstrou-se, também, que, em condições normais, a microbiota da pele é completamente restabelecida em uma semana após a antissepsia. Por esta razão, é recomendável a utilização de germicidas com efeito residual prolongado, porém, não irritantes para a pele (GIBSON *et al.*, 2002; ROTTER *et al.*, 2009; SHEENA; STILES, 1987).

Um dos aspectos principais no controle higiênico-sanitário dos alimentos é a higienização das mãos dos manipuladores. Nesse sentido, as etapas, a frequência e os princípios ativos usados para a lavagem e antissepsia das mãos dos profissionais envolvidos no preparo, armazenamento e distribuição dos alimentos devem estar documentados em procedimentos operacionais, assim como as medidas adotadas nos casos em que os manipuladores apresentem lesão nas mãos, sintomas de enfermidade ou suspeita de problema de saúde que possa comprometer a segurança do alimento. É o que prevê a RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, da ANVISA (AKUTSU, 2005; BRASIL, 2004; BRASIL, 2002). Dados relatados pelo "Center for Disease Control" relativos a surtos de toxinfecções alimentares nesses serviços, nos EUA, apontam o manipulador de alimentos como responsável por 25 % desses surtos (GIBSON *et al.*, 2002; ROTTER *et al.*, 2009).

A antissepsia das mãos se constitui, portanto, num aspecto fundamental para a redução da microbiota presente nas mãos dos manipuladores de alimentos nos ambientes de processamento e, conseqüentemente, para garantia da segurança alimentar (LITZ, *et al.*, 2007).

3.2 Plantas medicinais como fonte de novos fármacos: o potencial da *Allamanda cathartica* L.

O emprego de plantas capazes de produzir efeitos terapêuticos no corpo humano é tão antigo quanto a própria humanidade. Investigações antropológicas, paleontológicas e arqueológicas, bem como os estudos das tradições populares comprovam que remotos ancestrais do homem utilizavam plantas no tratamento de doenças (LOPES *et al.*, 2008). Assim, por um longo tempo, produtos minerais, animais e vegetais foram a principal fonte de fármacos, contribuindo para o desenvolvimento da terapêutica moderna (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008; FUNARI; FERRO, 2005; SOUZA *et al.*, 2007).

O maior obstáculo ainda existente para a utilização terapêutica de produtos naturais ou seus derivados, no tratamento convencional de diversas doenças, é a falta de dados científicos que comprovem a sua eficácia e segurança. Mesmo com esse fator importante, verificou-se, nas últimas décadas, um grande interesse do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais. Embora a preferência das grandes indústrias farmacêuticas continuasse sendo pelo desenvolvimento de medicamentos pela via sintética, muitas drogas existentes, atualmente, são análogos sintéticos desenvolvidos a partir de produtos naturais (SILVA, 2007; CALIXTO *et al.*, 2005; FUNARI; FERRO, 2005).

Nesse sentido, o Brasil, com sua privilegiada biodiversidade, possui uma das mais ricas floras do mundo, detendo cerca de 25% do total de espécies existentes no planeta. Daí, o seu enorme potencial para o mercado mundial de medicamentos. A carência de estudos e pesquisas existentes, justifica a busca de maior desenvolvimento nessa área (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008; FUNARI; FERRO, 2005; GUERRA; NODARI, 2001).

A utilização de plantas na formulação de medicamentos requer estudos mais aprofundados, especialmente com relação aos metabólitos secundários que cada espécie produz, em geral como mecanismos essenciais para a sobrevivência da espécie, para atrair polinizadores, como mecanismo de defesa contra fungos e predadores ou, também, para contribuir para a competitividade contra espécies invasoras (SILVA, 2007).

Dentre as inúmeras espécies vegetais utilizadas na medicina popular brasileira está a *Allamanda cathartica* L. (Figura 2), pertencente à família *Apocynaceae* (Sinonímia: *Allamanda hendersonii* Bull. ex Dombrain), cujos nomes populares mais conhecidos são alamanda, alamanda-amarela, carolina ou dedal-de-dama (LORENZI; SOUZA, 1999). Foi catalogada no ano de 1771, por Carl Linnaeus, e encontra-se registrada no Herbário Internacional de Berlim, sob o número 4.831. Espécies pertencentes a este gênero são trepadeiras, comuns nas regiões mais quentes do Brasil (SILVA, 2007).



Figura 1 - *Allamanda cathartica* L. em floração.

Fonte: a autora

A *Allamanda cathartica* L. caracteriza-se por ser um subarbusto trepador lactescente, semilenhoso; folhas simples, subcoriáceas, glabras em ambas as faces; flores amarelas, reunidas em pequenos fascículos terminais; frutos do tipo cápsula e com poucas sementes. Floresce, principalmente, na primavera e no verão. É nativa de formações florestais de domínio atlântico do litoral norte, nordeste e leste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002; LORENZI; SOUZA, 1999; STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Espécies pertencentes ao gênero *Allamanda* possuem metabólitos secundários com expressiva atividade farmacológica, como os iridoídes, flavonoides, cumarinas e terpenoides. As flores da *Allamanda cathartica* apresentam flavonoides como metabólitos secundários principais (LORENZI; MATOS, 2002).

O uso etnofarmacológico da *Allamanda cathartica* L. descreve a utilização de diversas partes da planta. O látex é usado externamente na medicina caseira, em algumas regiões do país, para a eliminação de piolhos e sarna. A infusão das folhas é empregada como anti-helmíntico, emético e purgativo. Atribuem-se, às cascas, as mesmas atividades das folhas, acrescentando-se o seu uso no tratamento de tumores hepáticos. As flores e raízes são utilizadas em doenças do baço, enquanto que o suco é considerado útil no tratamento da intoxicação saturnínica. (LORENZI; MATOS, 2002; LOPES, RITTER; RATES, 2009; MOREIRA, 1985).

Atividades biológicas não relacionadas com o uso popular também foram encontradas. O extrato aquoso da planta promoveu a cicatrização de feridas por excisão e incisão em ratos, através da diminuição do período de epitelização, quando

comparados com o grupo-controle (NAYAK *et al.*, 2006). As folhas da planta também apresentaram atividade fungitóxica contra algumas dermatomicoses de animais e humanos, sendo essa ação atribuída ao plumerídeo, um iridóide isolado das folhas da *Allamanda cathartica* (TIWARI *et al.*, 2002).

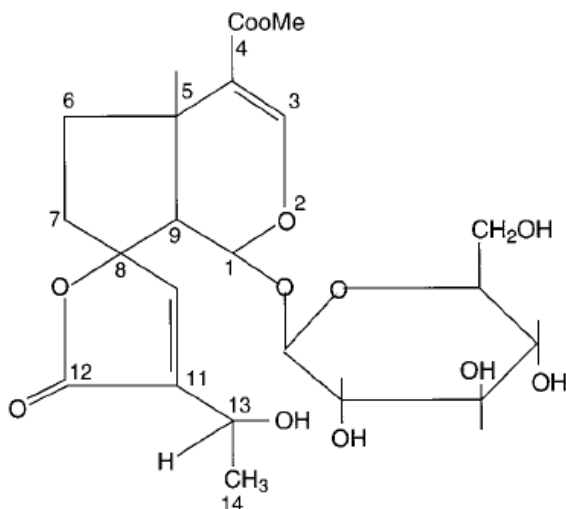


Figura 2 - Estrutura química do plumerídeo da *Allamanda cathartica* L.

Fonte: TIWARI *et al.*, 2002.

Um estudo desenvolvido por Uthaisang e Khawsak (2005), mostrou grande viabilidade na investigação da *Allamanda cathartica* para avaliação de sua citotoxicidade em células cancerosas, a partir de sua conhecida citotoxicidade fúngica e atividade antinematódica. Outro estudo investigou a influência do plumerídeo, em inibir as respostas inflamatória e nociceptiva em diferentes modelos experimentais, cuja conclusão foi que esse iridoide tem potente efeito inibitório sobre mecanismos de migração de leucócitos, sugerindo seu uso no desenvolvimento de uma alternativa terapêutica nova e importante para o tratamento da inflamação e da dor (NAYAK *et al.*, 2006; SILVA, 2007).

3.3 A descoberta de novos agentes antimicrobianos

O surgimento dos antibióticos e quimioterápicos permitiu a cura de milhares de pessoas, mudando a evolução natural das enfermidades de origem bacteriana, de modo marcante. No entanto, há apenas alguns anos após o início do uso clínico da penicilina, o primeiro antibacteriano comercializado, havia sido registrado o primeiro caso de resistência bacteriana adquirida (ANTUNES *et al.*, 2006; SILVA, 2010).

Atualmente, a resistência bacteriana vem sendo considerada um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso terapêutico, já

que continua a reduzir o número de antibióticos válidos disponíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2008; VITAL *et al.*, 2004).

A resistência bacteriana é um fenômeno relacionado a vários mecanismos de respostas aos estresses ambientais, que leva à formação de estirpes não sensíveis aos antibióticos, capazes de se multiplicar mesmo na presença de concentrações mais elevadas de antimicrobianos. Esse fenômeno pode ocorrer devido à evolução natural dos micro-organismos e do uso desmedido e irracional destes agentes nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Apesar de todos os esforços da comunidade científica, a descoberta de novos antibióticos tem atingido sucesso limitado. Várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema das bactérias multirresistentes, entre elas, a busca por novos medicamentos ou protótipos oriundos de espécies vegetais (MICHELIN *et al.*, 2005).

O estudo de agentes antimicrobianos e antissépticos de origem natural tem grande abrangência, sendo um ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético, principalmente em um país como o Brasil, dada à sua biodiversidade de flora. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas, na corrida contra a resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (ORTOSKY, 2008).

Há muito tempo, os óleos e extratos de plantas têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos. Essa realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas à confirmação da atividade antimicrobiana desses compostos vegetais (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população, poucas têm ação comprovada. Contudo, o uso popular, tradicionalmente consolidado, tem sido utilizado como guia para novas pesquisas farmacológicas. Daí, a importância de estudos que comprovem a efetiva atividade de compostos de origem vegetal (MICHELIN *et al.*, 2005).

Algumas espécies vegetais sintetizam, como metabólitos secundários, substâncias de defesa contra predadores: micro-organismos patogênicos, insetos e animais herbívoros (HAIDA *et al.*, 2007). Esses compostos despertam grande interesse pelas atividades biológicas produzidas em resposta ao meio ambiente e aos efeitos fisiológicos que exercem em animais (OLIVEIRA *et al.*, 2008). São produtos quimicamente variados, sendo de particular interesse os terpenoides, alcaloides e cumarinas, pois apresentam, com grande frequência, ação antimicrobiana (HAIDA *et al.*, 2007).

3.4 Os fitocosméticos

Existe uma tendência mundial de incorporação de extratos vegetais em formulações cosméticas, com a finalidade de se obter fórmulas que possam ser usadas por um número cada vez maior de pessoas que procuram, na natureza, uma alternativa efetiva e menos agressiva (CUNHA *et al.*, 2009). Esta valorização de plantas ocasionou crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre a sua segurança e eficácia terapêutica.

Os extratos vegetais incorporados em formulações cosméticas devem ser padronizados, exigindo rigoroso estudo da composição da planta ou das plantas que o compõem, originando, assim, os fitocosméticos (FENNER *et al.*, 2006).

Fitocosmético pode, então, ser definido como o cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal, seja um extrato, óleo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto. Um fitocosmético deve passar por todas as etapas de pesquisa: proposição, criação e desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade, para assegurar a atividade terapêutica durante toda sua vida útil (CUNHA *et al.*, 2009).

Os extratos vegetais podem ser incorporados em diferentes preparações cosméticas e, dependendo da classe química de seus ativos, podem ser responsáveis pela atividade do produto. Podem ou não alterar a forma cosmética e o comportamento reológico da preparação, conforme estudos realizados por Almeida e Bahia (2003).

Extratos são preparações concentradas, de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtidos a partir de material vegetal ou animal (Farmacopéia Brasileira, 2001), usando como solvente etanol, água ou mistura entre eles ou, ainda, outro líquido extrator que seja apropriado ao uso (SCHULZ *et al.*, 2002). Após a extração, o solvente pode ser evaporado em evaporador rotativo e o resíduo, liofilizado.

Na preparação de fitocosméticos, o extrato glicólico, é o mais usualmente empregado. Esse extrato é obtido a partir da extração com propilenoglicol, que é um solvente viscoso, utilizado em uma grande variedade de preparações cosméticas e farmacêuticas de uso tópico, devido à sua propriedade emoliente (HANDBOOK, 1994; ISAAC *et al.*, 2008).

Um estudo conduzido por Ardisson *et al.* (2002), revela que a incorporação de 20 % de água ao propilenoglicol, durante a extração, conduz a extratos mais enriquecidos em compostos bioativos.

Maceração é o processo no qual o material a ser extraído é reduzido em partículas de tamanho adequado e mantido em contato com o líquido extrator por tempo

a ser determinado experimentalmente, para que a extração seja completada. Esse contato é realizado em recipiente fechado e, ao final do processo, o extrato é separado do resíduo, o qual deve ser prensado e o líquido, juntado ao extrato (Farmacopéia Brasileira, 2001; ISAAC *et al.*, 2008).

3.5 Ensaio físico-químico de estabilidade de fitocosméticos

A crescente demanda por produtos cosméticos estáveis, seguros e eficazes tem exigido da comunidade científica estudos cada vez mais complexos e utilização de técnicas mais eficientes para determinação da estabilidade dos produtos.

No caso específico de fitocosméticos, a presença de ativos vegetais dificulta, ainda mais, a padronização de protocolos experimentais para atestar a estabilidade das preparações cosméticas, pois não existe ainda no Brasil um protocolo que padronize os ensaios a serem realizados para se determinar a estabilidade desses produtos (ISAAC, 2008).

Um fitocosmético deve passar por todas as etapas de pesquisa: proposição, criação e desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade, para assegurar a atividade durante toda sua vida útil.

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente às condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade, contribuindo para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado; fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade e ainda para auxiliar no monitoramento da estabilidade sensorial, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (Brasil, 2004; IHA, *et al.*, 2008).

Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto. As alterações podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, micro-organismos e vibração) e intrínsecas, relacionadas à natureza das formulações e, sobretudo, à interação de seus ingredientes entre si e ou com o material de acondicionamento: incompatibilidade física e incompatibilidade química, como, por exemplo, pH, reações de óxido-redução, reações de hidrólise,

interação entre ingredientes da formulação e interação entre ingredientes da formulação e o material de acondicionamento (CORREA *et al.*, 2005; ISAAC, 2008).

As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Cada categoria de produto deve apresentar, assim, um comportamento reológico adequado à sua aplicação (CORRÊA *et al.*, 1997).

A reologia é assunto de extrema importância para a área cosmética uma vez que devem ser mantidas as características reológicas (como a viscosidade) dos produtos de lote para lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto acabado e durante o tempo que permanecem em prateleira (CORRÊA *et al.*, 1997; Masson, 2005), além da estabilidade física da formulação ser fundamental para o controle de qualidade, aceitação do consumidor e eficácia da mesma (PRESTES, *et al.*, 2009; Corrêa *et al.*, 2005). A relação entre reologia e estabilidade é reconhecida como um importante parâmetro para o desenvolvimento de formulações (MASSON, 2005).

3.6 Testes microbiológicos para avaliação de atividade antimicrobiana de produtos sanitizantes

Os bioensaios são procedimentos destinados a avaliar a potência de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopêicas utilizando reagentes biológicos, tais como micro-organismos, animais, fluídos biológicos, tecidos e órgãos isolados de animais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Neste mesmo contexto, a atividade de fármacos com propriedades antibióticas pode ser determinada, sob condições apropriadas, medindo-se a inibição do crescimento de um micro-organismo sensível induzida por concentrações conhecidas do antibiótico sob teste em comparação com uma substância de referência com atividade reconhecida (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

Para avaliação da eficiência de um produto fitoterápico, vários métodos são utilizados, podendo estar classificados em dois grupos: preliminares ou *in vitro* e práticos ou em condições de uso simulado.

O método microbiológico de difusão em Agar é um método *in vitro*, que avalia a capacidade de um dado micro-organismo de se multiplicar na presença de concentrações presumíveis de um antimicrobiano, aplicado no interior de um cilindro ou disco sobre uma camada de Agar, ou de um orifício padronizado no ágar em uma placa de petri. O antimicrobiano se difunde no ágar, em concentrações decrescentes, e a estirpe bacteriana semeada cresce até encontrar a concentração inibitória mínima, e a partir do

ponto de aplicação se forma um halo de inibição ao redor do cilindro. Esse halo é determinado em milímetros e é diretamente proporcional à concentração do antimicrobiano (ESMERINO *et al*, 2004).

A técnica de difusão em ágar é amplamente utilizada para avaliar o efeito antimicrobiano de várias substâncias. Entretanto ao utilizar esse método, vários fatores podem se tornar fontes de erro, como composição, preparação incorreta e espessura do meio de cultura, densidade do inóculo incorreta, uso de *swab* com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequados, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição, ou o uso de culturas mistas ou contaminadas (ANDRADE, 2008; FERNANDES, 2010).

Os testes práticos, por serem realizados sob condições de uso simulado, procuram reproduzir o uso de rotina do sanificante e representam um segundo estágio de avaliação. São específicos para cada tipo de avaliação a que se propõem e incluem, principalmente, a desinfecção de superfícies e de instrumental médico-cirúrgico.

De acordo com órgãos internacionais que regulamentam e determinam métodos para avaliação de sanificantes, é considerado eficiente aquele sanificante que promover a morte de 99,999 % dos micro-organismos ou 5 reduções decimais (RD), para superfícies inanimadas, quando em contato com uma alíquota de suspensão microbiana com cerca de 10^9 células.ml⁻¹, por 30 segundos, à temperatura de 20 °C, e posterior cultivo em meio contendo neutralizante (CARDOSO, 1993).

Na avaliação de produtos sanificantes para pele, ainda não há um consenso entre pesquisadores para se determinar limites aceitáveis de RD que determinem a eficiência de um produto sanificante, tendo em vista vários fatores como: multiplicidade de uso, lavagem cirúrgica e lavagem higiênica das mãos, curativos cirúrgicos, aplicação em mucosas, local de aplicação, espessura da camada córnea do local de aplicação, dentre outros.

Com relação específica à higienização de mãos, o processo de sanificação visa prevenir a transmissão de possíveis micro-organismos alteradores ou patogênicos do alimento não processado ou de um ambiente sanitariamente desfavorável, para alimentos em processamento.

A quantidade e tipo de substâncias encontradas na pele podem variar entre indivíduos e, de tempos em tempos, para o mesmo indivíduo, como resultado de mudanças nas condições fisiológicas. No entanto, de modo geral, a estrutura e composição da pele fornecem um ambiente favorável ao crescimento bacteriano, sendo os focos para o estabelecimento desta flora representados pelos folículos pilosos,

glândulas sebáceas e sudoríparas e os numerosos sulcos e entalhes (BLACK; DYKES; ANDERSON, 1981; CLIVER; KOSTENBADER, 1984).

Os métodos utilizados para avaliação da eficiência de produtos na antissepsia de mãos devem ser adaptados à realidade da análise, de modo a reproduzir prontamente as condições verdadeiras de uso do produto, de modo a avaliar sua eficiência (CARDOSO, 1993).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG e nos laboratórios do Departamento Farmacêutico da Faculdade de Minas, FAMINAS, Muriaé, MG, como descrito a seguir:

- Secagem da *Allamanda cathartica*, análise farmacognóstica e fitoquímica para identificação dos possíveis componentes da planta, bem como obtenção do extrato seco e extrato glicólico - Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Minas – FAMINAS;
- Desenvolvimento farmacotécnico de um produto fitocosmético cujo princípio ativo é o EGAC - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica da Faculdade de Minas – FAMINAS;
- Avaliação “*in vitro*” da atividade antisséptica do EGAC e do produto contendo o extrato, frente a estirpes padronizadas das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, através do teste do halo de inibição - Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa;
- Avaliação “*in vivo*” da atividade antisséptica do produto, contendo o EGAC, frente a estirpes padronizadas das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, na forma de suspensões, aplicadas em mãos de voluntários, através do teste do uso simulado - Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa;
- Testes de controle de qualidade microbiológico do produto fitocosmético, contendo o EGAC - Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa;
- Testes de controle de qualidade físico-químico do produto fitocosmético, contendo o EGAC – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica da Faculdade de Minas – FAMINAS.

4.1 Matéria-prima

Foram utilizadas flores, caules e folhas da *Allamanda cathartica* L. (*Apocinaceae*), colhidas no município de Muriaé, Minas Gerais, Brasil

As matérias-primas utilizadas para compor produto antisséptico, foram fornecidas pela Pharmanostra Produtos Farmacêuticos Ltda, com sede no Rio de Janeiro, RJ. Todas as matérias-primas vieram acompanhadas de seu respectivo laudo analítico, com descrição dos testes de controle de qualidade efetuados, que comprovem a identificação e teor de cada substância.

4.2 Obtenção do extrato fluido da *Allamanda cathartica* L.

O material fresco de *Allamanda cathartica* L., depois de colhido, foi submetido à lavagem em água corrente e à desinfecção em solução de hipoclorito de sódio 100 mg.L⁻¹, a fim de se promover sua desinfecção. Em seguida, o material vegetal foi seco à temperatura ambiente, sobre bancadas, previamente limpas, sanitizadas e revestidas com papel absorvente, seguindo-se à secagem, em estufa de circulação de ar, a 45 °C, por 72 h, aproximadamente. Após este processo, a planta foi colocada em moinho de bolas, por aproximadamente 3 h, para se obter a granulometria adequada para classificação de pó grosso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Para obtenção do extrato glicólico, foi utilizado o “Processo B” de obtenção de Extratos Fluidos da Farmacopéia Brasileira 5ª Ed., através da maceração, na qual a droga, em rasura, é mantida em contato com o líquido extrator (propilenoglicol a 80 % em água) por 48 h. Esse contato foi realizado em recipiente fechado e, ao final do processo, o extrato foi separado do resíduo por filtração, o qual foi prensado e o líquido, juntado ao extrato, até o esgotamento da droga (Farmacopéia Brasileira, 2010; ISAAC *et al.*, 2008).

A concentração de propilenoglicol utilizada foi de 80 % em água, que conduz a extratos mais enriquecidos em polifenóis e taninos, de acordo com as indicações de Ardison, *et al.* (2002).

4.2.1 Controle de qualidade físico-químico do EGAC

O EGAC foi submetido a análises de controle de qualidade físico-químico, a saber:

- a) Determinação da densidade: a densidade do EGAC foi determinada pelo método do picnômetro, à temperatura ambiente. Deve-se utilizar um picnômetro limpo e

seco, com capacidade de, no mínimo, 5 mL que tenha sido previamente calibrado. A calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida, a 20 °C. Após a calibração, deve-se transferir a amostra para o picnômetro. Ajustar a temperatura para 20 °C, remover excesso da substância, se necessário, e pesar. Obter o peso da amostra através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calcular a densidade relativa determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C. Utilizar a densidade relativa para calcular a densidade específica da amostra ensaiada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

- b) Determinação do pH: foram determinados, usando o medidor de pH microprocessado de bancada - PG 2000 da marca Gehaka, realizando-se a medida do pH dos solventes extratores puros e do extrato glicólico da planta.
- c) Determinação da porcentagem do resíduo seco: 1 mL do extrato glicólico foi exatamente medido e transferido para uma cápsula de porcelana, previamente tarada. A cápsula, contendo o extrato, foi colocada em banho-maria até secar e levada, posteriormente, à estufa sob a temperatura de 110 °C, até peso constante, para cálculo da porcentagem de resíduo seco.

4.3 Análise farmacognóstica e triagem fitoquímica

As análises farmacognósticas foram realizadas a fim de se detectar a presença de compostos de interesse na espécie botânica pesquisada. A prospecção fitoquímica foi realizada com material vegetal seco, a temperatura ambiente em estufa de secagem e posteriormente triturado. Para a preparação do extrato, foi utilizado álcool etílico a 70 %, em maceração por 3 dias, em recipiente de vidro âmbar. Ao final do prazo, o material foi filtrado em gaze e, posteriormente, em papel filtro. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotativo, e a torta remanescente seca, em estufa, até a completa secagem do extrato (MACHADO *et al.*, 2011).

O extrato foi submetido a uma investigação dos constituintes químicos por classe metabólica. As classes de metabólitos secundários testados foram: saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcalóides, proteínas e aminoácidos, fenóis e taninos, flavonóides, esteróides e tripernóides, glicosídeos cardíacos e derivados da cumarina. Estes testes foram realizados em triplicata e seguiram as condições estabelecidas no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (BARBOSA, 2001; RIBEIRO, 2008) e descritas a seguir.

4.3.1 Análises realizadas a partir da solução aquosa do extrato seco

Uma solução mãe foi preparada com 420 mg de extrato seco da planta e 84 mL de água destilada. A solução foi filtrada e alíquotas foram retiradas para a realização de testes para identificação de saponina espumídica, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos, proteína e aminoácidos.

4.3.1.1 Saponina Espumídica

Retirou-se da solução mãe, uma alíquota de 15 mL que foram distribuídos em três tubos de ensaio, de modo que, cada recipiente apresentasse 5 mL desta solução. Em seguida adicionou-se 15 mL de água destilada em cada recipiente. Procedeu-se agitação vigorosa durante 2 min em tubo fechado. Se a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo para saponina espumídica.

4.3.1.2 Ácidos Orgânicos

Foi colocado 1 mL de solução mãe em cada um dos poços de uma placa escavada. Posteriormente, em cada amostra, foram adicionadas nove gotas do reativo de Pascová A e 1 gota do reativo de Pascová B. Se houver descoloração do reativo, a reação é positiva.

4.3.1.3 Fenóis e Taninos

Em três tubos de ensaio adicionou-se 5 mL de solução-mãe e, posteriormente, 2 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1 %. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Sol. de FeCl_3).

4.3.1.4 Açúcares Redutores

Adicionou-se 5 mL da solução mãe em três tubos de ensaio. Foram acrescentados 2 mL de reativo FEHLING A e 2 mL de reativo FEHLING B. Estes recipientes foram levados à aquecimento em banho-maria por 5 min. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica presença de açúcares redutores.

4.3.1.5 Proteínas e Aminoácidos

Foram transferidos 3 mL de solução mãe para 3 tubos de ensaio. Acrescentaram-se 0,5 mL de solução aquosa de Nihidrina a 1%, sendo esses recipientes levados a aquecimento até ebulição. O aparecimento de coloração violeta persistente indica reação positiva.

4.3.2 Análises realizadas a partir da solução metanólica do extrato seco

Uma solução mãe foi preparada com 360 mg do extrato seco e 72 mL de metanol. Por conseguinte, foi realizada uma filtragem simples. Esta solução foi utilizada nos testes para identificação de flavonóides e glicosídeos cardíacos.

4.3.2.1 Flavonóides

Mediu-se 10 mL de solução mãe e colocou-se em três tubos de ensaio. Adicionaram-se 5 gotas de HCl concentrado em cada um dos tubos. Acrescentaram-se raspas de óxido de magnésio em cada tubo. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

4.3.2.2 Glicosídeos Cardíacos

Em três tubos de ensaio foram colocados 2mL de solução mãe. Em cada tubo foram adicionadas duas gotas do reativo de Keede A e 2 gotas do reativo de Keede B. Coloração azul ou violeta indica reação positiva.

4.3.3 Análises realizadas utilizando-se o clorofórmio como solvente

A solução foi preparada com 250 mg do extrato seco e 50 mL de clorofórmio. Esta solução foi usada para identificar substâncias como: esteróides e triterpenóides.

4.3.3.1 Esteróides e Triterpenóides

Foram retirados da solução mãe 30 mL. Esta alíquota foi filtrada em carvão ativado. O filtrado foi distribuído de maneira uniforme em três tubos de ensaio. Aos tubos, foi adicionado 1mL de anidrido acético seguido de agitação. Adicionaram-se três gotas de

H₂SO₄ concentrado. Após agitação, observou-se se há rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente, ao verde persistente que indicam resultado positivo.

4.3.4 Teste de identificação de derivados da cumarina

Foi preparada uma solução com 200 mg do extrato seco e 40 mL de éter etílico. 5 ml dessa solução foi colocada em tubo de ensaio, e concentrada em Banho-maria até uma quantidade de 0,5 mL. Em papel filtro foram aplicadas gotas de solução etérea, de modo a formar duas manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro cada. A uma destas, juntou-se 1 gota de solução NaOH 1N. O papel filtro foi levado à câmara de UV, onde a metade da mancha que continha NaOH 1N estava coberta com papel escuro. Fluorescência azul na parte exposta da mancha indica reação positiva.

4.3.5 Teste de identificação de antraquinonas

Dissolveu-se 25 mg do extrato seco em 5 mL de tolueno. Adicionou-se 2 mL de solução de NH₄OH a 10 %. Agitou-se suavemente. O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

4.3.6 Teste de identificação de alcalóides

Dissolveu-se 25 mg de extrato seco em 5 mL de HCl a 5%. Por filtração simples, separaram-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionaram-se gotas de reativo de Bouchardat, de reativo de Dragendorff e reativo de Mayer. Na presença de alcalóides ocorre:

- Reativo de Bouchardat: precipitado laranja avermelhado;
- Reativo de Dragendorff: precipitado vermelho tijolo;
- Reativo de Mayer: precipitado branco.

4.4 Desenvolvimento da formulação fitocosmética

A formulação foi desenvolvida segundo farmacotécnica descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª Ed. e Ferreira (2008).

Foi preparada uma formulação-base de detergente (FB), a partir da qual foram preparadas as diversas formulações. A Tabela 1 apresenta as matérias primas, suas funções e respectivas concentrações dos componentes nas formulações desenvolvidas.

A formulação F1 foi utilizado como controle sem adição de nenhum outro componente, F2 foi o controle com adição de 1 % de triclosan (controle positivo), F3 foi a formulação com adição de 1 % do EGAC, F4 foi a formulação com adição de 3 % do EGAC, F5 foi a formulação com adição de 5 % do EGAC.

Tabela 1 – Descrição das matérias-primas, funções e respectivas concentrações dos componentes nas formulações.

Matéria Prima	Funções	FB	F1	F2	F3	F4	F5
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Fase A							
Metilparabeno	Conservante	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Propilparabeno	Conservante	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Glicerina	Umectante/Solvente	1	1	1	1	1	1
Diestearato de PEG 6000	Espessante não-iônico	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Água	Veículo	30	30	30	30	30	30
Fase B							
Lauril Éter Sulfato de Sódio	Tensoativo Aniônico	25	25	25	25	25	25
Cocoamido Propil Betaína	Tensoativo Anfótero	2	2	2	2	2	2
Dietanolamina de Ácidos Graxo de Coco	Espessante	3	3	3	3	3	3
Água qsp	Veículo	34,45	34,45	34,45	34,45	34,45	34,45
Fase C							
Irgasan DP 300®	Antimicrobiano	-	-	1	-	-	-
Fase D							
Extrato Glicólico de <i>Allamanda cathartica</i> L.	Possível atividade Antimicrobiana	-	-	-	1	3	5

Primeiramente, foi feita a higienização de equipamentos, utensílios e bancadas. Foram efetuados os cálculos da quantidade de matéria-prima a ser utilizada para o preparo de 1000 g da formulação base.

Em um béquer, foram acrescentados o metilparabeno e o propilparabeno, com parte da água aquecida, para facilitar a dispersão. Em outro béquer, foi colocado o diestearato de PEG 6000 e levado ao aquecimento em chapa, para fusão e posterior incorporação à mistura anterior.

Em outro béquer, foram acrescentados os componentes da fase B (lauril éter sulfato de sódio, dietanolamina de ácido graxo de coco, coco amido propil betaína, e o restante da água). Ambas as misturas foram aquecidas, para facilitar a homogeneização e, em seguida, a fase A foi vertida sobre a fase B, com posterior homogeneização.

Com o auxílio de um pistilo e um gral, a fase C foi levigada com glicerina, separadamente, até completa solubilização. Parte da FB foi separada, para ser o controle sem adição de nenhum outro componente. Cada uma das outras 4 fases foi vertida sobre a fase A/B, em recipientes separados, obtendo-se 5 formulações diferentes. O pH foi verificado com auxílio de um pHmetro (pH ideal = 5,5 a 6,0) e, se necessário, ajustado com quantidade suficiente da solução de ácido cítrico a 10 % e homogeneizar (CONRADO; CORDEIRO, 2006).

4.5 Testes de estabilidade da formulação fitocosmética

A estabilidade é um parâmetro de validação muito pouco descrita em normas de validação de metodologia analítica, mas necessária para assegurar a qualidade do fitocosmético, desde a fabricação até a expiração do prazo de validade.

O estudo da estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até ao término da validade (BRASIL, 2004).

Foram avaliadas as características sensoriais e físico-químicas da formulação fitocosmética com e sem o EGAC, através de metodologia de avaliação da estabilidade preliminar, apresentada pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004). Desta forma, os parâmetros sensoriais avaliados foram aspecto, cor e odor e foram realizados testes de medida do pH de uma solução aquosa do sabonete a 10 %, medida da densidade em picnômetro de 5 mL e medida da viscosidade de efluxo em copo Ford como avaliação dos parâmetros físico-químicos.

As incompatibilidades físicas são observadas quando ocorrem alterações no aspecto físico da formulação, como: precipitação, separação de fases, cristalização, entre outros. As incompatibilidades químicas, dizem respeito às reações químicas propriamente ditas que podem ocorrer entre os componentes da formulação e relacionam-se com a integridade e segurança dos ativos.

4.5.1 Teste da Centrífuga

Foram pesados, em balança semi-analítica, aproximadamente 5 g da amostra a ser analisada, em tubo de ensaio para centrífuga, cônico, graduado, de 10 g de capacidade. O material foi submetido a rotações crescentes de 980, 1800 e 3000 rpm, em centrífuga, durante 15 min em cada rotação, à temperatura ambiente.

Os resultados foram interpretados de acordo com Isaac (2008), que indica que a não-ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade, somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade preliminar e estabilidade acelerada (ISAAC *et al.*, 2008; SOARES, 2010).

4.5.2 Teste de estabilidade preliminar

Segundo o guia de estabilidade de produtos cosméticos (BRASIL, 2004), é recomendável que se viabilize um estudo de estabilidade preliminar, com duração de até 15 d, a fim de se testar o produto em sua fase inicial de desenvolvimento.

O teste de estabilidade preliminar consiste em submeter a amostra a condições extremas de temperatura e realizar os ensaios, em relação aos vários parâmetros, de acordo com a forma cosmética estudada. O teste de estabilidade preliminar teve a duração de 15 dias, sendo a primeira avaliação realizada no tempo um (t_1), que corresponde a 24 h após a manipulação e/ou produção, para que o produto possa adquirir viscosidade e consistência final, após sua maturação. As outras avaliações foram realizadas diariamente, durante toda a duração do teste. As características analisadas para cada amostra foram: aspecto, cor, odor, pH, viscosidade e densidade. Os resultados foram a média aritmética dos valores obtidos dos testes realizados em triplicata.

Nesse teste, as amostras foram submetidas a ciclos de 24 h de temperaturas elevadas e baixas, a fim de forçar reações que possam ocorrer durante situações em que o produto é submetido a condições extremas de armazenamento (BRASIL, 2004; ISAAC *et al.*, 2008; SOARES, 2010; TERRA *et al.*, 2009).

- Temperaturas Elevadas:

Estufa: $T = 37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / Estufa: $T = 50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Temperaturas Baixas:

Geladeira: $T = 5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / Freezer: $T = -10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

A embalagem empregada para armazenamento das amostras foram embalagens de material neutro, de modo a não permitir reações e/ou interações com a formulação. O produto foi envasado ocupando apenas 2/3 do frasco a fim de que ocorra o contato da formulação com o ar, simulando as condições de armazenagem (BRASIL, 2004; SOARES, 2010).

4.5.3 Teste de estabilidade acelerada

Este teste tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (BRASIL, 2004). É empregado em escala laboratorial e piloto de fabricação. Possui duração de 60 a 90 d, podendo se estender por seis meses a um ano. De modo geral, avalia-se características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas. Emprega condições não-extremas e serve como auxiliar na determinação da estabilidade da formulação e para estimar o prazo de validade. O teste foi feito com o produto em sua embalagem original, para que também fosse avaliada a compatibilidade entre a formulação e a embalagem. É importante que a quantidade de produto seja suficiente para as avaliações necessárias e que o volume total da embalagem não seja completado, sendo respeitado um terço livre da capacidade da embalagem para possíveis trocas gasosas (BRASIL, 2004).

O teste de estabilidade acelerada teve duração de 60 dias (BRASIL, 2004). As amostras foram submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores, exposição à radiação luminosa e ao ambiente, com controle da temperatura e analisadas em relação aos parâmetros descritos anteriormente: aspecto, cor, odor, pH, viscosidade e densidade (ISAAC *et al.*, 2008; SOARES, 2010; TERRA *et al.*, 2009).

- Temperaturas Elevadas:

Estufa: $T = 37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / Estufa: $T = 50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Temperaturas Baixas:

Geladeira: $T = 5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / Freezer: $T = - 10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os tempos para realização das análises foram: tempo zero, 24 h após a preparação, no sétimo dia, no décimo quinto dia, no trigésimo dia e no sexagésimo dia após sua preparação.

4.5.4 Análises dos parâmetros de estabilidade

4.5.4.1 Aspecto

A amostra foi analisada, em relação a um padrão estabelecido, a fim de avaliar as características macroscópicas para verificação de sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases, de precipitação, de turvação, deve ser indicativa de estabilidade da amostra ensaiada.

4.5.4.2 Cor

A colorimetria foi realizada pela comparação visual, sob condições de luz branca natural, da cor da amostra com a cor do padrão, armazenado nas mesmas condições e embalagem que a amostra.

O processo comparativo deve ser executado em tubos de ensaio de vidro transparente e fundo chato, com diâmetro da ordem de 16 mm, do tipo empregado em ensaio limite de impurezas. Os tubos devem ser os mais uniformes possíveis. Para a avaliação, devem-se utilizar volumes de 10 mL tanto para a preparação amostra quanto para a preparação padrão, assegurando altura aproximada de 50 mm para os líquidos nos tubos. Observar os tubos transversalmente contra fundo branco, sob luz difusa. É importante que a comparação seja realizada nas mesmas condições, inclusive de temperatura (25 °C) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

O padrão a ser utilizado nessa análise foi 50 mL de cada formulação que está sendo testada, que deverá ser preparada um dia antes da análise.

A alteração na intensidade da cor ou mesmo modificação da coloração podem ser indicativos de instabilidade da preparação.

4.5.4.3 Odor

O odor da amostra ensaiada foi comparado ao odor do padrão, diretamente através do olfato. A amostra foi classificada, em relação ao odor em: normal, sem alteração; levemente modificado; modificado; intensamente modificado.

4.5.4.4 pH

A determinação do pH foi realizada em uma dispersão aquosa a 10 % (p/p) da amostra ensaiada em água recém-destilada isenta de dióxido de carbono, usando potenciômetro digital, avaliando a diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo (BRASIL, 2004). O eletrodo foi inserido diretamente na dispersão

aquosa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Valores de pH 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo, foram usados como critério de estabilidade.

A primeira determinação fornece valor variável, havendo necessidade de proceder a novas leituras. Os valores encontrados posteriormente não deverão variar mais do que 0,05 de unidade em três leituras sucessivas. É importante que as temperaturas das soluções-tampão e amostra dos eletrodos e das águas de lavagem não devem estar acima de 2 °C entre si. Assim, para que se reduzam os efeitos de histerese térmica ou elétrica dos eletrodos, as soluções devem estar à mesma temperatura por, no mínimo, 30 minutos antes do início da operação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.5.4.5 Densidade

A densidade relativa é a relação entre a densidade absoluta da amostra e a densidade absoluta de uma substância usada como padrão. Quando a água é utilizada como substância padrão, a densidade determinada é a densidade específica (BRASIL, 2007).

A determinação da densidade específica foi realizada em picnômetro, acoplado com termômetro, de acordo com a técnica proposta pela Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed. (2010) e já descrita no item 4.2.a.

4.5.4.6 Viscosidade

A viscosidade depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material (Brasil, 2007). Na determinação da viscosidade, a especificação da temperatura é imprescindível devido à sua influência decisiva sobre o resultado (em geral, a viscosidade é inversamente proporcional à temperatura). O método mais frequente baseia-se no tempo de escoamento de líquidos através de orifícios e de capilares. O aparelho utilizado foi o viscosímetro de efluxo - modelo tipo Ford.

Primeiramente deve-se selecionar o orifício adequado. A diretriz para a seleção do orifício deve ser a obtenção de um tempo de escoamento da amostra próximo a 60 segundos. Deve-se ter um tempo de escoamento entre 20 e 100 segundos, para a amostra a 25 °C. A amostra deve ser perfeitamente homogeneizada. No momento do ensaio, o viscosímetro e o material a ser ensaiado devem estar a $25 \pm 0,1$ °C. Fechar o orifício com lâmina de vidro plana e preencher o copo com amostra até o nível mais elevado. Verter a amostra, lentamente, evitando a formação de bolhas. Nivelar a amostra no copo utilizando placa de vidro plana. Retirar a lâmina do orifício. A amostra ficará retida dentro do copo. Remover a placa de vidro plana e acionar o cronômetro quando a amostra começar a escoar pelo orifício. Quando ocorrer a primeira interrupção do fluxo

de escoamento, parar o cronômetro e anotar o tempo transcorrido em segundos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

O ensaio foi realizado em triplicata. A viscosidade foi a média dos valores obtidos, expressa em mm²/s ou Centistokes.

4.5.5 Análise estatística

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC) fatorial. Os dois fatores analisados foram tempo (18 intervalos) e temperatura (5 temperaturas (-5, 10, 25, 37 e 50 °C)). Os resultados foram analisados utilizando-se o software *Statistical Analysis System (SAS®)*, versão 9.1 e foram apresentados na forma de Tabela estruturada, com um resumo da análise de variância para as variáveis densidade, pH e viscosidade, e de gráficos que mostrarão visualmente a dispersão dos valores de cada variável descrita, em função do tempo de avaliação, em 5 diferentes temperaturas, para que se possa concluir a respeito da estabilidade físico-química da formulação ao longo dos 60 dias do estudo.

4.6 Controle de qualidade microbiológico

As amostras foram avaliadas levando-se em consideração a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, RDC 481/99 (BRASIL, 1999).

4.6.1 Preparo da amostra

Inicialmente foram transferidos 1 g ou 1 mL da mistura de amostra para 9 mL de solução-tampão fosfato (pH 7,2), contendo 2 % de Tween 80, obtendo-se a diluição 10⁻¹. Depois, foram feitas diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.6.2 Contagem do número total de micro-organismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras

Foi adicionado 1 mL da amostra preparada no item 4.6.1, em placa de Petri e vertido, separadamente, 15 a 20 mL de ágar caseína soja e, ágar sabouraud-dextrose mantidos a 45 a 50 °C. Foram utilizadas duas placas para cada meio e diluição (10⁻¹ a 10⁻⁴). As placas contendo ágar caseína-soja foram incubadas a 32,5 °C ± 2,5 °C por, até 5 d

e as placas contendo ágar sabouraud-dextrose a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por, até 7 d para determinação do número de micro-organismos aeróbicos, fungos filamentosos e leveduras, respectivamente. Somente as placas que apresentarem número de colônias inferior a 250 (bactérias) e 50 (bolores e leveduras) por placa deverão ser consideradas para o registro dos resultados. O resultado foi expresso em número de UFC por grama ou mL do produto (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Esse valor não poderá ultrapassar 10^3 UFC.g^{-1} ou mL, sendo o limite máximo $5 \times 10^3\text{ UFC.g}^{-1}$ ou mL (BRASIL, 1999).

4.6.3 Pesquisa de micro-organismos patogênicos

4.6.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A amostra foi preparada usando a diluição 10^{-1} preparada no item 4.6.1, sendo que 1 mL da diluição foi transferido para 9 mL de caldo de caseína-soja, com posterior homogeneização e incubação a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. Caso haja crescimento no caldo, isto é, presença de turbidez característica da proliferação microbiana, foi semeada uma porção do meio para placas de Petri contendo ágar cetrimida e incubadas, invertidas, a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 72 h (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de tais colônias (BRASIL, 1999).

4.6.3.2 *Staphylococcus aureus*

A amostra foi preparada, usando a diluição 10^{-1} preparada no item 4.6.1, sendo que 1 mL da diluição foi transferida para 9 mL de caldo de enriquecimento (caldo caseína-soja), com posterior homogeneização e incubação a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. Caso haja crescimento no caldo, isto é, presença de turbidez característica da proliferação microbiana, foi semeada uma porção do meio para placas de Petri contendo ágar sal manitol e incubadas, invertidas, a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 72 h (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de tais colônias (BRASIL, 1999).

4.6.3.3 Coliformes totais e termotolerantes

A amostra foi preparada usando a diluição 10^{-1} preparada no item 4.6.1, sendo que 1 mL da diluição foi transferida para 9 mL de caldo de enriquecimento (caldo

caseína-soja), com posterior homogeneização e incubação a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. Caso haja crescimento no caldo, isto é, presença de turbidez característica da proliferação microbiana, 1 mL do caldo foi transferido para 100 mL de caldo MacConkey, que foi incubado a $43\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 h. Em seguida, foi realizada a subcultura em placa de ágar MacConkey e estas incubadas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 72 h. O crescimento de colônias vermelhas, geralmente não-mucosas, com micromorfologia característica de bacilo Gram-negativo, indica presença provável de *E.coli* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de tais colônias ou se as provas microbianas forem negativas (BRASIL, 1999).

4.7 Avaliação da atividade antisséptica do EGAC e do produto fitocosmético, contendo esse extrato

4.7.1 Teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar

A análise microbiológica foi desenvolvida no Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, MG.

A avaliação microbiológica foi feita pela técnica da inibição da multiplicação microbiana por difusão em Agar, de acordo com a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2003), com modificações.

O efeito antimicrobiano das suspensões foi avaliado contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 11229. Para manutenção das culturas no laboratório, estas foram mantidas congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo infusão cérebro coração (BHI) e glicerol na proporção de 80:20 v/v.

Os halos de inibição formados nas amostras foram avaliados em comparação com o halo de uma formulação de um detergente líquido que tem, como princípio ativo, o triclosan na concentração de 1 % p/p, que foi utilizado como controle positivo.

As amostras foram:

- a) 50 μL do sabonete líquido neutro, sem a adição do EGAC;
- b) 50 μL do sabonete líquido, com adição de 1 % do EGAC;
- c) 50 μL do sabonete líquido, com adição de 3 % do EGAC;
- d) 50 μL do sabonete líquido, com adição de 5 % do EGAC;
- e) 50 μL do EGAC puro;

A amostra do sabonete líquido com o EGAC, que apresentou a melhor resposta no teste, foi a escolhida para a realização do teste de uso simulado “*in vivo*”.

4.7.1.1 Preparo do meio

O Agar *Müller-Hinton* (Himedia®) foi preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante, acrescido de 2 % de polisorbato 80 para inibição da ação dos conservantes presentes na formulação do sabonete líquido, para que não haja interferência na análise. Imediatamente após a esterilização a 121 °C por 15 min, o meio foi resfriado em banho-maria entre 45 °C e 50 °C. Em seguida, foram distribuídos em torno de 25 mL a 30 mL de Agar em placas de Petri, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm.

4.7.1.2 Preparo do inóculo

As bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* foram ativadas por duas vezes consecutivas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 18 h a 24 h. Para obter colônias isoladas, foram feitas estrias em placas de Petri contendo Ágar-Padrão para Contagem (PCA) e incubadas por 18 h a 24 h.

O inóculo foi preparado, fazendo-se suspensão direta, em solução salina 0,85 % m/v, das colônias selecionadas da placa de PCA após 18 h a 24 h de incubação. A suspensão foi ajustada, para que sua turbidez coincida com a da solução-padrão de McFarland 0,5, o que resultará numa suspensão contendo, aproximadamente, de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL a $2,0 \times 10^8$ UFC/mL.

4.7.1.3 Inoculação das Placas-Teste

Um *swab* de algodão esterilizado deverá ser mergulhado na suspensão preparada anteriormente, até 15 min após ajustar a turbidez da suspensão do inóculo. O *swab* deverá ser girado várias vezes e apertado firmemente contra parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar o excesso de inóculo.

A superfície seca da placa de Agar *Müller-Hinton* foi inoculada passando-se o *swab* em toda superfície do Agar. Esse procedimento deve ser repetido outras duas vezes, girando-se a placa, aproximadamente, 60° cada vez, a fim de se assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, deve-se passar o *swab* na margem da placa, contendo o meio de cultura.

Após a inoculação, deverão ser perfurados os poços no ágar utilizando-se moldes de plástico previamente cortados e autoclavados a 121 °C por 15 min, de forma a padronizar o diâmetro da perfuração em 5 mm, sendo perfurado um poço em cada placa inicialmente.

Em cada poço perfurado, foram inoculados 30 µL de cada dispersão teste. As placas deverão ser mantidas sob refrigeração, de 7 °C a 10 °C, por 14 h para difusão dos antimicrobianos e, em seguida, incubadas na temperatura ótima de crescimento de cada micro-organismo testado por 18 h a 24 h. Todo o experimento deverá ser feito em duplicata.

4.7.1.4 Determinação dos halos de inibição das dispersões diante das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Após 18 h a 24 h de incubação na temperatura adequada de cada micro-organismo, os halos de inibição deverão ser medidos em centímetros, utilizando-se uma régua milimetrada.

4.7.1.5 Análise estatística

O experimento foi realizado com três repetições em duplicata. A eficiência antimicrobiana das amostras do sabonete líquido com EGAC nas concentrações a 5 %, 3 % e 1 %, foram comparadas com um controle positivo (sabonete com triclosan a 1 %) e um controle negativo (sabonete base neutro), para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre elas ($P < 0,05$), através do Teste de Médias Tukey, ou nível de significância (incidência de 5 %). Os resultados foram analisados utilizando-se o software *Statistical Analysis System* (SAS[®]), versão 9.1.

Os resultados foram apresentados na forma de Tabela estruturada com as comparações entre as médias de tamanho do halo (cm) das bactérias *S. aureus* e *E. coli*. A partir desses valores foi construído um gráfico relacionando a medida dos halos (cm) em função das amostras do sabonete líquido com EGAC, para melhor visualização da concentração de uso a ser escolhida.

4.7.2 Teste de uso simulado, pela avaliação da eficiência do sabonete líquido com o EGAC, sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, aplicadas em mãos de voluntários.

Através desse teste, foi comparada a eficiência do sabonete líquido com o EGAC a de um sabonete neutro sem o referido extrato vegetal (utilizado como controle negativo) e a de um sabonete líquido, contendo um agente conhecidamente antisséptico, o triclosan, na concentração 1 % (utilizado como controle positivo).

A concentração escolhida do EGAC no sabonete líquido foi a que obteve melhor resposta no teste preliminar de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar.

As suspensões microbianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* produzidas em laboratório, obedecendo critérios pré-estabelecidos, foram aplicadas nas mãos de 6 voluntários para cada bactéria testada, para obtenção do número inicial de micro-organismos inoculados e do número final de micro-organismos sobreviventes, após adoção dos procedimentos padronizados de limpeza e sanitização das mãos.

Todos os experimentos realizados no presente trabalho foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Minas – CONEP FAMINAS, sob o protocolo de nº 111122/0002 e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas, de modo que todos os participantes do experimento foram informados e estavam cientes do fundamento e riscos da pesquisa.

4.7.2.1 Preparo das suspensões bacterianas

Os micro-organismos utilizados no teste foram as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 11229.

As suspensões foram preparadas a partir da cultura propagada e mantida em ágar inclinado. De cada cultura, foram feitas três repicagens consecutivas, também com intervalo de 12 horas, em caldo BHI, com posterior inoculação em maior volume do meio de cultura, na concentração de 2 %, e incubação por 48 horas. Com esse procedimento, foi conseguida uma população bacteriana elevada, podendo alcançar valores na faixa de 10^8 micro-organismos/mL de suspensão.

A determinação do número de células nas suspensões, foi realizada pela técnica de contagem em placa, em ágar BHI.

4.7.2.2 Procedimento padronizado para limpeza das mãos dos voluntários

Para coleta dos dados do momento X_0 , ou seja, após a aplicação das suspensões nas mãos dos voluntários, é necessário um procedimento prévio padronizado para limpeza das mãos, seguindo as etapas:

- a) Pré-lavagem em água corrente;
- b) Lavagem das mãos por 30 segundos com sabão neutro e enxágüe em água corrente (três vezes);
- c) Enxágüe final com água destilada esterilizada;
- d) Secagem natural das mãos com agitação.

4.7.2.3 Aplicação das suspensões nas mãos dos voluntários

As suspensões preparadas foram aplicadas em volume de 0,25 mL, em ambas as mãos, após o procedimento padronizado de limpeza já descrito.

O inóculo foi distribuído por fricção das mãos, nas regiões das palmas e entre os dedos por 10 segundos, aguarda-se 20 segundos para secagem e, a seguir, iniciam-se as técnicas de amostragem.

4.7.2.4 Aplicação das amostras

As amostras a serem testadas e posteriormente comparadas foram:

1. Sabonete líquido neutro
2. Sabonete líquido com triclosan a 1 % p/p.
3. Sabonete líquido com o EGAC na concentração que obtiver melhor resposta no teste preliminar de inibição da multiplicação microbiana por difusão em Agar.

As amostras foram aplicadas nas mãos após a aplicação do inóculo, como descrito no item 4.6.2.3. A aplicação das amostras foi através de fricção de uma mão na outra, e na região dos dedos, contendo o produto, por 30 segundos, seguida de enxágüe em água corrente três vezes.

4.7.2.5 Avaliação da eficiência das amostras

Para realizar a coleta de micro-organismos nas mãos dos manipuladores, foi utilizada a técnica do *swab* (ANDRADE, 2008), que utiliza um *swab* com haste com 12 cm de comprimento e algodão hidrófilo com 1,5 cm de diâmetro e 2,5 cm de

comprimento, o *swab* deve ser esterilizado e, posteriormente, umedecido em solução-tampão-fostato. O *swab* umedecido deve ser aplicado, friccionando o algodão três vezes em direção a cada um dos dedos a partir do punho. Em seguida, a começar do punho, friccionando-se o algodão do mesmo *swab* entre os dedos, retornando novamente ao punho (Figura 3).



Figura 3 - Metodologia do *swab* para coleta em superfícies de mãos

Fonte: Andrade (2008)

As amostras foram colhidas separadamente, com um intervalo de sete dias de descanso entre cada coleta. Os dados foram coletados em um momento zero X_0 e em um momento um X_1 , respectivamente, antes e depois do tratamento com as amostras. O procedimento foi repetido durante sete semanas consecutivas, sendo que a distribuição das amostras por voluntário foi aleatória. A cada sete dias, cada amostra do experimento foi testada por dois voluntários e em duplicata.

A eficiência foi avaliada comparando-se os dados X_0 e X_1 por RD, ou seja, medindo a habilidade de cada um dos produtos testados em reduzir o inóculo de micro-organismos depositado nas mãos dos voluntário.

4.7.2.6 Análise dos resultados

O logarítmo decimal da população de micro-organismos sobreviventes após os tratamentos obtidos pelas contagens das placas foi organizado em planilhas eletrônicas do Microsoft Excel[®]. As RD foram determinadas pelo seguinte cálculo:

$$RD = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_f$$

Em que:

N_0 = número de células antes do tratamento;

N_f = número de células sobreviventes ao tratamento.

A atividade antibacteriana de cada amostra do experimento será avaliada pelo número de ciclos logarítmicos reduzidos na população.

4.7.2.7 Análise estatística

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC) desbalanceado, sendo que o tratamento N_0 apresentou 6 repetições e o tratamento N_f apresentou 14 repetições (2 x 7). Para comparar as médias, foi usado o Teste de Médias TuKey, ou nível de significância (incidência de 5 %). Os resultados foram analisados utilizando-se o software *Statistical Analysis System* (SAS[®]), versão 9.1 e foram apresentados na forma de tabelas estruturadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises de controle de qualidade físico-química do EGAC

Os resultados apresentados na Tabela 2 para densidade e pH do extrato glicólico analisado, estão condizentes com os valores frequentemente aceitos para extratos glicólicos de plantas medicinais diversas e não diferem dos resultados encontrados em outros estudos (BUGNO, *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Tabela 2 - Resumo dos resultados das análises de controle de qualidade físico-químico do EGAC.

Testes realizados	Resultados
Densidade	1,01
pH	5,54
Percentual de resíduo seco (% p/v)	2,42

A análise do percentual de resíduo seco apresentou como resultado 2,24 % p/v, que difere do resultado encontrado por Oliveira e Barretta (2007), que encontrou o valor médio de 1,18 % p/v na análise do extrato glicólico da *Calendula officinalis*. Os autores sugerem que a determinação de extrato seco reflète a concentração do produto obtido do material vegetal, já que este ensaio quantifica, através da eliminação do solvente extrator, as substâncias extraídas da planta. Segundo os mesmos autores, extratos vegetais que não sofreram processo de purificação apresentam teores de flavonóides e de outros biocompostos maiores, quanto maior for o teor de extrato seco no insumo.

O uso de extratos vegetais como matéria-prima para a formulação de fitoterápicos ou fitocosméticos é uma realidade das farmácias e indústrias farmacêuticas, que buscam uma alternativa natural para agregar bioatividade, funcionalidade, valor e apelo de marketing aos seus produtos (CARVALHO, 2006).

A obtenção de insumos farmacêuticos vegetais envolve desde a obtenção da planta medicinal, adequadamente cultivada, colhida e desidratada, avaliada quanto à sua morfologia e qualidade, até o processamento, por meio de técnicas como a infusão, maceração, percolação, filtração, concentração e a secagem, dentre outras. O processo extrator viabiliza o uso do material vegetal, já que o solvente extrai as substâncias ativas das células, proporcionando atividade das mesmas no organismo. Com isso, apesar de

ainda ser vasto o emprego das plantas na medicina tradicional, a manipulação e a industrialização de medicamentos passaram a ser realizadas com os insumos farmacêuticos vegetais na forma de tinturas, óleos essenciais, extratos alcoólicos, extratos glicólicos e extratos secos, uma vez que são formas que proporcionam maior biodisponibilidade das substâncias ativas presentes nas plantas. Além do controle de todo o processo produtivo, há ainda a necessidade da avaliação da qualidade físicoquímica e microbiológica do material vegetal utilizado, bem como do insumo farmacêutico vegetal obtido, para que seja mantida a reprodutibilidade lote-a-lote do produto obtido.

5.2 Análise Farmacognóstica e Triagem Fitoquímica

A Tabela 3 mostra a presença de ácidos orgânicos, derivados da cumarina, flavonóides, esteróides e terpenóides, e a ausência dos demais metabólitos testados. Em estudos anteriores, quanto aos constituintes químicos observados na *Allamanda cathartica* L., foram isolados esteróides (Agrawal *et al.*, 1985), terpenóides (Jewers *et al.*, 1971); flavonóides, cumarinas, lignanas (Abe *et al.*, 1988) e iridóides (Jewers *et al.*, 1971; Coppen *et al.*, 1983; Malheiros *et al.*, 1997 *apud* Silva, 2007). A presença de flavonóides é evidenciada com destaque, assim como determinou Tiago *et al.*, 2009, que concluiu que a principal classe de metabólitos encontrados nas flores dessa espécie, são os flavonóides e destes a rutina está presente como um dos majoritários. A presença de flavonóides e cumarinas podem ser os responsáveis pela propriedade antisséptica do EGAC (FREITAS, 2011), sugerindo também atividade antiinflamatória que já foi evidenciada por Silva, 2007 e atividade citotóxica, evidenciada por Uthaisang; Khawsak (2005).

Tabela 3 – Resumo dos resultados da análise farmacognóstica da *Allamanda cathartica* L.

Grupos	Resultados	Reativos e especificações
Alcalóides	Negativo	Reações de precipitação em presença dos reativos de Dragendorff, Valser-Mayer, Bouchardat e de Bertrand
Flavonóides	Positivo	Solução metanólica do extrato em presença de HCl conc. e óxido de magnésio. Positivo na presença de coloração vermelha
Fenóis e taninos	Negativo	Solução aquosa do extrato adicionado de solução alcoólica de FeCl ₃ a 1 %. Teste positivo quando ocorre mudança de coloração em relação ao branco.
Saponina espumídica	Negativo	Teste de espuma persistente após 20 minutos, em meio ácido.
Glicosídeos cardíacos	Negativo	Reativo de Keede. Coloração azul ou violeta indica reação positiva.
Ácidos orgânicos	Positivo	Reativo de Pascová. Na descoloração do reativo, a reação é positiva.
Açúcares redutores	Negativo	Reativo de Fehling A e B. Positivo na presença um precipitado vermelho tijolo.
Proteínas e aminoácidos	Negativo	Reação de Ninhidrina. A coloração azul-violácea indica presença de aminogrupos.
Antraquinonas	Negativo	Reação de Bornträger (reação em meio básico). Reação positiva com a coloração rósea ou avermelhada
Cumarinas	Positivo	Propriedade de adquirir fluorescência verde quando exposta à radiação ultravioleta em meio alcalinizado pelo NaOH
Esteróides e triterpenóides	Positivo	Reação da solução metanólica do extrato com anidrido acético + H ₂ SO ₄ conc. Desenvolvimento de cor azul ao verde persistente, indica resultado positivo

5.3 Análises de controle de qualidade microbiológico do sabonete líquido com o EGAC a 3 %

De acordo com os resultados apresentados (Tabela 4), o produto encontra-se devidamente dentro das especificações farmacopéicas e, portanto, aprovado quanto ao teste de controle de qualidade microbiológico.

Tabela 4 - Resumo dos resultados das análises de controle de qualidade microbiológica do sabonete líquido com EGAC a 3 %.

Testes realizados	Resultados	Especificação*
Fungos filamentosos e leveduras	$5,5 \times 10^2$ UFC.g ⁻¹	limite máximo 5×10^3 UFC.g ⁻¹
Mesófilos aeróbios	$1,5 \times 10^2$ UFC.g ⁻¹	limite máximo 5×10^3 UFC.g ⁻¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente
Coliformes Termotolerantes	Ausente	Ausente
Coliformes Totais	Ausente	Ausente

*Especificações descritas na Farmacopéia Brasileira, 5ª ed., 2010.

O teste foi realizado a partir de uma formulação preparada magistralmente (individualmente), seguindo as boas práticas de manipulação, e em condições laboratoriais, assépticas. Em escala industrial, é necessária a repetição dessas análises a partir de um lote produzido em escala piloto, para nova avaliação dos resultados e registro do produto.

Avaliando-se os resultados da amostra de acordo com as especificações determinadas pela Organização Mundial de Saúde para limites microbiológicos para fitoterápicos, o sabonete líquido com EGAC a 3 % também pode ser considerado aprovado quanto à pureza microbiológica. A Organização Mundial de Saúde estabelece os seguintes limites para fitoterápicos: 10^5 bactérias aeróbicas/g; 10^3 de fungos filamentosos e leveduras/g; *E.coli* 10/g; outras enterobactérias 10^3 /g e ausência de *Salmonella*, *Shigella* e Clostrídios em 1g para este tipo de produto (WHO, 2011).

No desenvolvimento de formulações individualizadas, magistrais, e formulações em escala-piloto, é de extrema importância que sejam realizadas análises que garantam sua qualidade, dentre elas o controle de qualidade microbiológico, de modo que quando essa formulação passar a ser produzida em escala industrial, os lotes não sejam

invalidados por possíveis problemas farmacotécnicos que possam gerar contaminação bacteriana no produto final (SANTOS; OLIVEIRA; TOMASSINI, 1995).

O sabonete líquido com EGAC a 3 % é considerado um produto não-estéril. Produtos não-estéreis são aqueles nos quais se admite a presença de carga microbiana, embora limitada, tendo em vista as características de sua utilização. A atenção no controle dos produtos não-estéreis assegura que a carga microbiana presente, seja no aspecto qualitativo ou quantitativo, não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do usuário. A presença de estirpes reconhecidamente patogênicas é proibitiva, pois representa potencial risco de aquisição de quadro clínico infeccioso, ou de transferência de toxinas igualmente indesejáveis (OHARA, 2000).

A qualidade microbiana é uma dentre as várias exigências relacionadas com os critérios de segurança a serem considerados com produtos cosméticos viáveis, além de alterar propriedades do produto, pode constituir risco para a saúde do consumidor, principalmente em se tratando de micro-organismos patogênicos (SOUZA; OHARA; SAITO, 1994).

A presença de contaminantes microbianos pode resultar em alterações físico-químicas do produto, comprometendo sua estabilidade e eficácia. Estas alterações ainda que não afetassem o teor do princípio ativo, podem se manifestar pela mudança de cor, aparecimento de odor desagradável e mudanças nos valores de pH (OHARA; SAITO, 1984).

5.4 Testes de estabilidade da formulação fitocosmética

Padronizou-se para os testes de estabilidade as variáveis de verificação do aspecto; cor; odor; comportamento após centrifugação; pH; viscosidade cinemática e densidade, que permitem atestar o caráter adequado para a formulação. Nas amostras analisadas não houve nenhuma modificação visual em relação ao aspecto, cor e odor durante os 60 dias do estudo, comprovando assim a estabilidade da preparação quanto a esses parâmetros, o que é importante do ponto de vista sensorial, uma vez que podem influenciar a compra do produto pelo consumidor (ISAAC, 2008).

Após submeter a amostra do sabonete líquido com EGAC a 3 % (amostra analisada 24h após a fabricação) ao teste de centrifugação, não se observou qualquer tipo de alteração física de aspecto.

O teste de centrifugação é considerado pela ANVISA como teste de triagem e não deve, necessariamente, indicar a estabilidade física real das preparações cosméticas,

porém, é eficiente para pré-selecionar as formulações que devem ser submetidas aos testes de estabilidade acelerada e de prateleira (ANVISA, 2004).

No teste de centrifugação, a força da gravidade atua sobre a amostra fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. O teste de centrifugação produz estresse na amostra, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Essas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, entre outras, e permite avaliar, em curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físico-químicas da formulação (ANVISA, 2004; MORAIS, 2006).

A vida útil de um produto pode ser prevista através da observação de separação de fases que ocorre quando um sistema é submetido a diferentes condições gravitacionais. A ausência de cremeação, no caso de emulsões, ou separação de fases frente ao teste de centrifugação, supõe que esta formulação, em condições normais de gravidade, poderá ser fisicamente estável (ISAAC *et al.*, 2008).

A Tabela 5 mostra os valores encontrados para as variáveis densidade, pH e viscosidade encontrados nos 60 dias do estudo de estabilidade, já a Tabela 6 exibe a análise estatística para as mesmas variáveis. Observa-se diferença significativa ($P < 0,01$) em todas as variáveis, apenas para o fator temperatura.

Tabela 5 - Evolução da densidade, pH e viscosidade medidos durante os 60 dias de estudo da estabilidade do sabonete líquido com EGAC a 3 %, em 5 diferentes condições de exposição de temperatura.

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Densidade	pH	Viscosidade
5 ± 2	1	0,89	5,65	1880
	7	0,89	5,65	1880
	15	0,89	5,65	1882
	30	0,89	5,65	1883
	60	0,89	5,64	1883
10 ± 2	1	0,86	5,91	1961
	7	0,86	5,91	1962
	15	0,86	5,94	1964
	30	0,86	5,93	1963
	60	0,86	5,94	1964
25 ± 2	1	0,89	5,62	1441
	7	0,89	5,65	1442
	15	0,89	5,61	1445
	30	0,89	5,60	1445
	60	0,89	5,61	1446
37 ± 2	1	0,89	5,63	1442
	7	0,89	5,65	1442
	15	0,89	5,61	1442
	30	0,89	5,60	1443
	60	0,89	5,60	1445
50 ± 2	1	0,74	6,06	1124
	7	0,74	6,08	1430
	15	0,74	6,10	2070
	30	0,74	6,11	2085
	60	0,74	6,11	2132

Verifica-se na Tabela 6 que apenas para a variável densidade, a interação entre os fatores temperatura e tempo foi estatisticamente não significativa ($P > 0,05$), indicando que estes fatores atuam de forma independente. É possível então concluir, por exemplo, que para qualquer período de tempo avaliado, a menor densidade pode ser observada com a temperatura de 50 °C, como pode ser visto na Figura 4. Além disso, de acordo com a análise de variância pode-se constatar que há diferenças significativas ($P < 0,01$) entre as temperaturas utilizadas.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para as variáveis densidade, pH e viscosidade.

FV	GL	Quadrados Médios		
		Densidade	pH	Viscosidade
Tempo (T)	17	0,0000003 ^{NS}	0,00154 ^{**}	99407,0 ^{**}
Temperatura (Te)	4	0,2190831 ^{**}	2,32522 ^{**}	3516625,0 ^{**}
T x Te	68	0,0000005 ^{NS}	0,00088 ^{**}	97139,0 ^{**}
Resíduo	180	0,0000004	0,00047	3364,0
Média		0,8543	5,7825	1645,0
CV%		0,0740	0,3749	3,5258

^{NS}, ^{**}: não significativo ($P < 0,05$) e significativo ($P < 0,01$) pelo teste F, respectivamente.

Para as variáveis pH e viscosidade, observa-se na Tabela 6 que a interação entre os fatores temperatura e tempo é significativa ($P < 0,01$), indicando que estes fatores não atuam de forma independente. Observa-se também que há diferença significativa ($P < 0,01$) quando se analisa as variáveis tempo e temperatura isoladamente, concluindo-se que tanto o tempo do estudo (60 dias) quanto as temperaturas (5 temperaturas) a que a amostra foi submetida, influenciaram na oscilação do pH e da viscosidade, o que se pode observar claramente na análise das Figuras 5 e 6.

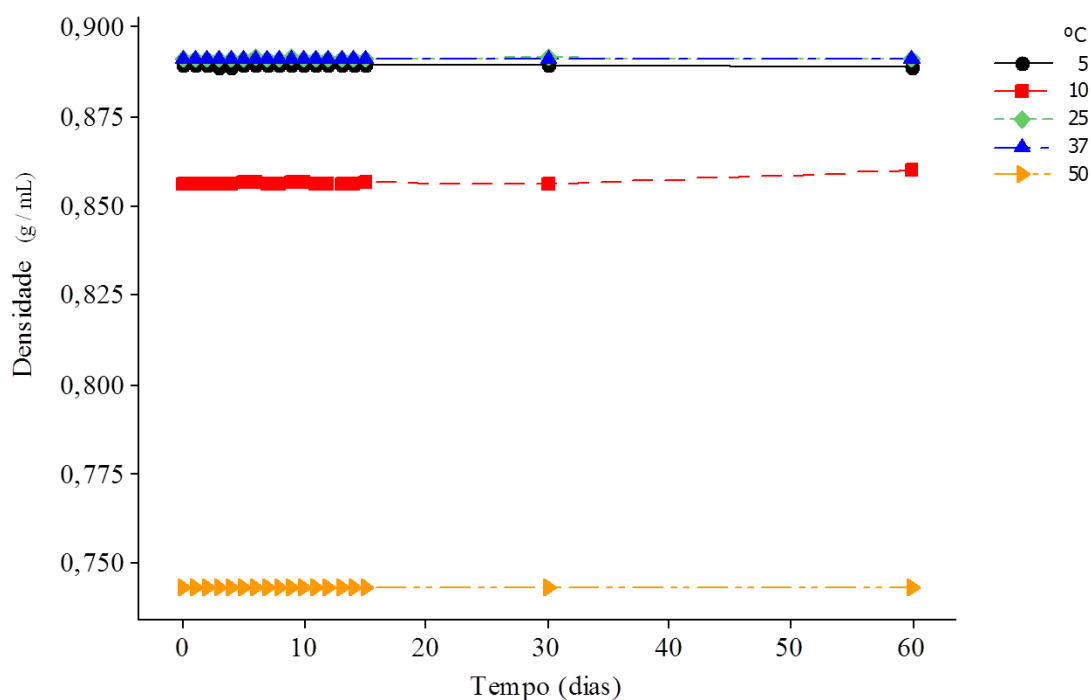


Figura 4 - Dispersão dos valores de densidade em função do tempo de avaliação, em 5 diferentes temperaturas.

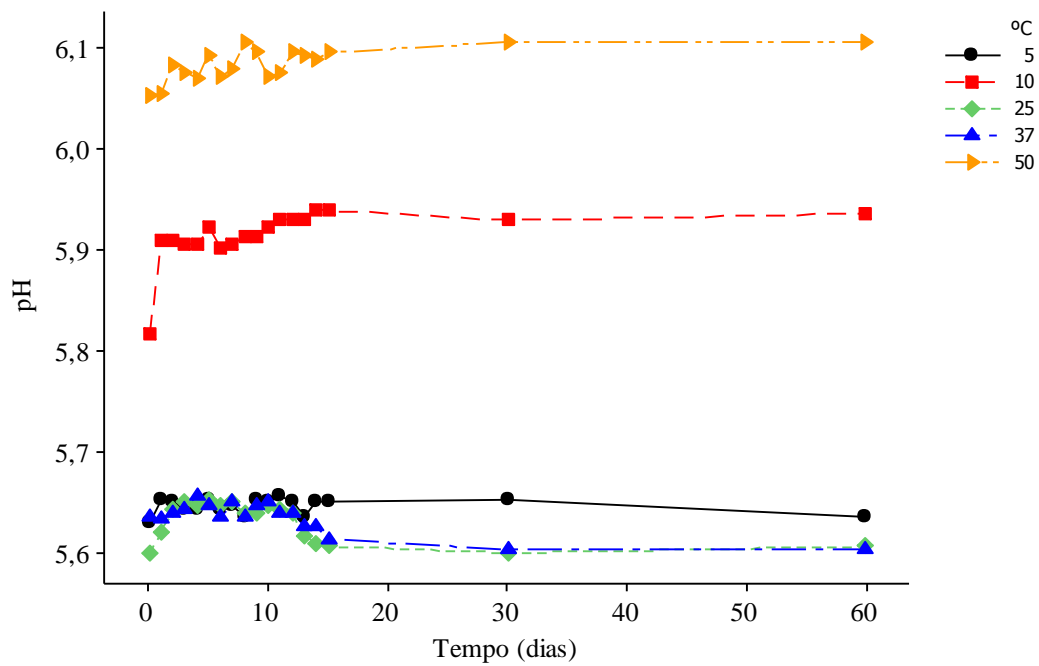


Figura 5 - Dispersão dos valores de pH em função do tempo de avaliação, em 5 diferentes temperaturas.

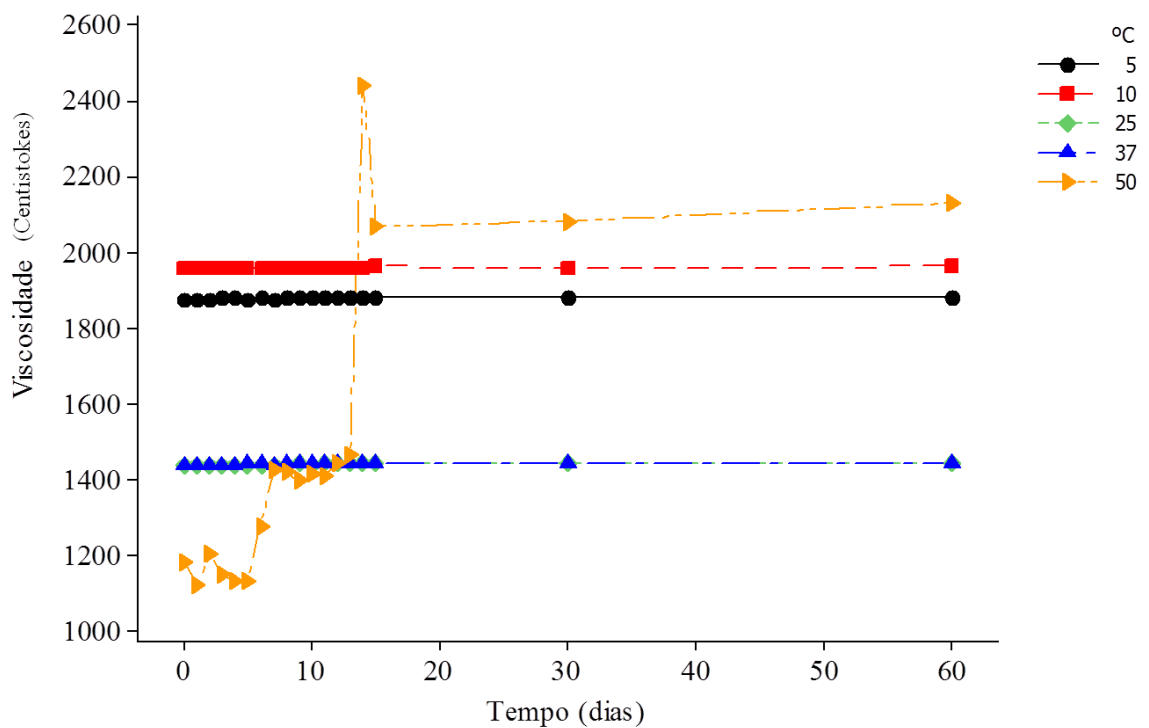


Figura 6 - Dispersão dos valores de viscosidade em função do tempo de avaliação, em 5 diferentes temperaturas.

Observa-se, entretanto, nas duas últimas linhas da Tabela 6, as médias dos valores encontrados para as variáveis densidade, pH e viscosidade, bem como os

valores dos coeficientes de variação. Os dados mostram que a densidade variou 0,074 %, o pH variou 0,37% e a viscosidade variou 3,52 % em relação às respectivas médias, frente a 5 temperaturas diferentes e durante os 60 dias de estudo. Como pode ser verificado nas Tabelas 5 e 6, os valores não sofreram variação maior que 10 %, o que representa, para a variável pH, a manutenção de valores entre 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo. Valores baixos de pH podem estar relacionados ao aparecimento de irritação dérmica cumulativa (ISAAC; UCHIYAMA, 1998; CORRÊA, *et al.*, 1997), e ser devido à degradação de qualquer componente do fitocosmético (ISAAC, 2008; MASSON, 2005). Em relação à densidade, a pequena variação de 0,07 % não é suficiente para determinar que esta propriedade promovesse instabilidade na preparação ensaiada, uma vez que diversos autores aceitam a variação dos valores da densidade inferior a 10 %, e estabelecem que valores superiores a 20 % de variação podem significar instabilidade da preparação (ISAAC, 2008; MASSON, 2005; SPEROTO, *et al.*, 2007) .

A variação da viscosidade pode ser influenciada diretamente pelos valores do pH e da densidade. Entretanto, segundo Speroto, *et al.* (2007), é aconselhável que essa variação não ultrapasse 10 % em relação à média. No presente estudo, encontrou-se uma variação em torno da média de 3,52 % (Tabela 6) da densidade, não interferindo, portanto, na estabilidade do produto.

A formulação desenvolvida apresentou valores de pH entre 5,60 a 6,11, durante todos os dias do teste, e em todas as condições de armazenamento relativas às temperaturas testadas, os quais são compatíveis com as matérias-primas utilizadas e biocompatíveis com o pH fisiológico da pele. Nota-se também na Tabela 6 que as maiores variações do pH e da viscosidade aconteceram nas amostras submetidas à temperatura de 50 °C. O pH e as características sensoriais permitem observar se as matérias-primas estão sofrendo ou não degradação com o armazenamento. Além disso, deve-se relevar o fato de que o produto é destinado a lavagem das mãos de manipuladores de alimento, que lavam as mãos com muita frequência e que, portanto, podem apresentar sensibilidade aflorada a uma agressão física. Portanto, se o pH não for o ideal, podem ocorrer outros problemas, como irritabilidade, causando um desconforto ao manipulador podendo, dessa forma, ocasionar a interrupção do uso do produto. Logo, observa-se que a medida do pH do produto é necessária para detectar suas possíveis alterações em função do tempo, assegurando que o valor esteja compatível com os componentes da formulação e com o local de aplicação, evitando, dessa forma, irritações (AZZINI, 1999; CHARRO, 1997; CUNHA, 2009).

A variação significativa nas análises estatísticas para as variáveis de pH, densidade e viscosidade, pode estar relacionada ao fato de que foi utilizado lauril éter

sulfato de sódio, que é um surfactante aniônico muito utilizado no preparo de sabonetes líquidos, por atender aos requisitos de desenvolvimento sustentável e, por ser também facilmente biodegradável, atende aos conceitos de qualidade ambiental. Além disso, pode ser utilizado em associação com outros tensoativos para produzir um bom poder de espessamento, diminuição da irritabilidade dérmica e melhoria da performance de limpeza. O lauril éter sulfato de sódio apresenta em sua molécula uma parte hidrófoba, composta pela cadeia graxa do ácido laurílico, e uma parte hidrófila, formada pelo grupo éter sulfato. Atua no abaixamento da tensão superficial, formação de espuma, promove a umectação da superfície e o emulsãoamento da sujeira. Estas características conferem excelente detergência, elevado poder espumante, boa solubilidade em água e espessamento na presença de eletrólitos. Entretanto, seu poder de espessamento pode ser comprometido em presença de substâncias eletricamente carregadas (catiônicas), devido ao seu caráter aniônico, influenciando diretamente na estabilidade do produto (CUNHA; SILVA; CHORILLI, 2009). Além disso, a presença de extrato vegetal na formulação pode alterar a forma cosmética e o comportamento reológico da preparação conforme estudos realizados por Archondo (2003). Em um estudo conduzido por Isaac; Uchiyama (1998), onde avaliou-se a estabilidade de xampus manipulados com extrato de pitanga, as amostras tiveram suas viscosidades alteradas. Assim, acredita-se que a incorporação de um tensoativo secundário não-iônico, como por exemplo, o lauril poliglucosídeo, que é derivado da reação química entre a glicose de amido com um álcool graxo natural de C8-C16, recomendado como um co-surfactante em produtos para uso externo, poderá conferir à formulação maior estabilidade físico-química, com linearidade frente a análises estatísticas.

Frente aos resultados apresentados, pode-se concluir que a formulação do sabonete líquido com EGAC a 3 % possui estabilidade físico-química adequada.

O desenvolvimento de uma formulação fitocosmética, tendo como princípio ativo um extrato vegetal, suscita desafios interessantes, pois muitas vezes a adição desses compostos pode provocar problemas de instabilidade ou diminuição de viscosidade, requerendo a comprovação de que os veículos utilizados favoreçam não somente a estabilidade do produto final, mas a eficácia proposta (Di MAMBRO, *et al.*, 2004; FREITAS, 2011). Portanto, na pesquisa e desenvolvimento de formulações contendo extratos vegetais, vários estudos devem ser realizados visando à obtenção de produtos estáveis, seguros e eficazes. Nesse sentido os estudos de estabilidade física são primordiais para verificar se as características iniciais exigidas para uma formulação de qualidade mantêm-se durante todo o seu prazo de validade.

O estudo da estabilidade das formulações fornece informações sobre o grau de estabilidade relativa de um produto nas diversas condições a que possa estar sujeito, desde a fabricação até o término da sua validade (BRASIL, 2004). Este estudo contribui para a orientação no aperfeiçoamento das formulações, do material adequado de acondicionamento, na estimativa do prazo de validade e informações sobre confiabilidade e segurança dos produtos.

5.5 Avaliação da atividade antisséptica do extrato puro de *Allamanda cathartica* e do sabonete líquido, contendo o mesmo extrato

A atividade antimicrobiana do sabonete líquido contendo extrato de *Allamanda cathartica* foi avaliada mediante dois testes distintos. O primeiro teste foi a inibição da multiplicação microbiana por difusão em Ágar, que ocorreu frente às bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e gram-negativa (*E.coli*) e teve como objetivos a avaliação da atividade antisséptica do EGAC puro e do sabonete líquido contendo o extrato, além da determinação da concentração de uso ideal do EGAC no sabonete líquido. Um sabonete líquido contendo triclosan a 1% foi o produto escolhido para controle positivo.

5.5.1 Teste da avaliação antimicrobiana por difusão em ágar

O diâmetro do halo de inibição das bactérias estudadas foi diferente significativamente ($p < 0,5$) em função dos micro-organismos analisados e das amostras avaliadas, conforme foi demonstrado na Tabela 7.

Não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os resultados do sabonete líquido com EGAC a 5 %, em comparação ao mesmo produto a 3% e ao controle positivo sabonete com triclosan a 1 %, de acordo com os dados demonstrados na Tabela 8. Essa última amostra difere significativamente ($P < 0,05$) da amostra do sabonete líquido puro, sem adição do extrato. Em relação ao *S. aureus*, verifica-se que não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os resultados do sabonete líquido com EGAC a 5 %, 3 % e 1 %, que também não diferem em relação ao controle sabonete com triclosan a 1%. Em relação à *E.coli*, os resultados da amostra com triclosan a 1 % diferem significativamente da amostra do sabonete líquido puro, sem adição do extrato.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para a variável tamanho do halo (em cm) de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*, após contato com os produtos contendo o EGAC.

FV	GL	Quadrados Médios	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Tratamentos	4	1,9027*	1,7712*
Resíduo	10	0,3155	0,5313
Média		1,56	0,937
CV%		35,82	77,79

* significativo pelo teste F ($P < 0,05$)

Tabela 8 - Comparações entre médias de tamanho do halo (em cm) das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, após contato com os produtos contendo o EGAC.

Tratamentos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Sabonete com EGAC a 5 %	2,056 a	1,139 ab
Sabonete com EGAC a 3%	1,722 a	1,211 ab
Sabonete com EGAC a 1%	1,317 ab	0,372 ab
Sabonete puro	0,339 b	0,000 c
Sabonete com Triclosan a 1 %	2,406 a	1,961 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A bactéria gram-negativa *E. coli* foi menos sensível à ação do produto contendo o EGAC do que *S. aureus* (Tabela 8). Em um estudo realizado por Fernandes (2010), e em um outro por Murguia *et al.* (2008), também foi relatado que as bactérias gram-positivas foram mais sensíveis que as gram-negativas a uma formulação com surfactante iônico, no mesmo tipo de teste realizado. De acordo com os autores isso é devido ao fato de a membrana externa das bactérias gram-negativas serem menos permeáveis a compostos anfifílicos.

As amostras também foram testadas contra a bactéria *S. epidermidis*, que se mostrou resistente, não apresentando halo de inibição em nenhuma das repetições, para todas as amostras testadas.

A concentração do extrato de *A. cathartica*, no sabonete líquido, selecionada para o teste com manipuladores, foi de 3%, uma vez que não mostrou diferença em comparação à amostra a 5 %. Além disso, de acordo com a Figuras 7 e 8, quando se compara os resultados do sabonete líquido com EGAC a 3 % frente às duas bactérias *E. coli* e *S. aureus*, não se observa diferença estatística ($P \geq 0,05$), de acordo com o teste t. Portanto, para produção industrial, a concentração do extrato de *Allamanda cathartica* a 3 % no sabonete líquido é mais viável tanto pelo lado financeiro, quanto em relação à tecnologia de fabricação, pois quanto menor o percentual de extratos vegetais no

produto, menor influência sobre as propriedades físico-químicas como viscosidade, poder espumógeno e capacidade de limpeza ou detergência (MIGLIATO, *et al.*, 2009).

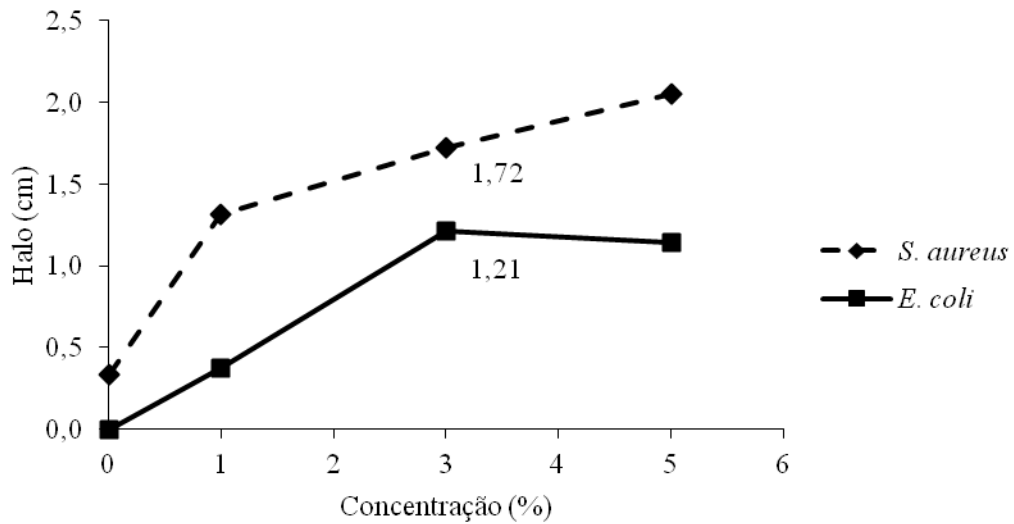


Figura 7 - Dispersão dos valores de tamanho de halo (em cm) das espécies *S. aureus* e *E. coli*, em função da concentração do extrato glicólico de *Allamanda cathartica* L. no sabonete líquido proposto.



Figura 8 - Imagem do halo de inibição contra *S. aureus*, utilizando-se as três concentrações do EGAC no sabonete líquido.

5.5.2 Teste em uso simulado

No teste de uso simulado, pela avaliação da eficiência do sabonete líquido contendo EGAC sobre suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*, aplicadas em mãos de voluntários, os resultados observados na Tabela 9 mostram que houve efeito significativo ($P \geq 0,05$) dos tratamentos, para os ciclos de reduções logarítmicas das duas bactérias em estudo.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para as variáveis reduções logarítmicas de *S. aureus* e de *E. coli*, após o teste em uso simulado

FV	GL	Quadrados Médios	
		Reduções <i>S. aureus</i>	Reduções <i>E. coli</i>
Tratamentos	2	0,8798*	1,9279*
Resíduo	15	0,2431	0,4100
Média		1,44	1,69
CV%		34,23	37,88

* significativo pelo teste F ($P < 0,05$)

De acordo com o teste de Tukey (Tabela 10), verifica-se que há diferenças entre as médias de ciclo de reduções logarítmicas de “sabonete líquido com EGAC a 3 %” e “sabonete líquido puro”, para as duas bactérias em estudo. Para ambas, pode-se observar ainda que os tratamentos “sabonete líquido com EGAC a 3 %” e “sabonete líquido com triclosan a 1 %” não diferiram estatisticamente.

Tabela 10 - Comparações entre médias de ciclos de reduções logarítmicas das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, após o teste em uso simulado

Tratamentos	Reduções <i>S. aureus</i>	Reduções <i>E. coli</i>
Sabonete líquido com EGAC a 3 %	1,7 a	2,0 a
Sabonete líquido com triclosan a 1 %	1,6 ab	2,0 a
Sabonete puro	1,0 b	1,0 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna e na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que o sabonete líquido contendo EGAC a 3 % possui efeito bactericida contra bactéria gram-positiva e gram-negativa, uma vez que não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) na atividade antimicrobiana para os dois patógenos testados. Além disso, também não foi encontrada diferença significativa entre sabonete líquido com EGAC a 3 % e o sabonete líquido com triclosan a 1 %, que tem seu poder antimicrobiano e antifúngico conhecido, uma vez que tem sido utilizado há mais de 30 anos em produtos para a pele, como

sabonetes, desodorantes e cremes. O triclosan também é o ingrediente ativo em muitas formulações de higiene oral (MIGLIATO, 2009; TANOMARU; *et al.*, 2008).

Em um estudo conduzido por McMurry (1998), ficou demonstrada a atividade antibacteriana do triclosan contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, devido à sua capacidade de bloquear a síntese de ácidos graxos por inibição da enzima transportadora enoil-acil redutase. Em outro estudo conduzido por Tanomaru, *et al.* (2008), foi observada a ação antisséptica do triclosan contra a bactéria gram-positiva, *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana demonstrada pelo sabonete líquido com EGAC a 3 % pode ser explicada pela presença dos flavonóides e da cumarina (1,2-benzopirona), que é um dos principais metabólitos secundários do extrato de *A. cathartica*, além do sinergismo de todos os constituintes fitoquímicos evidenciados (OSÓRIO; MARTINS, 2004). Diversos estudos demonstram que a cumarina apresenta ações farmacológicas, como antiinflamatória e antimicrobiana. Acredita-se também que a cumarina tenha a propriedade de inibir o crescimento do *S. aureus* e *Candida albicans* (AMARAL *et al.*, 2009; OSÓRIO; MARTINS, 2004; SILVA *et al.*, 2008). Os flavonóides demonstraram atividade moluscicida, antiinflamatória e analgésica em um estudo conduzido por Borella (2002).

O *S. aureus* é um importante patógeno humano, responsável por uma série de infecções alimentares e hospitalares (TANOMARU; *et al.*, 2008). Este micro-organismo é capaz de colonizar vários locais do corpo humano, mas a boca, as narinas e as mãos são os principais reservatórios para a propagação desta bactéria no ambiente (LOWY, 1998).

Surtos de intoxicação alimentar são freqüentemente relatados e os causados por *S. aureus* são os mais comuns, pois havendo no alimento condições favoráveis à sua multiplicação, em poucas horas, certas estirpes produzem uma toxina termoestável que é responsável pelo quadro clínico. Portanto, o controle de *S. aureus* é extremamente relevante para a determinação das propriedades antissépticas de produtos de higiene (RADDI, 1988).

A *E. coli* apresenta grande frequência entre os micro-organismos isolados em ambiente hospitalar (SANCHES, 2004), sendo também um dos principais micro-organismos causadores de infecções urinárias, septicemias e meningites bacterianas em neonatais (KAHLMETER, 2003). Além disso, esse micro-organismo pode ser veiculado por alimentos contaminados.

5.5.3 Avaliação da atividade antibacteriana do EGAC

A avaliação da atividade antibacteriana do EGAC demonstrou nitidamente atividade desse extrato contra *E. coli* e *S. aureus* no teste *in vitro* de inibição da multiplicação microbiana por difusão em Ágar. A Figura 9 mostra o halo de inibição formado contra *E. coli* utilizando-se o EGAC como amostra.



Figura 9 - Imagem do halo de inibição contra *E. coli*, utilizando-se o EGAC.

Os valores relativos às médias dos halos de inibição obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana do EGAC através do método de difusão em ágar podem ser observados na Tabela 11.

O potencial farmacológico para uso desse extrato pode ser evidenciado em diversos estudos com a planta. Em um estudo conduzido por Uthaisang; Khawsak (2005) as folhas da *Allamanda cathartica* apresentaram alta atividade citotóxica contra três tipos de células cancerosas: carcinoma de colo-retal; carcinoma cervical e hepatocarcinoma. O extrato aquoso das folhas da *Allamanda cathartica* também mostrou significativa atividade cicatrizante em um estudo com ratos conduzido por Nayak, *et al.* (2006).

Tabela 11 - Resumo das médias de tamanho do halo de inibição (em cm) das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, frente ao extrato puro de *Allamanda cathartica* L.

Amostra	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Extrato puro de <i>Allamanda cathartica</i> L.	5,16	2,51

A presença e o sinergismo dos metabólitos secundários evidenciados na triagem fitoquímica, principalmente as cumarinas e os flavonóides, parecem ser os responsáveis pela atividade antibacteriana, conforme descrito no item 5.2.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Na triagem fitoquímica, a partir do extrato seco da *Allamanda cathartica* L., realizada para caracterização de classes de metabólitos secundários, indicou a presença predominante de flavonóides e cumarinas, além de ácidos orgânicos, esteróides e terpenóides;
- A atividade antimicrobiana observada *in vitro*, para o EGAC puro, incentiva novas pesquisas com partes isoladas do vegetal, com seus metabólitos secundários isoladamente, bem como testar sua atividade frente a outros micro-organismos, com o intuito de estabelecer o constituinte ou os constituintes químicos responsáveis por tal atividade;
- No controle de qualidade físico-químico do EGAC foram realizados testes de determinação de pH (5,54), densidade (1,01 g.mL⁻¹) e percentual de resíduo seco (2,42 % p/v). Os resultados encontrados estão condizentes com os valores frequentemente aceitos para extratos glicólicos de plantas medicinais diversas.
- Pela avaliação da estabilidade do sabonete líquido com EGAC a 3 %, observou-se que a incorporação do extrato pode ter alterado alguns dos parâmetros avaliados como pH, viscosidade e densidade. No entanto, estas alterações não prejudicaram a estabilidade da formulação do sabonete líquido e a adequabilidade desta formulação para seu uso após os 60 dias de teste. Os parâmetros sensoriais não sofreram alterações durante o mesmo período;
- No controle de qualidade microbiológico do sabonete líquido com EGAC a 3 %, realizado em condições laboratoriais, o produto encontra-se devidamente dentro das especificações farmacopéicas. Em escala industrial, é necessária a repetição dessas análises, a partir de um lote produzido em escala-piloto, para nova avaliação dos resultados e registro do produto;

- Na avaliação da atividade antibacteriana, *in vitro*, pelo teste de difusão em ágar, o sabonete líquido com EGAC a 3 %, mostrou-se eficaz contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus* (gram-positivo) e *Escherichia coli* (gram-negativo), não mostrando diferença significativa para a concentração do extrato a 5 %. O produto também apresentou halos com diâmetros próximos daqueles produzidos pela amostra de sabonete líquido com triclosan a 1 % para estes micro-organismos;
- De maneira similar, o sabonete líquido com EGAC também mostrou atividade antibacteriana pelo teste do uso simulado do produto. Aplicando-se o tratamento estatístico para a avaliação da eficácia do produto, as médias de RD não foram diferentes, significativamente, frente aos diferentes patógenos testados (Gram-positivo e Gram-negativo). Além disso, o sabonete líquido com EGAC a 3 % demonstrou atividade antisséptica similar ao sabonete líquido com triclosan a 1 %, que é um produto de uso consolidado para essa finalidade.

O uso de ingredientes ativos de origem natural em cosméticos agrega bioatividade, funcionalidade e apelo de marketing ao produto, o que estimula vários pesquisadores a estudos similares, mostrando, assim, a importância da associação da tecnologia com a cultura popular para estudo e conseqüente uso de ingredientes naturais em cosméticos.

Considerando o promissor conjunto de resultados deste trabalho, estudos adicionais que determinem as partes isoladas do vegetal responsáveis pela atividade, podem resultar no desenvolvimento de uma alternativa antisséptica nova e importante para uso do produto desenvolvido não só na antissepsia de mãos de manipuladores de alimentos, como também o aproveitamento do ingrediente ativo em outros produtos das indústrias farmacêutica e cosmética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos.** Brasília, 2004. (Séries Temáticas. Qualidade, v.1). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm>. Acesso em: 02 jan. 2012.

_____. **Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos,** maio, 2003 a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>>. Acesso em: 02 jan. 2012.

_____. **Resolução RE n. 1 de 29 de julho de 2005.** Guia para a realização de estudos de estabilidade. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word=resolu%C3%A7%C3%A3o%20re>>. Acesso em: 02 jan. 2012.

ABE, F.; CHEN, R.F.; YAMAUCHI, T.. **Studies on the constituents of Plumeria. Part I. Minor iridoids from the roots of *Plumeria acutifolia*.** *Chem. Pharm. Bull.* 36:2784-2789, 1988.

AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S.. **¹³C NMR Spectroscopy of lignan and neolignan derivatives.** *Magn. Reson. Chem.* 23 (6) :389-418, 1985.

AKUTSU, R. C. *et al.* **Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação.** *Rev. Nutr.* [online]. 2005, vol.18, n.3, pp. 419-427. ISSN 1415-5273.

ALMEIDA, I.F. & BAHIA, M.F. **Reologia: interesse e aplicação na área cosmético-farmacêutica.** *Cosmet. Toiletries*, 2003, 15(3): 96-100.

AMARAL, M. P. H.; VIEIRA, F. P.; LEITE, M. N.; AMARAL, L. H.; PINHEIRO, L. C.; FONSECA, B. G.; PEREIRA, MM. C. S.; VAREJÃO, E. V. **Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2009, vol.19, n.2b, pp. 607-611. ISSN 0102-695X.

ALVES, M. G.; UENO, M.. **Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos.** *Rev. Nutr.* [online]. 2010, vol.23, n.4, pp. 573-580. ISSN 1415-5273.

ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo: Varela, 2008. 412p.

ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S.. **Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição.** *Ciênc. agrotec.* [online]. 2003, vol.27, n.3, pp. 590-596. ISSN 1413-7054.

ANTUNES, Rossana M. Pessoa *et al.* **Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2006, vol.16, n.4, pp. 517-524. ISSN 0102-695X.

ARCHONDO, A. E. D. L. **Sistematização do desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo extrato de *Centella asiática L.*** (Urban). [Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2003.

ARDISSON, L.; GODOY, J. S.; FERREIRA, L. A. M.; STEHMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G. L. **Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 12, n. 1, p. 27-34, 2002.

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

BARBOSA, W. L. R. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais.** *Revista Científica da UFPA*, Belém, v. 4, p. 12-19, 2001.

BEZERRA, I. N.; SICHIERI, R. **Características e gastos com alimentação fora do domicílio no Brasil.** *Rev. Saúde Pública* [online]. 2010, vol.44, n.2, pp. 221-229. ISSN 0034-8910.

BLACK, R.E.; DYKES, A.C.; ANDERSON, K.E. **Handwashing to prevent diarrhea in day care centers.** *Am J Epidemiol.* 1981;113:445–451

BONOMINI, T. J.; MAFRA, M. M.; TOMCZAK, F. D.; WITTKOWSKI, C.; MATTOS DE, P. A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; MACHADO, M. da S.; MALHEIROS, A.. **Avaliação de flavonóides nas flores da *Allamanda cathartica*, *Allamanda schottii* e *Allamanda blanchettii* por cromatografia líquida de alta eficiência(CLAE).** *32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.* Fortaleza. 2009.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A.. **Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2002, vol.12, n.2, pp. 63-67. ISSN 0102-695X.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T.. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares.** *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2006, vol.42, n.4, pp. 531-537. ISSN 1516-9332.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 275 de 21 de Outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, 06 de novembro de 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 211, de 14 de julho de 2005. Dispõe sobre as normas e os procedimentos necessários para a obtenção do Registro de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes ou de Alterações de Registro.** Diário Oficial da União, Brasília, 15 de julho de 2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação.** Diário Oficial da União, Brasília, 19 de setembro de 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 27 set. 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Cosméticos. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos.** Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 abr. 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC 79, de 31 de agosto de 2000. Estabelece normas e procedimentos para registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e adota a definição de produto cosmético.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 ago. 2000. Seção 1, p.34.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2009. 12 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Cosméticos. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2004. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 abr. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Cosméticos. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2007. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 abr. 2009.

BUGNO, A.; BUZZO, A. A.; NAKAMURA, C. T.; PEREIRA, T. C.; MATOS, D.; PINTO, T. J.A. **Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. vol. 41, n. 4, p. 491-497, 2005.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA, J. M. Jr. **Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios**. The Drug Development in Brazil: Challenges. 2008

CARDOSO, R. C. **Eficiência de agentes sanificantes na redução da microbiota das mãos de manipuladores de alimentos**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Dissertação Mestrado. Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

CARVALHO, C. M. G.; PRUDENTE, L. R.; PEREIRA, A. C.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. **Avaliação da qualidade de extratos vegetais**. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 3, n. 2, p. 53-62, 2006.

CASTRO, J. L. **Medicina vegetal: teoria e prática conforme a naturoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Europa-América. 304p. 1981.

CHARRO, M. B. D. **Sistemas dispersos heterogêneos**. In: JATO, J.L.V. Tecnologia Farmacêutica: aspectos fundamentais de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas. Madri: Editorial Sintesis, 1997. v. 1.p.207-316.

CHORILLI, M.; UDO, M. S.; CAVALLINI, M. E. **Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux GAI-45 TS**. *Revista de Ciência Básica e Aplicada*, 2006, 27: 237-246.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.. **Influência da viscosidade do veículo na liberação in vitro da cafeína**. *Revista Eletrônica de Farmácia*. Vol IV (1), 52-60, 2007.

CHIARADIA, L. D.; MALHEIROS, A.; BOECK, P.; SOUZA, B. S.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.. **Isolamento de metabólitos secundários da *Allamanda cathartica*: modificações estruturais do ácido ursólico**. XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQSUL) Pelotas, RS – 5 a 7 de Novembro de 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI) **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada – oitava edição, M2 – A8, v. 23, n. 1, 2003.

CLIVER, D. O.; KOSTENBADER JR., K. D.. **Disinfection of virus on hands for prevention of food-borne disease**. *International Journal of Food Microbiology*, 1 (2), pp. 75-87. 1984.

COELHO, A. Í. M. *et al.* **Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais**. *Ciênc. saúde coletiva* [online]. 2010, vol.15, suppl.1, pp. 1597-1606. ISSN 1413-8123.

CONRADO, M. F. L.; CORDEIRO, P. P. M. **Gestão Farmacotécnica Magistral**. Volume 1 - 1ª edição. Balneário Camboriú, 2006.

COPPEN, J.J.W.; COBB, A.L.. **The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda*.** *Phytochem.* 22: 125-128, 1983.

CORDEIRO, H. G. C., SACRAMENTO, L. V. S., CORRÊA, M. A., PIZZOLITTO, A. C., BAUAB, T. M. **Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* vol. 42, n. 3, jul./set., 2006;

CORRÊA, M. A.; BIM, A. V. K.; SILVA, B. N. P.; MAZZER, D. F. **Influência do pH sobre a viscosidade de shampoos formulados com a presença ou não de detergentes anfóteros.** In: 44ª Jornada Farmacêutica da Unesp, 1997, p.34.

CORREA, N. M.; CAMARGO JUNIOR, F. B.; IGNACIO, R. F.; LEONARDI, G. R.. **Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos.** *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2005, vol.41, n.1, pp. 73-78. ISSN 1516-9332.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994;

CRESPO, M. S.; CRESPO, J. M. R. S. **Formularium – Compêndio de Fórmulas Magistrais.** Vol 1. Pharmabooks: São Paulo, 2002.

CRESPO, M. S. **Florais da Mata Atlântica – Essências Florais de Espécies Nativas da Mata Atlântica Brasileira.** RCN Editora: São Paulo, 2010.

CRESPO, M. S. **Flores del Bosque Atlántico.** Mundo Nuevo: Santiago, Chile, 2010.

CRISLEY, F. D.; FOTER, M. J.. **The use of antimicrobial soaps and detergents for hand washing in foodservice establishments.** *J. Milk Food Technol.,* 28: 278-84, 1965.

CUNHA, A. R.; SILVA, R. S.; CHORILLI, M.. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de formulações de xampu anticasta acrescidas ou não de extratos aquosos de hipérico, funcho e gengibre.** *Rev. Bras. Farm.,* 90(3): 190-195, 2009.

DUBUISSON-QUELLIER, S.. **Confiance et Qualité des Produits Alimentaires: une Approche par la Sociologie des Relations Marchandes.** *Sociologie du Travail,* vol. 45, no 1, pp. 95-111. 2003.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; SCHELESKY, M. E. **Doseamento da potência da ciprofloxacina em comprimidos orais.** *Revista Brasileira de Farmácia,* v. 86, n. 1, p. 17 –20, 2005.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu; 2001. pt.2. p.146.

Farmacopéia Brasileira. 5.ed. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ed. eletrônica disponível em http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf. Brasília: 2010. vol 1.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. **Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,* 2006, 42(3): 369-394.

FERNANDES, P. E. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano.** Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Dissertação Mestrado. Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.. **Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2005, vol.15, n.2, pp. 178-182. ISSN 0102-695X. doi: 10.1590/S0102-695X2005000200018.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento, estabilidade e eficácia de formulações fotoprotetoras contendo extrato de *Matricaria chamomilla* e seus componentes isolados**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Mestrado, 2011.

GIBSON L. L.; ROSE, J. B.; HAAS, C. N.; GERBA, C. P.; RUSIN, P. A.. **Quantitative assessment of risk reduction from hand washing with antibacterial soaps**. *Journal of Applied Microbiology* Symposium Supplement 2002, 92, 136S–143S. 2002 The Society for Applied Microbiology. 2002 The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology* Symposium Supplement, 92, 136S–143S

HAIDA K. S.; PARZIANELLO L.; WERNER S.; GARCIA D. R.; INÁCIO C. V. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais**. *Arq Cienc Saude Unipar* 11: 185-192. 2007

HANDBOOK of Pharmaceutical Excipients. 2. Ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1994. 651 p.

IHA, S. M. *et al.* **Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética**. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2008, vol.18, n.3, pp. 387-393. ISSN 0102-695X.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; SALGADO, H.R.N. & CORRÊA, M.A. **Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos**. *Rev. Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, 2008, 29(1):81-96.

ISAAC, V. L. B.; UCHIYAMA, C. L. **Influência da combinação de tensoativos associada a agentes espessantes na viscosidade de xampus**. In: 45ª Jornada Farmacêutica da UNESP; 1998 ago 9-14; Araraquara, SP. Araraquara; 1998b. p.11.

JEWERS, K.; MANCHANDA, A.H.; CASTILLO, A.V.. **Constituents of *Allamanda cathartica***. *Asian J Pharm.* 2:5-8. Julsing, 1971.

KAHLMETER, G. **An internacional survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: The ECO. SENSProject**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 69-76, 2003.

KIRCHNER, K. *et al.* **Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil**. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. ahead of print, pp. 0-0. Epub 07-Maio-2010. ISSN 0102-695X.

LIMA, K. M. MELO, R. S. MONTENEGRO, F. **Espécies fúngicas isoladas a partir de unhas de manipuladores de alimentos**. *RBAC*, vol. 39(3): 193-196, 2007.

LIMA J.L.; OLIVEIRA L.F.. **O crescimento do restaurante *self-service*: aspectos positivos e negativos para o consumidor**. *Hig Aliment.* 2005; 19(128):45-53.

LITZ, V. M.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; PILOTTO, F. **Anti-sepsia de mãos na indústria de carnes: avaliação da clorhexidina, triclosan e iodóforo na redução da contaminação microbiana em manipuladores**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(3): 321-326, 2007.

LOPES; RITTER; RATES. **Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 1098p. 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. 1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512p. 2002.

- LOWY, F.D. **Staphylococcus aureus** infections. *N. Engl. J. Med.*, 339 (8), 520-532. 1998.
- MACHADO, A. A.; NAKASHIMA T.; SILVA W. A.; KRÜGER E. R. **Contribuição ao estudo fitoquímico e citotóxico de *Synadenium carinatum* Boiss (EUPHORBIACEAE).** *Revista Eletrônica de Farmácia*. Vol 9 (2), 1 – 24, 2011.
- MALHEIROS, A.; SCHUQUEL, I. T. A.; VIDOTTI, G. J.. **Atribuição inequívoca de deslocamentos de RMN 1 H e 13 C de plumierídio isolado de *Allamanda cathartica*.** *Química Nova*. (20) 5: 457-459, 1997.
- MASSON, D. S. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes.** [Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; 2005.
- MAZON, M. S. - *Revista de Ciências Sociais*, Rio de Janeiro, Vol. 52, no 4, 2009, pp. 1003 a 1045.
- MCMURRY, L.M.; OETHINGER, M.; LEVY, S.B. **Triclosan targets lipid synthesis.** *Nature*, 394, 531-532. 1998.
- MICHELIN, D.C. *et al.* **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2005, vol.15, n.4, pp. 316-320. ISSN 0102-695X.
- MORAIS, G. G.. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para taratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite).** São Paulo, 2006. 181p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.
- MOREIRA, F. **As plantas que curam.** São Paulo: Hemus. 256p. 1985.
- MUNDY, L. M. **Contamination, acquisition, and transmission of pathogens: implications for research and practice of infection control.** *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29(7):590-2.
- MURGUIA, M. C.; CRISTALDI, M. D.; PORTO, A.; CONZA, J.; GRAU, R. J. **Synthesis, surface-active properties, ando antimicrobial activities of new neutral and cationic trimeric surfactantes.** *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 1, p. 41-48, 2008.
- NASCIMENTO, P.F.C. *et al.* **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2007, vol.17, n.1, pp. 108-113. ISSN 0102-695X.
- NAYAK, S., NALABOTHU, P. SANDIFORD, S., BHOGADI, V.; ADOGWA, A. **Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica* L. and *Laurus nobilis*.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:12. 2006.
- OHARA, M.T.; SAITO, Takako. **Contaminação Microbiana em Soluções para Uso Oral.** *Revista Brasileira de Farmácia e Bioquímica*. 20(1): 17 – 27. 1984.
- OHARA, M.T.; FISCHER, D.C.H.; SAITO, Takako. **Contaminação Microbiana em Condicionadores de Cabelo.** *Revista Brasileira de Farmácia e Bioquímica*. 27(1), 1991.
- OLIVEIRA A.C.; SILVA R. S. **Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão.** *Rev Elet Enferm* 10: 189-197. 2008.
- OSORIO, A. C.; MARTINS, J. L. S. **Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem.** *Rev. Bras. Cienc. Farm.* [online]. 2004, vol.40, n.4, pp. 481-486. ISSN 1516-9332.

- OSTROSKY, E. A.. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2008, vol.18, n.2, pp. 301-307. ISSN 0102-695X.
- PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; ROCHA, M. F.. **Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física.** *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008, vol.44, n.2, pp. 249-259. ISSN 1516-9332.
- PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; CORRÊA, N. M. N.; LEONARDI, G. R..**Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de uréia dispersada, ou não, em propilenoglicol.** *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2009; 30(1):47-53.
- RATES, S. M. K.. **Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2001, vol.11, n.2, pp. 57-69. ISSN 0102-695X.
- REARDON, T. *et al.* **The Rise of Supermarkets in Africa, Asia and Latin America.** *American Journal of Agricultural Economics*, vol. 5, no 85, pp. 1140-1146. 2003
- RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; SANDOVAL, JR., J. C. S.; AMORIM, L. L. R. S. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F., **Controle de qualidade físico-químico de matérias-primas vegetais.** *Revista Eletrônica de Farmácia, suplemento.* v. 2, n. 2, p. 176-179, 2005.
- RIBEIRO, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas usadas na medicina popular da Amazônia.** Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. Belém, 2008.
- ROTTER, M.; SATTAR, S.; DHARAN, S.; ALLEGRANZI, B.; MATHAI, E.; PITTET, D.. **Methods to evaluate the microbicidal activities of hand-rub and hand-wash agents.** *Journal of Hospital Infection* (2009) 73, 191e199. Available online 3 September 2009.
- SANCHES, A. C. C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos.** Dissertação Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP; 2004.
- SANTOS, P. R. V.; OLIVEIRA, A. C. X.; TOMASSINI, T. C. B. **Controle Microbiológico de produtos Fitoterápicos.** *Revista Brasileira de Farmácia e Bioquímica.* 3(1): 35 – 38, 1995.
- SCHULZ V.; HÄNSEL R.; TYLER V. **Fitoterapia racional: Um guia para as ciências da saúde.** Barueri: Manole, 2002. 386 p.
- SILVA, C. R.; GOMES, V. S.; KULKAMP, I. C.; KANIS, L. A.. **Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2008, vol.18, n.4, pp. 594-599. ISSN 0102-695X.
- SILVA, C. V. *et al.* **Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2010, vol.20, n.3, pp. 355-360. ISSN 0102-695X.
- SILVA, J. O.; CAPUANO, D. M.; TAKAYANAGUI, O. M.; GIACOMETTI JR. E.. **Enteroparasitoses e oncomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 8, n. 4, p. 385-92, 2005.
- SILVA, K. A. B. S.. **Caracterização dos efeitos do Plumierídeo, um iridóide isolado de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), em modelos de inflamação e dor.** Programa de pós-graduação CAPES. UFSC/Farmacologia. Mestrado. 2007
- SILVESTRIN, E. S.; LIMA, H. M.; MESSIAS, C. A.. **Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde em um hospital universitário.** *Rev. Inst. Cienc. Saúde;* 25(1):7-13. 2007.

SOARES, A. F. **A INTEGRAÇÃO ENTRE A TEORIA E A PRÁTICA: A capacidade dos alunos de farmácia em transportar para prática os conhecimentos adquiridos com a teoria.** Dissertação de Mestrado. Curso de mestrado profissional em ensino de ciências da saúde e do ambiente. Centro Universitário Plínio Leite. Niterói, 2010.

SOUZA, M. R.; OHARA, M. T.; SAITO, T. **Contaminação Microbiana em Emulsões Cosméticas para Aplicação Dérmica.** *Revista Brasileira de Farmácia e Bioquímica.* 30(1): 23-28, 1994.

SOUZA L. H. L. **A manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação.** *Hig Aliment.* 2006; 20(146):32-9.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. L. R.; ISAAC, V. L. B.. **Avaliação da atividade antisséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2007, vol.17, n.1, pp. 71-75. ISSN 0102-695X.

SPEROTO, J. S.; HEGUEDUSCH, D. F.; BRANCO, V.; ISAAC, V. L. B.; CORRÊA, M. A. **Avaliação da viscosidade de xampus espessados com eletrólitos em diferentes pHs.** In: 54ª Jornada Farmacêutica da UNESP; 2007 ago 18-24; Araraquara. p.11.

STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2.ed. São Paulo: UNESP. 604p. 2002.

STILES, M. E.; SHEENA, A. Z. **Efficacy of germicidal hand wash agents in use in a meat processing plant.** *J. Food Protec.,* 50: 289-95, 1987.

TANOMARU, J. M. G.; PIACEZZI, A. N.; WATANABE, E.; MATOBA-JUNIOR, F.; TANOMARU-FILHO, M. ; ITO, I. Y. **Antibacterial activity of four mouthrinses containing triclosan against salivary *Staphylococcus aureus*.** *Braz. J. Microbiol.* 2008, vol.39, n.3, pp. 569-572. ISSN 1517-8382.

TERRA, R. S.; MININ, M. M.; CHORILLI, M.. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulação anticelulítica acrescida de lipossomas contendo sinefrina e cafeína.** *Rev. Bras. Farm.,* 90(4): 303-308, 2009

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

TINOCO, M. A. C.; RIBEIRO, J. L. D.. **Estudo qualitativo dos principais atributos que determinam a percepção de qualidade e de preço dos consumidores de restaurantes a la carte.** *Gest. Prod.* [online]. 2008, vol.15, n.1, pp. 73-87. ISSN 0104-530X.

TIWARI, T. N., PANDEY, V. B. & DUBEY, N. K. **Plumieride from *Allamanda cathartica* as an antidermatophytic agent.** *Phytotherapy Research,* 16(4): 393-4. 2002.

VASCONCELLOS, A. G.; BRANQUINHO, F. B.; SANCHEZ, C.; LAGE, C. L. S.. **Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico.** *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2002, vol.12, suppl.1, pp. 103-105. ISSN 0102-695X.

VITAL, T. M.; REIS, C.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A.; CUNHA, L. C.. **Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina.** *Rev. Bras. Cienc. Farm.* [online]. 2004, vol.40, n.2, pp. 219-227. ISSN 1516-9332.

UTHAISANG, W.; KHAWSAK, P.. **Cytotoxicity of crude extracts from *Allamanda cathartica*, *Guaiaacum officinale*, and *Artabotrys siamensis* to cancer cells.** 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree. University of Technology, 18 - 20 October 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Updated edition of *Quality control methods for medicinal plant materials*, 1998.** WHO, 2011. disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241500739_eng.pdf . Consulta em 30/12/2011.

WILKINSON, J..**The Final Food Industry and the Changing Face of the Global Agrofood System: Up Against a New Technology Paradigm and a New Demand Profile.** *Sociologia*.