

Estudo Microbiológico de Sistemas Microemulsionados

Autores

Ticiane Aparecida de Oliveira

Orientador

Gislene Garcia Franco do Nascimento Maria Luiza Ozores Polacow

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

O estudo de sistemas microemulsionados tem chamado a atenção de um número cada vez maior de pesquisadores da área farmacêutica e cosmética, devido às potenciais vantagens oferecidas, despertando grande interesse como sistemas de liberação de drogas.

Nas microemulsões um óleo é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável. São caracterizadas por agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente da ordem de 100 Å. Estruturas similares às microemulsões são ditas de sistemas nanoestruturados pois contém também cristais líquidos (forma líquida cristalina).

Na preparação de sistemas microemulsionados, não são empregados conservantes microbiológicos, alegando-se que, no geral, apresentam grandes quantidades de tensoativos, o que dificultaria o desenvolvimento de microrganismos, inibindo seu crescimento (CONSTÂNCIO, 1993). Os microrganismos não podem sobreviver em óleo, e a água é necessária para seu crescimento e reprodução. Nestas substâncias a água (maior componente v/v) está inacessível aos microrganismos, sendo uma das principais causas da ação antimicrobiana.

Outra hipótese para a ação antimicrobiana seria o fato de afetarem a estrutura e função da membrana citoplasmática microbiana (JONES et al., 1997; BORTOLETTO et al., 1998). Há alguns relatos na literatura sobre as propriedades antimicrobianas das microemulsões como os de AL-ADHAM et al. (2000) que avaliaram a estabilidade de várias microemulsões, sob o ponto de vista microbiológico, através da observação da cinética de morte e microscopia eletrônica de transmissão das bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Comprovaram que o rompimento das membranas foi a principal causa da morte que ocorreu de forma muito rápida, ou seja, em 45 segundos após contato com as substâncias. FU et al. (2006) verificaram que houve melhor estabilidade das microemulsões quando a taxa de surfactante:cosurfactante foi na proporção de 3:2, apresentando, portanto, melhor ação antimicrobiana .

A contaminação microbiológica em produtos cosméticos ou correlatos pode ser introduzida pelas mais diferentes formas, podendo ser provenientes de equipamentos ou recipientes usados na manipulação, ou estar presentes em alguma matéria-prima. Mesmo depois de ter sido produzido e embalado com êxito, uma outra importante fonte de contaminação pode ser o uso inadequado do usuário, podendo transferir microrganismos ao produto. A adição de água com a finalidade de obter um melhor rendimento, também favorece a contaminação microbiana (ORTH, 1984).

No Brasil, os limites microbianos para cosméticos são estabelecidos pela ANVISA, Ministério da Saúde, através da Resolução no 481/97 (BRASIL, 1997) e Guia para análise de Cosméticos (BRASIL, 2002). Uma vez que os cosméticos tem a probabilidade de ser expostos a contaminantes microbiológicos, é importante que este tenha uma resistência própria contra o crescimento microbiano. Considerando a importância de se preparar microemulsões seguras do ponto de vista microbiano, torna-se relevante comprovar a eficácia destes produtos como sistemas conservantes.

2. Objetivos

Esta pesquisa teve como objetivo realizar um estudo microbiológico de sistemas nanoestruturados preparadas na Farmácia-Unimep, através da avaliação do seu potencial como sistema conservante sob os aspectos: controle de qualidade microbiológico, teste do desafio e cálculo do valor D.

3. Desenvolvimento

As análises microbiológicas de duas microemulsões (sistemas nanoestruturados), desenvolvidas na Farmácia–Unimep, e designadas de S1 e S4 foram realizadas de modo a atender a Resolução 481/97 da ANVISA, MS, fazendo-se a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos) pela técnica *pour plate*.

Com a finalidade de se avaliar a eficácia das microemulsões como sistema conservante, efetuou-se o teste do desafio e cálculo do valor D. Para a realização destes experimentos, inóculos de 10^6 células/g de cada um dos microrganismos-teste crescidos em TSB por 6 horas a 37° C (bactérias) e GYW a 28° C (fungos), foram inoculados, individualmente, nas amostras. Imediatamente após a inoculação, retirou-se amostras de 1g de cada uma das substâncias nanoestruturadas contaminadas (tempo 0), diluiu-se em caldo Letheen e a seguir em tubos com solução salina até atingir a concentração necessária para a contagem de colônias, sendo posteriormente semeados 100 µL na superfície de placas contendo TSA e AS. Após incubação a 37° C e 28° C, respectivamente, para bactérias e fungos, retirou-se amostras nos tempos de 7, 14 e 28 dias de incubação na temperatura ambiente, realizando-se a contagem de colônias, sendo os valores expressos em UFC/g, (USP, 2000; PINTO et al., 2000).

Para o cálculo do valor D, procedeu-se como descrito para o teste do desafio, realizando-se contagens microbianas nos tempos após 2, 24, 48 horas para bactérias e 4, 24, 48 horas e 7 dias de incubação na temperatura ambiente.

4. Resultados

Os resultados das análises microbiológicas para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos) das duas amostras de microemulsões, podem ser observados na Tabela 1. As substâncias não apresentaram contaminação microbiana em três ensaios (<10 UFC/g), o que confirma relatos da literatura sobre a ação antimicrobiana das microemulsões (CONSTÂNCIO, 1993; AL-ADHAM et al., 2000; FU et al. 2006).

No teste do desafio verificou-se que após 7 dias todos os microrganismos foram destruídos, exceto o bolor *A. niger* no produto S1, que continuou viável até 28 dias após inoculação. Houve diminuição da carga microbiana de 3.10^6 para 10^3 UFC/g, número que permaneceu praticamente constante neste tempo. Não houve desenvolvimento do bolor neste período, pois a amostra não apresentou alteração visível de deterioração. No entanto, a quantidade de substâncias tensoativas em sua formulação não foi suficiente para destruir os esporos do bolor. Como já é conhecido (TRABULSI et al., 2005) conídios são mais resistentes do que o micélio vegetativo, devendo ser por isto a sua sobrevivência em S1. Além disto, necessitam de menor quantidade de água livre.

Nos demais ensaios com as substâncias nanoestruturadas S1 e S4 com todos os microrganismos, houve destruição total destes após 7 dias de inoculação, comprovando a ação antimicrobiana destas substâncias, conforme dados da literatura. Conforme relatos de AL-ADHAM, et al. (2000) a destruição ocorre principalmente em função de danos provocados na membrana citoplasmática microbiana.

Na tabela 2 podem ser observados os cálculos do valor D, equação da reta e coeficiente de correlação das amostras S1 e S4. Observou-se que as amostras apresentaram diferentes atividades sobre os microrganismos. O valor D da amostra S1 contaminada com *P. aeruginosa*, foi 12,2 horas apresentando células viáveis (10^3 UFC/ mL) após 48 horas de inoculação. Já S1 contaminada com *C. albicans*, com valor D 14,8 horas não apresentou células viáveis após 24 horas de inoculação. A mesma microemulsão contaminada com *A. niger* apresentou D de 26,9 horas, decaindo de $2,2 \cdot 10^5$ UFC/mL para 10^3 , após 48 horas de inoculação. Porém, como também já foi observado no teste do desafio, este número de esporos permaneceu constante por 28 dias. Com relação a S4, observou-se valor D semelhante para todas as bactérias: 6,8, 5,5 e 5,7 horas, respectivamente, para a *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, não havendo células viáveis após 48 horas de inoculação (Figura 1). S4 inoculado com *C. albicans* e *A. niger*, apresentaram D de 4,3 e 0,81 horas, não apresentando células viáveis após 24 horas de inoculação.

A análise dos resultados mostrou que as substâncias nanoestruturadas S1 e S4 apresentaram atividade antimicrobiana porém com características diferentes pois S4 apresentou dados mais uniformes com relação a todos os microrganismos-teste e valores D bem menores, do que S1. Pode-se concluir que o teste do desafio e o cálculo do valor D se mostraram métodos eficientes para a avaliação da propriedade conservante das substâncias nanoestruturadas S1 e S4, conforme já observado por outros autores (WRIGHT, 1996; HAMOUDA et al., 1998; AL-ADHAM, et al., 2000; Fu et al., 2006).

5. Considerações Finais

As substâncias nanoestruturadas S1 e S4 não apresentaram contaminação microbiana (<10 UFC/g), o que confirma as propriedades antimicrobianas destes sistemas.

O teste do desafio mostrou que após 7 dias todos os microrganismos foram destruídos, exceto o bolor *A. niger* no produto S1, que continuou viável até 28 dias após inoculação.

O teste do desafio e o cálculo do valor D se mostraram métodos eficientes para a avaliação da propriedade conservante das substâncias nanoestruturadas S1 e S4, sendo que S4 apresentou ação antimicrobiana mais eficiente que S1.

Referências Bibliográficas

AL-ADHAM, I.S.I; KHALIL, E.; AL-HMOUD, N.D; KIERANS, M.; COLLIER,P.J. Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. **J. Appl. Microbiol.**, v.89, p 32-39, 2000.

BORTOLETO, R.K.; OLIVEIRA, A.H.; RULLER, R.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Tertiary structural changes of the alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus* on association with liposome membranes. **Arch. Biochem. Bioph.**, v. 351, p. 47-52, 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Resolução nº 481 de 15 de setembro de 1977. Estabelece limites microbianos para cosméticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 de dezembro de 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos.** Brasília, DF, 2002. 43p. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 25 de outubro de 2004.

CONSTÂNCIO, K.F.S. Contaminação microbiológica de produtos cosméticos. **Rev. Racine**, v.11, p. 13-14, 1993.

FU, X., FENG, F., HUANG, B. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for antimicrobial activity of glycerol manolaurate. **Int.J. Pharm.** v. 16, p. 20-23, 2006.

HAMOUDA T., WRIGTH, D.C., BRISKER, J. M., BAKER, J.R. Microbicidal effects of liposome-like

nanoemulsion on the pathogenic Gram negative bacteria. In Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, GA, USA, 1998.

JONES, M.N.; SONG, Y.H.; KASZUBA, M. ; REBOIRAS, M.D. The interaction of phospholipid liposomes with bacteria and their use in the delivery of bactericides. **J. Drug Targ.** v. 5, p. 25-34, 1997.

ORTH, D.S. Evaluation of preservatives in cosmetic products. In: KABARA, J.J. **Cosmetic and Drug Preservation.** Principles and Practice. New York: Marcel Dekker, 1984. p.403-421.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle Biológico de qualidade de produtos Farmacêuticos Correlatos e Cosméticos. São Paulo, Ed. Atheneu, 2000.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** Rio de Janeiro, RJ, Ed. Atheneu, 718p., 2005

2569 p,2000.

Anexos

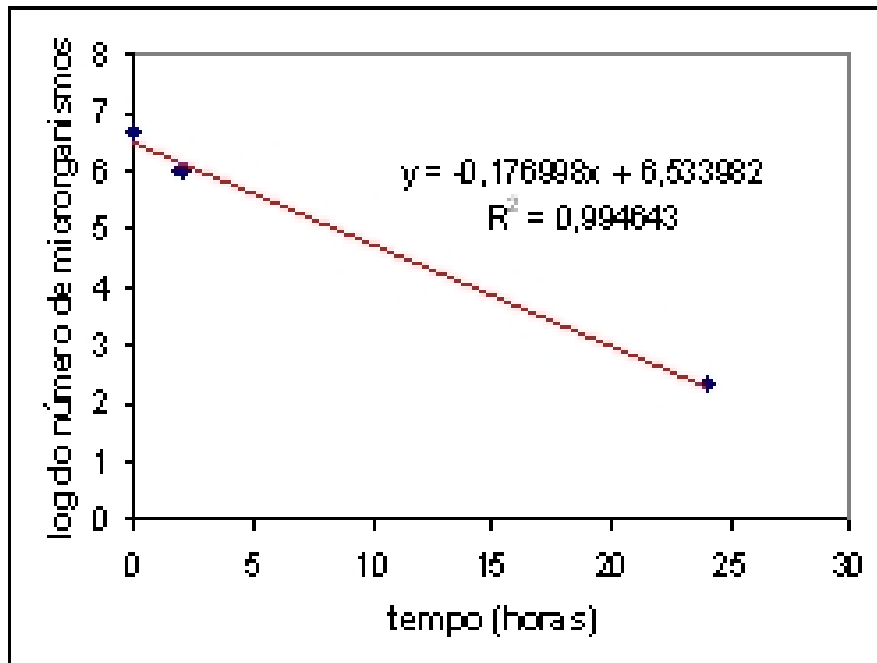


Figura 1. Perfil de letalidade (log UFC/mg x hora) da bactéria *P. aeruginosa* na amostra S4.

Tabela 1. Pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos)

Amostras	Microorganismos (UFC/g)	
	Bactérias	Bolores e leveduras
S1	< 10	< 10
S4	< 10	< 10
DC 193	< 10	< 10
DC 5329	< 10	< 10
Ceraphyl 230	< 10	< 10
3 ensaios com 2 repetições		

Tabela 2. Valor D, equação da reta e coeficiente de correlação para os microrganismos estudados.

Amostras	Valor D (horas)	Equação	Coeficiente de correlação
S1 Ec	NA		
S1 Sa	NA		
S1 Pa	12,24	$y = -0,081672x + 7,186018$	$R^2 = 0,959012$
S1 L	14,79	$y = -0,067632x + 5,267765$	$R^2 = 0,999789$
S1 An	26,91	$y = -0,081672x + 7,186018$	$R^2 = 0,959012$
S4 Ec	6,77	$y = -0,147719x + 6,131233$	$R^2 = 0,898046$
S4 Sa	5,51	$y = -0,181414x + 6,625044$	$R^2 = 0,979998$
S4 Pa	5,65	$y = -0,178998x + 6,533982$	$R^2 = 0,994643$