



# TRABALHO DE GRADUAÇÃO

ENGENHARIAS 2020

## Estudo do Teste de Eficácia das Nanopartículas de Prata como Agente Conservante

Bruno Antonio de Almeida Pereira Gomes<sup>1</sup>

Kaique Pereira Soares<sup>1</sup>

Roberta Martins da Costa Bianchi<sup>2</sup>

Universidade São Francisco

[kaique.pereira@mail.usf.edu.br](mailto:kaique.pereira@mail.usf.edu.br)

<sup>1</sup>Estudantes do Curso de Engenharia Química, Universidade São Francisco; Campus Bragança Paulista

<sup>2</sup>Professor Orientador Roberta Bianchi, Curso de Engenharia Química, Universidade São Francisco; Campus Bragança Paulista.

**Resumo:** Para o estudo e desenvolvimento de medicamentos, um pilar importante a ser analisado é a escolha ideal do sistema conservante que será inserido no produto. O sistema conservante garante que durante a vida útil, os produtos farmacêuticos ou cosméticos se mantêm seguros e estáveis para o uso. Tais conservantes mantêm o nível microbiano em limites aceitáveis, o que consequentemente, não afeta a saúde do consumidor. Um promissor conservante que ainda não é utilizado no mercado são as nanopartículas de prata, elas apresentam ação sanitizante contra microorganismos, o uso delas como tal sistema impulsionariam a pesquisa e desenvolvimento para áreas de estudo relacionadas a nanociência e suas aplicações. Para validar a eficácia de determinado conservante é necessário realizar o Teste de Eficácia de Conservantes (*Challenge Test*). Este ensaio, submete o sistema conservante a um ambiente de contaminação microbiológica, onde bactérias, fungos e leveduras são inseridos na amostra. Para a realização do ensaio existem diferentes metodologias que podem ser aplicadas, todavia é necessário avaliar qual o tipo e origem de produto para qual será submetida ao teste. O presente trabalho tem como objetivo sintetizar as nanopartículas de prata (NP-Ag) e avaliar seu efeito conservante por meio do Teste de Eficácia. Para isso, concentrações de NP-Ag de 0,2%, 0,4% e 0,6% foram inseridas em um creme, de acordo com os métodos farmacopeicos. O estudo de eficácia foi realizado e avaliado no intervalo de 24 horas, 14 e 28 dias, após esse período reuniu-se os dados obtidos e avaliou-se se a solução de NP-Ag foi eficaz nas concentrações utilizadas.

**Palavras-chave:** Nanopartícula de prata; teste de eficácia de conservantes; microorganismos.

**Abstract:** For the study and development of drugs, an important pillar to be analyzed is the ideal choice of the preservative system that will be inserted in the product. The preservative system ensures that pharmaceuticals or cosmetics are safe and stable for use during their shelf life. Such preservatives keep the microbial level within acceptable limits, which consequently does not affect the health of the consumer. A promising preservative that is not yet used in the market are silver nanoparticles, they have a sanitizing action against microorganisms, their

use as such a system would boost research and development for areas of study related to nanoscience and its applications. To validate the effectiveness of a particular preservative, it is necessary to carry out the Preservative Efficacy Test (Challenge Test). This assay subjects the preservative system to an environment of microbiological contamination, where bacteria, fungi and yeasts are introduced into the sample. To carry out the test, there are different methodologies that can be applied, however it is necessary to evaluate the type and origin of the product for which it will be subjected to the test. The present work aims to synthesize silver nanoparticles (NP-Ag) and evaluate their preservative effect through the Efficacy Test. For this, NP-Ag concentrations of 0.2%, 0.4% and 0.6% were inserted into a cream, according to pharmacopoeial methods. The efficacy study was performed and evaluated within 24 hours, 14 and 28 days, after which the data obtained was gathered and it was evaluated whether the NP-Ag solution was effective at the concentrations used.

**Keywords:** Silver nanoparticle; preservative efficacy test; microorganisms.

## Introdução

Uma das maiores preocupações da indústria farmacêutica está relacionada à contaminação microbiológica. Desde o processo inicial de fabricação até a comercialização, os produtos estão suscetíveis a contaminação por bactérias, fungos e leveduras. Esses microrganismos podem contaminar medicamentos, produtos cosméticos e veterinários.

Para que os níveis de contaminação estejam dentro dos limites estipulados pela legislação vigente, determinados pela versão mais atual da Farmacopeia Brasileira para as indústrias do ramo, é necessário seguir o manual de Boas Práticas de Fabricação (BPF). O manual estipula diretrizes para que o processo fabril cumpra todas as normas descritas nas legislações. As indústrias do ramo farmacêutico, cosmético, alimentício e de cuidados para saúde devem garantir que seus processos industriais não sofram qualquer tipo de contaminação ou que o risco de contaminação seja mínimo (LIIKANEN, 2003).

A mitigação em relação a contaminação microbiológica se dá do início ao fim de toda cadeia produtiva, devendo ser realizados monitoramentos no processo fabril, desde o sistema de tratamento de ar, sanitização e limpeza dos equipamentos, utensílios na fabricação de medicamentos até limpeza dos uniformes dos colaboradores. Todavia, indústrias não estéreis são passíveis de contaminação, especificamente, contaminação microbiológica (NOSTRO *et. al.*, 2002). Caso ocorra a contaminação microbiana, as indústrias do ramo dispõem do Controle de Qualidade Microbiológico, o qual realiza a análise de matéria-prima, água, produto, material de embalagem e monitora os sistemas de tratamento de ar nas linhas de produção para que toda a cadeia produtiva seja devidamente acompanhada. Para medicamentos aquosos ou semi aquosos, é necessário o uso de conservantes sintéticos ou naturais para inibição de bactérias, fungos e leveduras. O ambiente aquoso se torna propício para o crescimento e proliferação de microrganismos (LUNDOV, *et. al.* 2009).

Os conservantes são substâncias químicas ou naturais que são incluídos na etapa de formulação de produtos, agindo como ação inibitória ou estabilizadora de microrganismos (LIIKANEN, 2003). A escolha dos conservantes e suas respectivas concentrações devem seguir os critérios dos órgãos regulamentadores, a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 528, descreve os conservantes aprovados para o uso em medicamentos e suas concentrações máximas permitidas (ANVISA, 2021). É aconselhável a utilização de concentrações mínimas do produto, quantidades excessivas podem ser tóxicas. Os conservantes mais utilizados pela indústria farmacêutica são o Cloreto de benzalcônio, álcool benzílico e os parabenos.

Estudos relacionados a nanopartículas na área médica têm atraído atenção de pesquisadores. As nanopartículas de prata (NP-Ag) ou também denominadas prata coloidal

apresentam condições para serem possíveis de uso em sistemas conservantes, pois poucos microrganismos apresentam resistência frente às NP-Ag. A prata coloidal cobre uma ampla faixa de bactérias gram-positivas e gram-negativas bem como fungos, leveduras e vírus. Além disso, a prata faz parte do grupo de metais que apresenta menor toxicidade às células animais. Devido a estudos realizados sobre nanocompósitos de prata e sua ação frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SANPUI *et. al.*, 2008) realizar a síntese da mesma e utilizá-la como conservante para medicamento respeitando os limites estipulados pela RDC estimula o campo de pesquisas da prata coloidal relacionados à saúde e sua expansão para diferentes áreas.

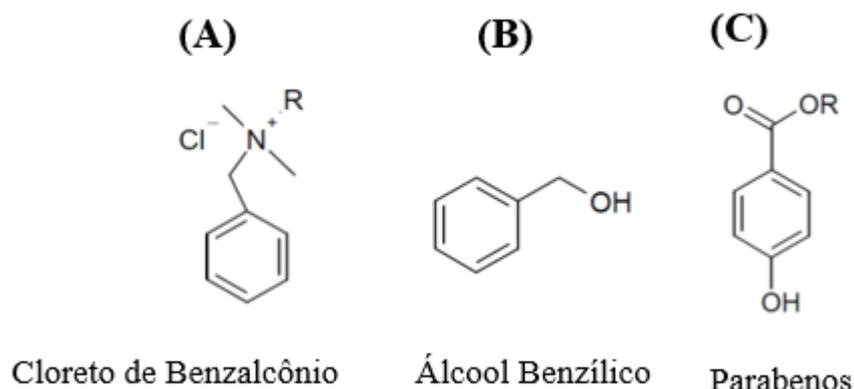
O presente trabalho tem como objetivo sintetizar as nanopartículas de prata (NP-Ag) e avaliar seu efeito conservante por meio do Teste de Eficácia de Conservante (*Challenge Test*) em diferentes concentrações, respectivamente 0,2%, 0,4% e 0,6% e avaliar se a solução de NP-Ag é eficaz frente aos microrganismos de grau patogênico.

## Levantamento Bibliográfico

### Conservantes

Os conservantes devem cumprir com diversos parâmetros, tais como, atender a via de administração (oral, aquoso, não aquoso, uso utópico, dentre outros), a eficácia do sistema conservante, possíveis reações alérgicas, em especial, para consumidores que apresentam algum tipo de hipersensibilidade e que o sistema conservante não altere a formulação do produto (ORTH, *et. al.*, 2006). Em resumo, o sistema conservante deve ser eficiente contra uma gama de microrganismos, em especial os patógenos citados pela Farmacopeia Brasileira, ser eficiente em baixas concentrações e manter estabilizado durante toda vida útil do produto, além de não modificar o produto e/ou embalagem do mesmo.

O conservante ideal deve ser incolor, inodoro, não apresentar reação tóxica, ser solúvel em água, não promover reações alérgicas, ser extenso nas faixas de pH e inibir o crescimento de bactérias, leveduras e fungos. Todavia, um conservante que atenda todas essas especificações ainda não foi desenvolvido (LUNDOV *et. al.* 2009). Os mais utilizados pela indústria farmacêutica são o Cloreto de benzalcônio, álcool benzílico e os parabenos. A fórmula estrutural dessas substâncias está ilustrada na Figura 1.



**Figura 1-** Fórmula estrutural dos compostos químicos mais utilizados como conservantes. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2006.

O Amônio quaternário, que são os cloretos ou brometo de cetalcônio e o metabisulfito de sódio, são considerados como os conservantes mais antigos no mercado. O hexaclorofeno apresenta ação desinfetante satisfatória, porém, o composto apresenta riscos à saúde humana, porque tem potencial de desenvolver neurotoxicidade nos consumidores. Após o Decreto-Lei

n° 189/2008, em 2008 o composto foi retirado da lista de conservantes permitidos para o uso em medicamentos (SAÚDE, 2008).

Além da classe química, os conservantes podem ser agrupados de acordo com mecanismo de ação, sendo os principais grupos os agentes antioxidantes, antimicrobianos e quelantes. A classe antioxidante refere-se aos compostos auto-redutores, utilizados em produtos que são sensíveis ao oxigênio, prevenindo a sua oxidação. Os mais utilizados na indústria são ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado e butil-hidroxianisol (SHAIKH *et. al.*, 2016).

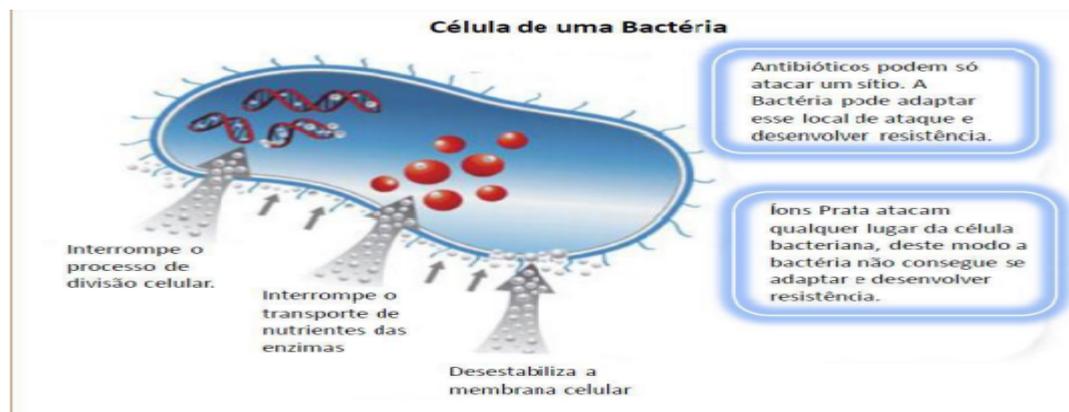
Os conservantes antimicrobianos devem inibir a ação microbiana, geralmente, os mecanismos de ação vão de encontro às estruturas primordiais das células microbianas, as organelas mais afetadas são a membrana plasmática, parede celular e o citoplasma. Os parâmetros que devem ser levados em consideração para esta classe são, o doseamento do sistema, a interação com a formulação do produto e a ação contra bactérias, fungos e leveduras. Os parabenos, benzoato de sódio e sorbato de potássio são comumente os conservantes antimicrobianos mais utilizados (SHAIKH *et. al.*, 2016).

Os conservantes classificados como quelantes são mais utilizados para prevenção em relação à degradação do produto, formam complexos com a formulação farmacêutica, pois os quelantes complexam os íons metálicos como o Cálcio, por exemplo, para medicamentos que contêm cálcio em sua formulação (SHAIKH *et. al.*, 2016). O EDTA é o agente quelante mais utilizado, no entanto, ele deve ser combinado com outros sistemas, porque sua eficiência contra o microrganismo é relativamente baixa. Comumente, o EDTA é combinado com amônio quaternário para melhorar a sua ação (DENYER; BAIRD, 2007).

### Nanopartícula de Prata (NP-Ag)

O efeito antimicrobiano da nanopartícula de prata era usado antigamente contra queimaduras e contra agentes patológicos causados por bactérias, mas seu uso caiu bastante após a descoberta da penicilina, em 1928. Entretanto, com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007). Assim, materiais constituídos com nanopartículas de prata vem despertando interesse nas indústrias farmacêuticas e cosméticas e a nanociência e a nanotecnologia têm contribuído para que diversas áreas produzam os materiais na escala nanométrica, para diversas aplicações.

Devido a sua escala nanométrica, as NP-Ag apresentam propriedades como, aumento da área superficial, feito catalítico elevado, boa condutividade elétrica e ação antimicrobiana. De acordo com a sua ação antimicrobiana, podem ser usadas para diminuir infecções, reduzir as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de superfícies, para o tratamento de água e para a fabricação de tintas antibacterianas (GUZMÁN *et al.*, 2009). A Figura 2 mostra a interação da NP-Ag em uma célula bacteriana.



**Figura 2**-Interação de íons prata em uma célula bacteriana.

Fonte: Adaptado de: <http://methanenanosilver.weebly.com/>

A atuação da NP-Ag se dá pela inibição do crescimento e perda da infectividade, impedindo os processos que ocorrem na superfície e no interior da célula dos microrganismos, sendo capazes de invadir as células, interagindo com ligações dissulfeto das proteínas de microrganismos tais como vírus, bactérias e fungos, ou seja, é nociva às proteínas, e conseqüentemente afeta o DNA o que dificulta sua replicação e o RNA impossibilitando sua transcrição (LARA *et al.*, 2011). Isso ocorre porque a prata tem alta afinidade com os elementos enxofre e fósforo, presentes na membrana celular e no DNA. As modificações nas estruturas prejudicam os processos bacterianos, podendo ocasionar a morte celular (MORONES, 2005; SHARMA, 2008).

Há diversos métodos para sintetizar as NP-Ag, por exemplo, formações fotoquímicas, radiolíticas e biogênicas, sendo que, para garantir a perfeita reprodutibilidade e manter a simplicidade e elegância do experimento, pode-se utilizar o método clássico de redução dos íons prata pela ação do agente redutor boroidreto de sódio (MELO JR, *et al.*, 2012).

Uma das grandes dificuldades desta síntese se dá na obtenção de suspensões coloidais estáveis já que nanopartículas metálicas possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a imediata agregação destas para a formação de ligações metal-metal.

Para evitar a agregação das nanopartículas, a preparação de sistemas coloidais geralmente é efetuada em presença de espécies denominadas estabilizadores, que se adsorvem sobre as superfícies das nanopartículas, formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência.

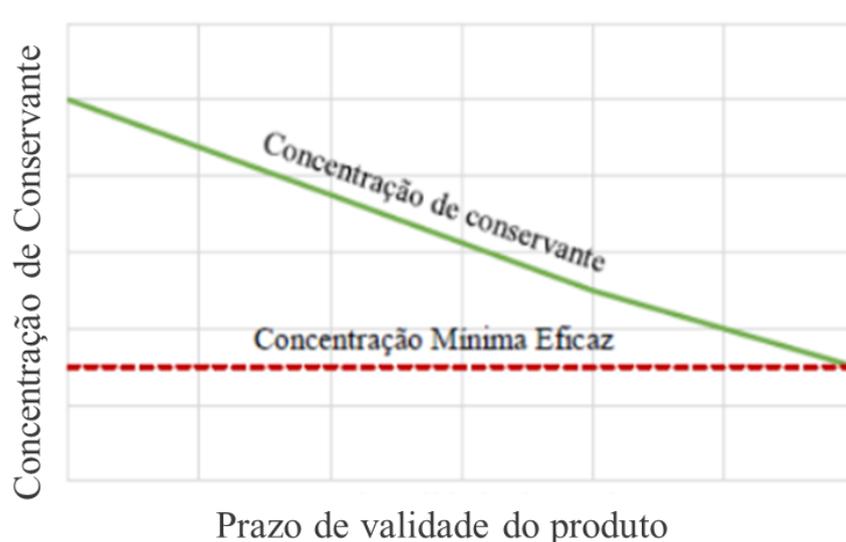
Para este fim, alguns dos estabilizadores mais eficazes são os poliméricos, como, por exemplo, poli(vinilpirrolidona) (PVP),<sup>20</sup> poli(álcool vinílico) (PVA)<sup>21</sup> e ácido poliacrílico (PAA),<sup>22</sup> que possuem, em suas estruturas, sítios básicos de Lewis com alta afinidade pelas nanopartículas, e cadeias orgânicas suficientemente compridas que criam um impedimento estérico, evitando interações entre as mesmas (MELO JR, *et al.*, 2012).

## **Eficácia de Conservantes**

O Teste de Eficácia de Conservantes ou “*Challenge Test*” é um ensaio microbiológico realizado com o intuito de avaliar a eficácia do conservante do produto frente aos microrganismos descritos pela Farmacopéia. Apesar de existirem algumas diferenças entre os métodos farmacopeicos em relação a seleção dos microrganismos e intervalos de tempo do teste, existe uma harmonização entre as farmacopeias Americana (USP), Europeia (EurPh) e Japonesa (JP) no que diz respeito a realização do ensaio. Além da Farmacopeia, outras referências são utilizadas, como a norma ISO 11930 e a resolução da Associação de Cosméticos, Higiene Pessoal e Fragrâncias (CFTA).

Durante o desenvolvimento do produto o ensaio deve ser realizado para avaliação da concentração mais adequada, levando em consideração a menor concentração possível e não ultrapassando o limite máximo permitido (RDC N°528. 2021). O teste deve ser realizado na formulação final para que haja a verificação de que outros componentes não afetaram o sistema conservante (BAKER R. 2017).

Existem situações onde o *Challenge Test* deve ser feito no tempo de validade intermediário do produto (GOINS M. 2018). Nesse caso, o conservante utilizado sofre alguma interferência do material de embalagem, por exemplo, a degradação, como ilustra a Figura 3.



**Figura 3-** Redução da concentração de conservante ao longo do tempo.  
 Fonte: <https://www.copybook.com/companies/rssl/articles/preservative-efficacy-tests>.

O teste de eficácia consiste em contaminar o produto com os microrganismos descritos pela Farmacopéia, no caso da Farmacopeia Brasileira alguns dos microrganismos citados são as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positivo) e *Escherichia coli* (gram-negativo). Após a contaminação, o produto é avaliado em intervalos de tempo estipulados, os intervalos podem sofrer variações de acordo com cada classe de produtos (sólidos, semi sólidos, líquidos, dentre outros) para produtos semi sólidos os intervalos são de 24 horas, 14 e 28 dias.

Com o espaçamento de tempo, espera-se a redução logarítmica da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da população microbiana, caso haja redução durante todo o percurso e a redução esteja de acordo com os limites estabelecidos o conservante é considerado eficaz.

Para a preparação do inóculo, a farmacopeia aconselha utilizar culturas que não ultrapassem a quinta passagem a partir da cultura-mãe, sendo recomendado culturas frescas. A explicação para isso é, justamente, utilizar as culturas na fase de crescimento logarítmico. Apesar dos diferentes métodos para preparação de culturas, o resultado final é aceitável para o teste de desafio.

Os cinco microrganismos comumente usados para o estudo e solicitados pela Farmacopéia Brasileira são *Staphylococcus aureus*, (bactéria), *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria), *Escherichia coli* (bactéria), *Candida albicans* (levedura), e *Aspergillus brasiliensis* (fungo). O recomendado é realizar uma passagem para o meio fresco a partir da cultura-mãe (MOSER, 2011).

As indústrias farmacêuticas seguem a metodologia farmacopeica, a indústria cosmética segue a norma ISO 11930 e os compêndios do CFTA. Todos os métodos têm em comum as etapas para realização do ensaio (ENGLISH, 2018), são elas:

1. Preparação das Suspensões de microrganismos padrão (inóculo);
2. Inoculação das suspensões no produto;
3. Análise das amostras em intervalos específicos;
4. Neutralização da atividade antimicrobiana no produto;
5. Recuperação dos microrganismos;
6. Análise da redução dos microrganismos sobreviventes.

Cada cultura é padronizada para obter um inóculo de aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/g. A recomendação é realizar o cultivo em meio sólido, no caso Agar TSA para bactérias e Agar Saboraud Dextrose para fungos e leveduras. As diluições dos organismos devem ser feitas em solução salina (0,9%) estéril e a padronização é realizada através da escala espectrofotométrica. Especificamente, para a padronização do fungo *Aspergillus brasiliensis*, a solução salina é suplementada com polissorbato 80 (0,05%), para facilitar a dispersão dos esporos.

A contagem inicial deve ser realizada a partir da preparação de cada inóculo e em seguida para diluições decimais. As diluições são realizadas para que a contagem total em placas de petri possam ser realizadas (UFC/g), as suspensões iniciam na casa de  $10^8$  UFC/g e caem para casas de 30-300 UFC para bactérias e leveduras e 10-100 UFC fungos (MOSER, 2011, SIEGERT, ISO 11930, 2012).

A quantidade de inóculo a ser adicionado ao produto deve ser mínima, não excedendo 1% do volume do produto. A concentração fica em torno de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/ml de microrganismos, além disso, o produto contaminado deve ser armazenado em estufa a temperatura ambiente entre 20 a 25°C durante todo o estudo, sendo permitido retiradas do produto em intervalos determinados para avaliação da ação conservante diante da contaminação (MOSER, SIEGERT, ISO 11930, 2012).

A contagem total é realizada em intervalos e, a cada intervalo o esperado é que haja redução no número de UFC/ml a partir do primeiro inóculo (tempo zero). Os intervalos são divididos em 24 horas, 14 e 28 dias após o tempo zero (primeiro dia de contaminação). A contagem das placas é convertida em números logaritmos (Log 10) para fins de comparação (MOSER, 2011).

## **Metodologia**

Para realização do Teste de Eficácia um creme contendo metilparabeno como sistema conservante será contaminado frente a cepas específicas. Primeiramente, foi realizada a síntese das nanopartículas e em seguida a caracterização das mesmas via espectrofotômetro, após a solução foi adicionada ao creme que seguiu para as etapas do teste de eficácia.

No creme o sistema conservante utilizado foi a solução de Nps Ag em diferentes concentrações, respectivamente, 0,2 % (0,1 mL), 0,4% (0,2 mL) e 0,6% (0,3 mL), o creme foi avaliado no intervalo de 24 horas, 14 e 28 dias.

## **Síntese de Nanopartículas de Prata**

Para realizar a síntese das nanopartículas de prata foram utilizados uma solução de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L de Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ),  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L de Boroidreto de Sódio ( $\text{NaBH}_4$ ).

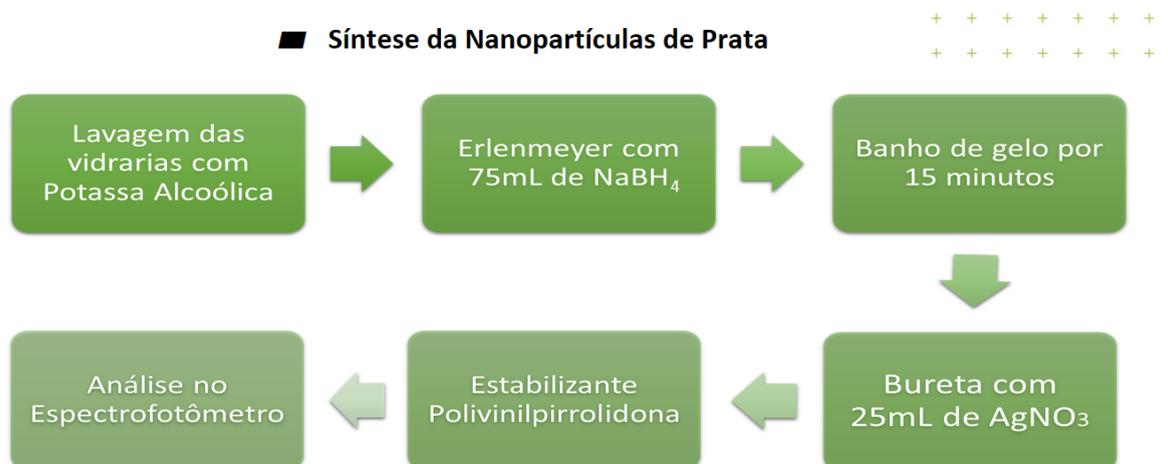
Todas as vidrarias foram lavadas com uma solução de potassa alcoólica preparada com 1,0 L de etanol 95%, 120 g de hidróxido de potássio 85% e 120 mL de água destilada para evitar a presença de impurezas.

As NP-Ag foram obtidas pelo método da redução de íons de prata (MELO JR, et al., 2012). Dessa forma, 75 mL de uma solução de Borohidreto de sódio foram colocados em um Erlenmeyer e resfriada durante 15 minutos. Após este período a solução foi agitada por 25 minutos. Durante a agitação, 25 mL de solução de nitrato de prata foram adicionados gota a gota, a uma taxa de de vazão de uma gota por segundo e, por fim, após a obtenção de uma solução amarela, adicionou-se cerca de 5 gotas do estabilizante Polivinilpirrolidona (PVP).

## **Caracterização das Nanopartículas de Prata**

Para verificar a formação das NP-AP, uma alíquota da solução foi analisada em um espectrofotômetro (Genesys 10uv), na região de comprimento de onda entre 375 a 475 nm.

**Fluxograma 1** - Síntese e Caracterização das nanopartículas.



### Preparo da amostra com as NP-Ag

Antes do teste de eficácia, a amostra contendo o creme e as NP-Ag como o agente conservante foi preparada da seguinte maneira: inicialmente, os frascos de vidro com capacidade para 100 mL foram previamente esterilizados via autoclave na temperatura de 122,5 °C durante 25,0 minutos.

Para melhor compreensão, os frascos foram separados em cinco lotes contendo 3 frascos. Cada lote corresponde a um tipo de microrganismo. Em cada lote, foram adicionados 100 g de creme e o conservante (NP-Ag), nas respectivas concentrações de 0,2% (0,1 mL); 0,4% (0,2 mL) e 0,6% (0,3 mL). Além disso, um padrão foi estipulado, que consiste em 100 g de creme com 0,4% de metilparabeno.

A Tabela 1 ilustra o esquema das amostras. Após a inserção do sistema conservante no produto, os mesmos foram homogeneizados.

Após a homogeneização, os cinco microorganismos constituídos por três bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), uma levedura (*Candida albicans*) e um fungo (*Aspergillus brasiliensis*), foram submetidos às concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6% de NP-Ag a fim de analisar o seu efeito conservante.

**Tabela 1-** Esquema de preparo das amostras.

| Microorganismos                 |               |          | Creme (g) | Sistema conservante NP-Ag (%) |     |     |
|---------------------------------|---------------|----------|-----------|-------------------------------|-----|-----|
| Nome                            | Identificação | Tipo     |           | 0,2                           | 0,4 | 0,6 |
| <i>Escherichia coli</i>         | ATCC 8739     | Bactéria | 100       | 0,2                           | 0,4 | 0,6 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | ATCC 9027     |          | 100       | 0,2                           | 0,4 | 0,6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | ATCC 6538     |          | 100       | 0,2                           | 0,4 | 0,6 |
| <i>Candida albicans</i>         | ATCC 10231    | Levedura | 100       | 0,2                           | 0,4 | 0,6 |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ATCC 16404    | Fungo    | 100       | 0,2                           | 0,4 | 0,6 |

## Teste de Eficácia de Conservantes

### Etapa 1: Preparo das Suspensões dos microrganismos

A preparação dos microrganismos inicia-se com a determinação da concentração do inóculo. A concentração é determinada por meio de uma análise espectrofotométrica. Para cada inóculo, há um valor desejado que corresponde a  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  UFC/ml (FARMACOPEIA, 2019). É necessário a realização de suspensões para que a carga microbiana diminua, logo a contagem total pode ser realizada.

#### Suspensão 1

Para formar a suspensão 1, em 5 frascos devidamente esterilizados, foram adicionados 150 mL de solução salina 0,9% e pérolas de vidro para facilitar a homogeneização do microrganismo. Todos estes frascos foram denominados como suspensão 1.

A concentração de inóculo da suspensão foi determinada por meio do espectrofotômetro. Para cada microrganismo, há uma faixa ideal de absorbância correspondente à sua concentração. A Tabela 2 apresenta os valores ideais.

Para uma melhor diluição e recuperação do *Aspergillus brasiliensis*, adiciona-se duas gotas de Tween 80 na placa de petri, antes da passagem do fungo para o frasco denominado suspensão 1. A suspensão 1 é utilizada apenas para padronização do inóculo. Foi utilizado o mesmo comprimento de onda para todos os microrganismos, com o equipamento previamente calibrado conforme o Procedimento Operacional Padrão (POP) interno para o uso do espectrofotômetro.

**Tabela 2-** Valores de referência para determinar a concentração de inóculo.

| Microorganismos                 |               |          | Análise Espectrofotométrica |                     |
|---------------------------------|---------------|----------|-----------------------------|---------------------|
| Nome                            | Identificação | Tipo     | Absorbância (u.a)           | Concentração UFC/ml |
| <i>Escherichia coli</i>         | ATCC 8739     | Bactéria | 0,150±0,005                 | $1 \times 10^9$     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | ATCC 9027     |          | 0,075±0,005                 | $1 \times 10^8$     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | ATCC 6538     |          | 0,075±0,005                 | $1 \times 10^8$     |
| <i>Candida albicans</i>         | ATCC 10231    | Levedura | 0,360±0,005                 | $1 \times 10^7$     |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ATCC 16404    | Fungo    | 0,750±0,020                 | $1 \times 10^7$     |

## Suspensão 2

Após a padronização das suspensões, frascos de 100 mL foram identificados com o nome de cada microrganismo e 20 mL de solução salina 0,9% adicionados aos frascos. A suspensão 2 é utilizada para a determinação da contagem do inóculo e através dela, a estimativa da carga microbiana adicionada ao produto no início do teste.

## Suspensão 3

A suspensão 3 é utilizada para realização do teste de eficácia, nela são adicionados 100 g do creme, o qual será analisado com as diferentes concentrações de solução de NP-Ag e com os respectivos microrganismos.

### Etapa 2: Inoculação das suspensões microbianas no produto

A suspensão 2 foi utilizada para realizar as diluições seriadas conforme a indicação apresentada na Tabela 3. Ela serve como parâmetro para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), estimando a carga microbiana inoculada no produto (FARMACOPEIA, 2019).

Tabela 3- Diluição da suspensão 2.

| Microorganismos                                  | Diluição                                                |                                                        |                                                        |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                                                  | 1                                                       | 2                                                      | 3                                                      |
| <i>Escherichia coli</i><br>( 2 diluições)        | 9,9 mL da solução salina (0,9%) e 0,1 mL da suspensão 2 | 9,9 mL da solução salina (0,9%) e 0,1 mL da diluição 1 | ---                                                    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>( 3 diluições)  | 9,9 mL da solução salina (0,9%) e 0,1 mL da suspensão 2 | 9,0 mL da solução salina (0,9%) e 1,0 mL da diluição 1 | 5,0 mL da solução salina (0,9%) e 5,0 mL da diluição 2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>( 2 diluições)   | 9,9 mL da solução salina (0,9%) e 0,1 mL da suspensão 2 | 9,0 mL da solução salina (0,9%) e 1,0 mL da diluição 1 | ---                                                    |
| <i>Candida albicans</i><br>( 1 diluição)         | 9,9 mL da solução salina (0,9%) e 0,1 mL da suspensão 2 | ---                                                    | ---                                                    |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i><br>( 1 diluição) | 9,9 mL da solução salina (0,9%) e 0,1 mL da suspensão 2 | ---                                                    | ---                                                    |

Fonte: Farmacopeia Brasileira

Nota: Apenas a última diluição é utilizada para microrganismo com mais de uma diluição (FARMACOPEIA, 2019).

### Etapas 3 – Inoculação das diluições para o produto

Foram separados 100 g do produto em frasco esterilizado (Suspensão 3) o produto foi bem homogeneizado para uma melhor dispersão microbiana. Para isso, seguiu-se a recomendação de aquecer as amostras a temperatura de 40-45°C.

Após inocular os microrganismos para Suspensão 03, este foi incubado em estufa à temperatura de  $22,5 \pm 2,5$  °C nos intervalos de 24 horas, 14 e 28 dias, nesse período alíquotas das amostras foram recolhidas para análise de contagem total de microrganismos.

Retirou-se 10 g da Suspensão 3 em placa de petri identificadas, em seguida verteu-se o meio de cultura na placa. O meio de cultura estava a aproximadamente 40°C e foi agitado em círculos até obter uma quantidade aproximada de 20 mL. As placas permaneceram semi abertas até a solidificação do meio de cultura, em seguida foram ser incubadas (FARMACOPEIA, 2019).

#### **Etapa 4: Recuperação dos microrganismos sobreviventes**

Nos intervalos estipulados a contagem total foi realizada dentro do tempo de recuperação de cada microrganismo, de 3 a 5 para bactérias e 5 a 7 dias fungos e leveduras. A Tabela 4 apresenta o meio de cultura utilizado e a condição de incubação segundo a Farmacopeia Brasileira.

Tabela 4 – Relação de microrganismo e especificações para incubação

| MICROORGANISMOS                 | MEIO DE CULTURA | TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO | TEMPO DE RECUPERAÇÃO DO MICROORGANISMO |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>         | Agar TSA        | $32,5 \pm 2,5$ °C        | 3 a 5 dias                             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Agar TSA        | $32,5 \pm 2,5$ °C        | 3 a 5 dias                             |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | Agar TSA        | $32,5 \pm 2,5$ °C        | 3 a 5 dias                             |
| <i>Candida albicans</i>         | Agar SAB        | $22,5 \pm 2,5$ °C        | 3 a 7 dias                             |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> | Agar SAB        | $22,5 \pm 2,5$ °C        | 3 a 7 dias                             |

Fonte: Farmacopeia Brasileira

No prazo determinado (24 horas, 14 e 28 dias) 10 g de amostra contida na suspensão 3 que estava armazenada na estufa de incubação em temperatura de  $(22,5 \pm 2,5)$ °C foi retirada para análise e contagem total de microrganismos sobreviventes.

Para a contagem foi necessário utilizar 9 mL do caldo Lethen, o papel do caldo Lethen é neutralizar o conservante inserido no produto para que a ação antimicrobiana não continue durante a recuperação na placa de petri (FARMACOPEIA, 2019).

#### **Etapa 5: Análise da redução dos microrganismos sobreviventes.**

A eficácia do conservante é expressa através da redução logarítmica do número de microrganismos em função do tempo de incubação da amostra. É importante identificar em qual categoria o produto a ser estado está inserido, pois os parâmetros sofrem variações.

O cálculo da redução logarítmica é feito a partir da concentração de cada microrganismo (UFC/ml) na amostra comparado com a contagem inicial.

Cálculo:  $RL = \text{Log}10(N_0) - \text{Log}10(N)$

Onde:

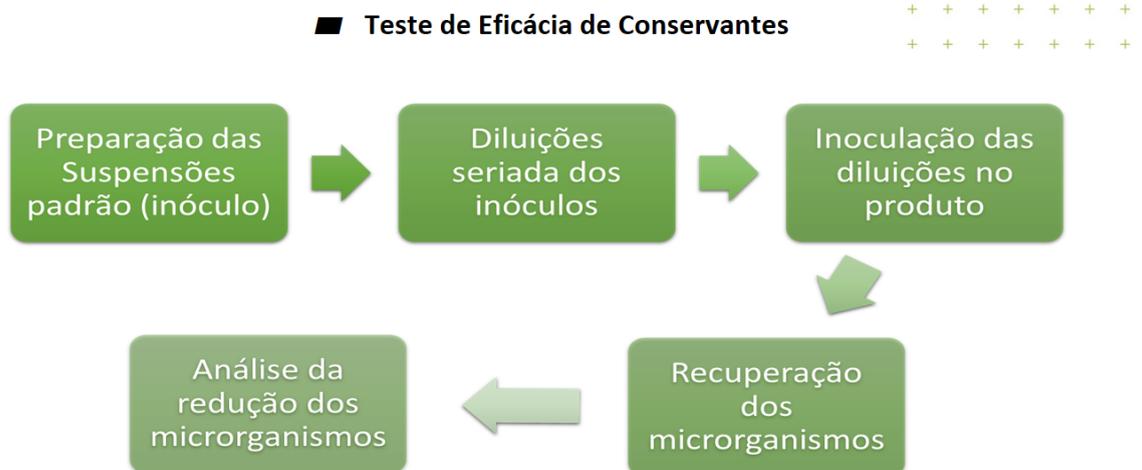
RL = Redução logarítmica.

No = Contagem tempo inicial.

N: Contagem nos intervalos especificados.

Nota: A manutenção do número de UFC/mL inoculado é definida como: Não mais que 0,5 log10 de unidades maiores que o valor previamente obtido.

Fluxograma 2 - Teste de Eficácia de Conservantes

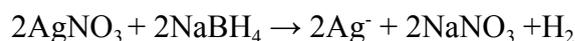


## Resultados e Discussões

Para evitar a contaminação de qualquer impureza, todas as vidrarias foram lavadas com uma solução potassa alcoólica e água destilada e somente após este procedimento, os materiais foram adicionados.

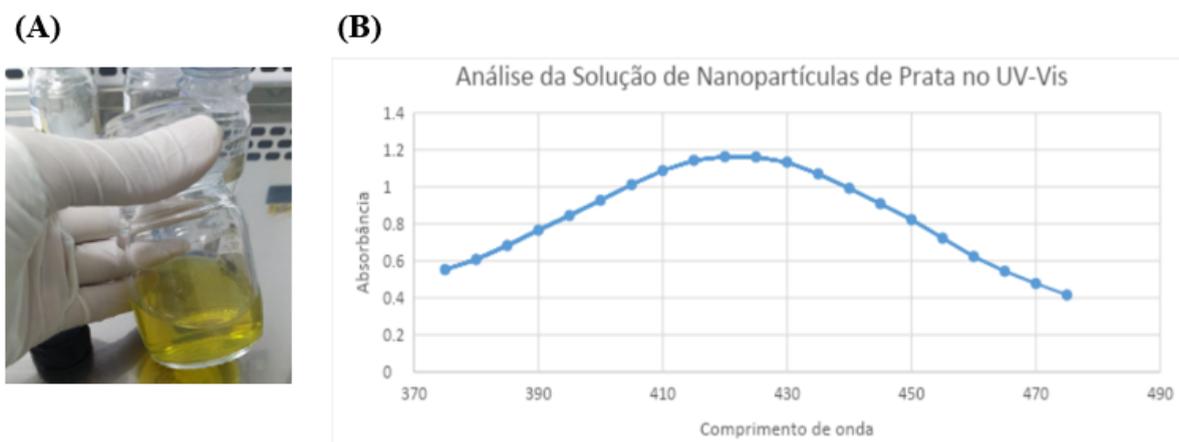
As NP-Ag foram sintetizadas pelo método da redução de íons de prata (MARZÁN, 2004). A metodologia possibilitou a síntese de prata coloidal na coloração amarela. Para que a redução ocorra, é necessário adicionar agentes redutores, por exemplo o borohidreto de sódio, isso ocorreu os íons de boroidreto atuaram como estabilizantes nas nanopartículas, esses íons se adsorvem nas superfícies da NP-Ag gerando cargas superficiais, devido às cargas há repulsão, o que evita a agregação das nanopartículas.

A equação 1 mostra a redução dos íons de prata por meio do agente redutor:



Após a reação, observou-se que a solução apresentou uma cor amarela (Figura 4(A)), indicando a formação das NP-Ag, a cor amarela é um indicativo que mostra a absorção da radiação eletromagnética. No caso, os elétrons são excitados pelo espectro de luz visível e interagem com a radiação eletromagnética, isso resulta em oscilações coletivas que geram formação de dipolo pela superfície (LIZ-MARZÁN; MATER, 2004.)

A solução foi analisada no espectrofotômetro na região do UV-vis, na faixa de comprimento de onda entre 375 a 475 nm (Figura 4(B)). Observa-se um pico de aproximadamente 420 nm. É possível determinar o diâmetro médio das nanopartículas obtidas, estudos realizados relatam relações entre o tamanho das nanopartículas e a largura a meia altura e comprimento máximo das bandas de absorção visualizados no espectro, no caso, os dados obtidos são que o Diâmetro estimado pela largura a meia altura/nm é de 111 (+/- 3) nm e o comprimento de onda máximo/nm em torno de 423 (+/- 8) nm (SOLOMON *et al.* 2007).



**Figura 4-** (A) Solução indicando a formação das NP-Ag. (B) Espectro da análise da solução contendo NP-Ag.

Na Figura 4(B), observa-se um pico em aproximadamente 420 nm característico de nanopartículas de prata com formato esférico.

Obteve-se uma solução amarelada que, logo formada, foi analisada no espectrofotômetro UV-Vis, vendo o comprimento de onda ao qual a absorbância teve o seu pico. O UV-Vis se baseia na ressonância da banda plasmônica, observado em nanopartículas metálicas. Neste caso, uma onda eletromagnética (EM) incide sobre uma nanopartícula metálica gerando uma oscilação na ressonância da nuvem eletrônica da nanopartícula, transformando a energia das ondas EM em energia térmica (NOGUEZ, 2007; ZHANG e NOGUEZ, 2008).

Para partículas com o tamanho de 1 - 30 nm, os modos de absorção da energia eletromagnética são devidos à excitação coletiva dos elétrons livres; a transição de interbanda; a dispersão da superfície ou ao espalhamento dos elétrons livres, que ocorre quando o caminho livre médio dos elétrons é comparável às dimensões das partículas (NOGUEZ, 2007; ZHANG, NOGUEZ, 2008). Se os espectros UV vis, mostraram um pico centrado, por exemplo, por volta de 400 nm, isso é característico de nanopartículas de prata com formato esférico.

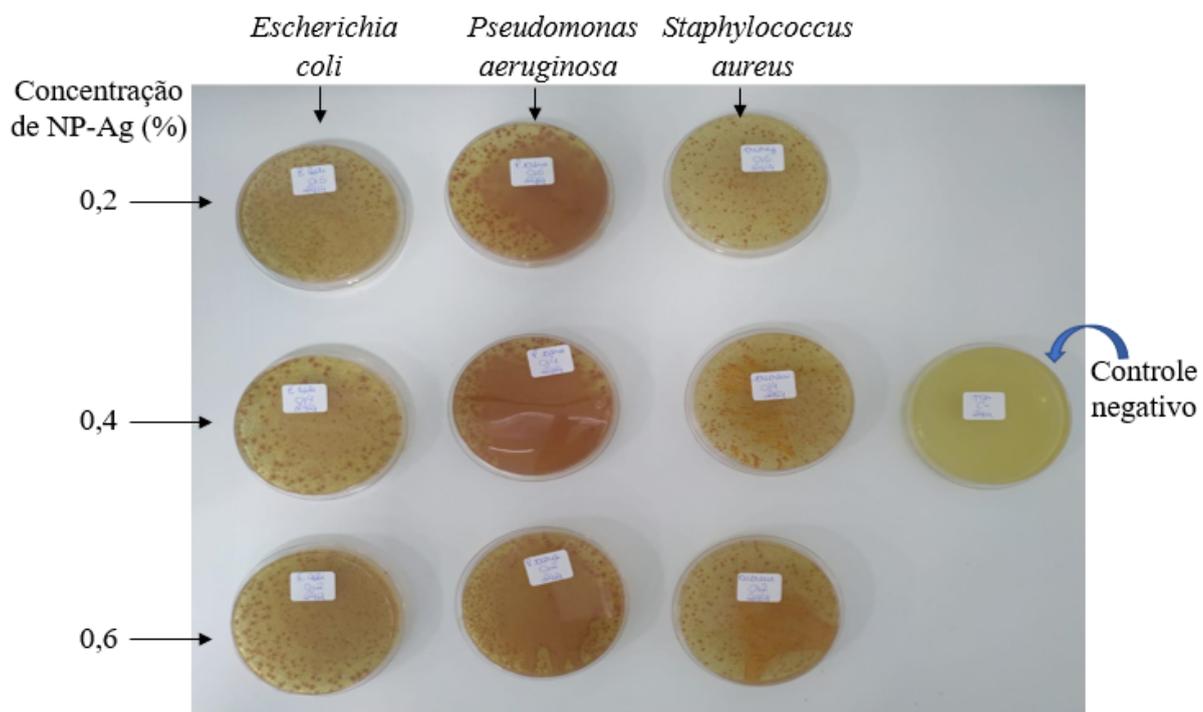
### Teste de Eficácia

Para avaliar se a solução de NP-Ag foi eficaz, foram preparados lotes laboratoriais com diferentes concentrações (0,2 %, 0,4% e 0,6% respectivamente), cada lote foi inoculado com aproximadamente 100 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), o estudo de eficácia foi avaliado no período de 24 horas, 14 e 28 dias.

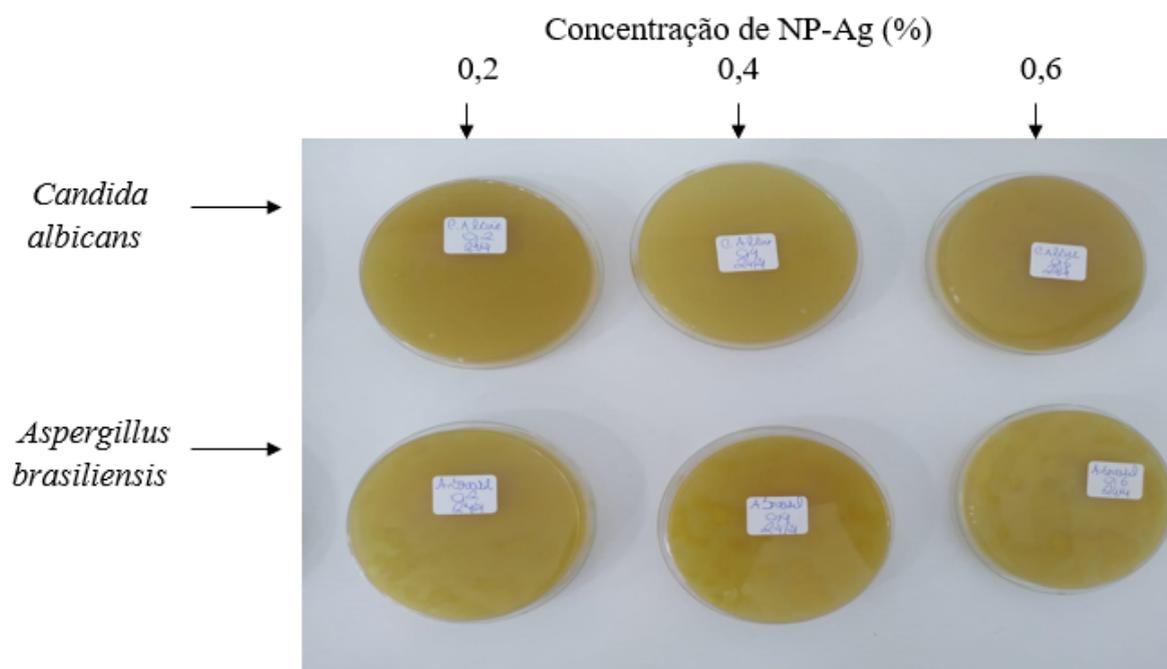
Nas figuras a seguir encontram-se os resultados da recuperação dos microrganismos nas diferentes concentrações. Verificou-se que para todas as concentrações foram detectadas colônias de bactérias (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus aureu*) e de levedura (*Candida albicans*) e do fungo (*Aspergillus brasiliensis*).

### 24 horas de estudo:

Houve crescimento microbiano de aproximadamente 100 UFCs em todas as placas, tal resultado se mostra dentro do esperado. A Figura 5 mostra os resultados iniciais para as bactérias e a Figura 6 mostra os resultados para a levedura e o fungo.



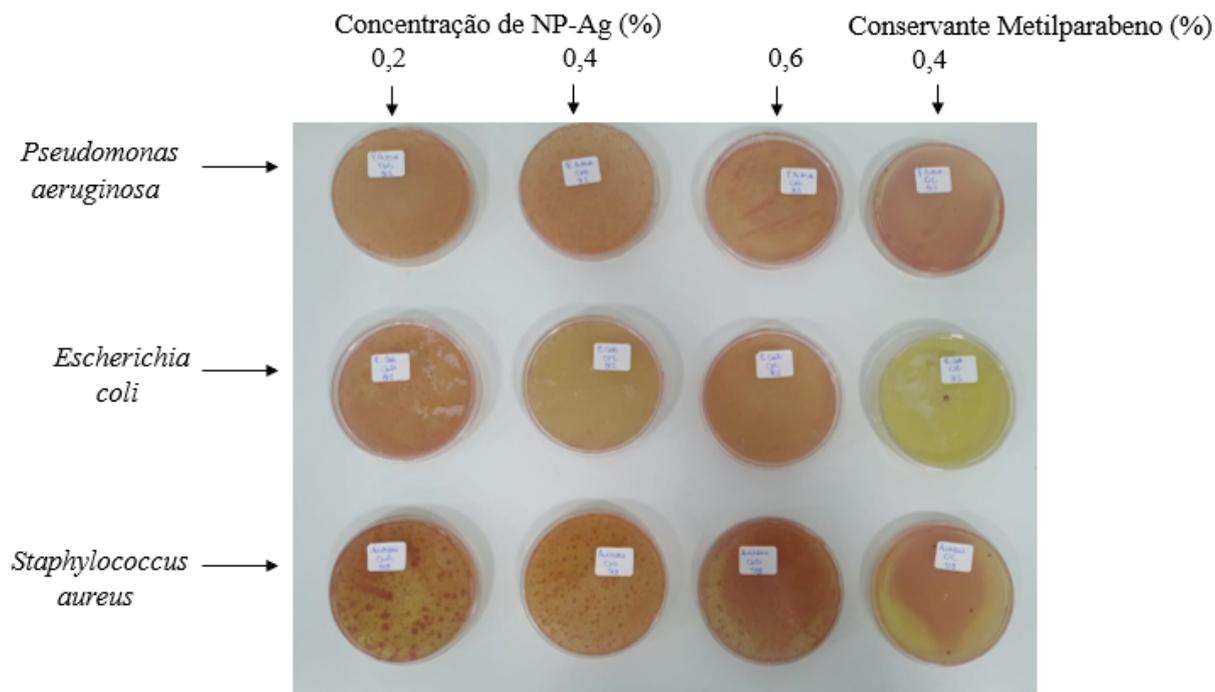
**Figura 5** - Resultado das primeiras 24 horas para as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.



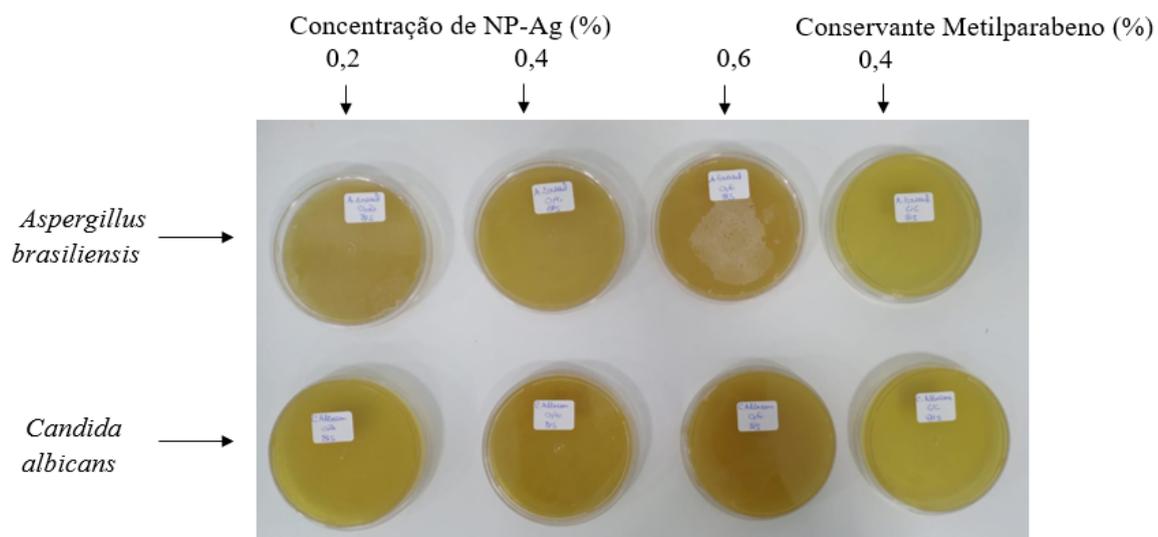
**Figura 6**- Resultado das primeiras 24 horas para a levedura *Candida albicans* e o fungo *Aspergillus brasiliensis*.

### 14º dia de estudo:

Após 14 dias de estudo, as alíquotas de 10 g das amostras foram analisadas, houve crescimento microbiano em todas as placas, não havendo redução significativa e/ou esperada para nas diferentes concentrações dentro deste intervalo de tempo. A Figura 7 mostra o resultado das bactérias, fungo e levedura.



**Figura 7-** Resultado 14º dia para bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



**Figura 8-** Resultado das primeiras 24 horas para para a levedura *Candida albicans* e o fungo *Aspergillus brasiliensis*.

### 28º dia de estudo:

Após 28 dias de estudo, as amostras foram testadas e o número de microrganismos nas placas não decaiu. Sendo assim, constatou-se que não houve redução no número de UFCs. As Figuras 9 e 10 demonstram os resultados.

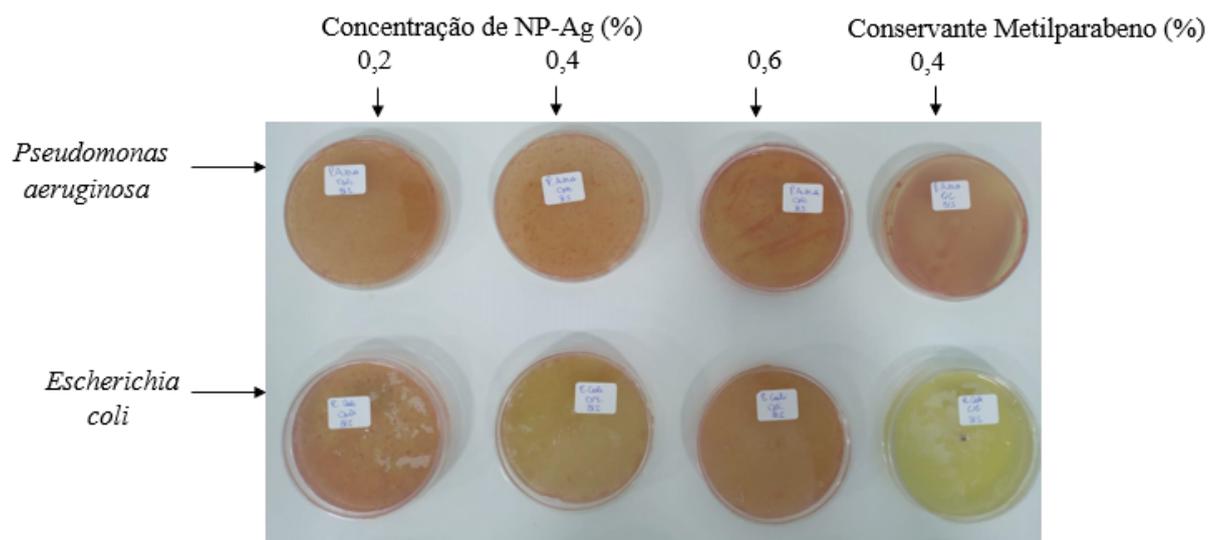


Figura 9- Resultado do 28º dia para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

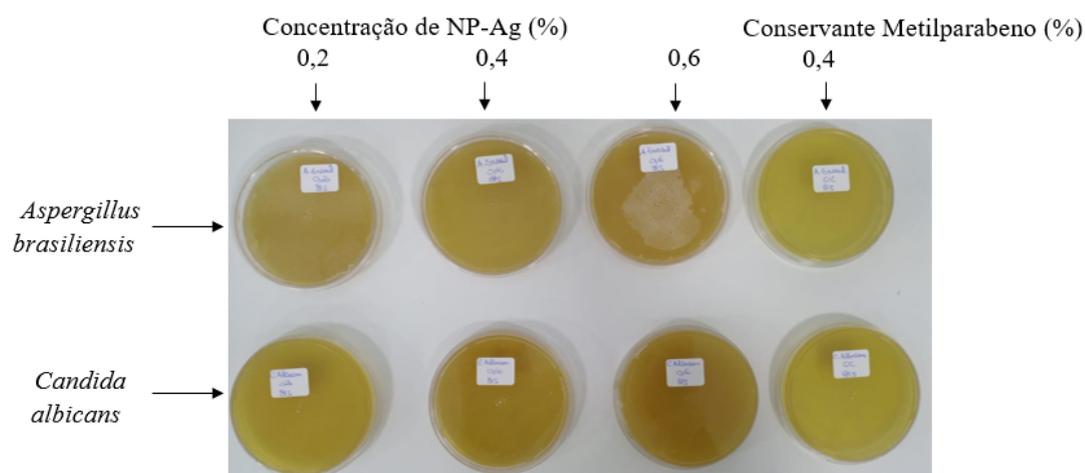


Figura 10- Resultado das primeiras 28º horas para a levedura *Candida albicans* e o fungo *Aspergillus brasiliensis*.

Os dados da contagem total de microrganismos também foram convertidos para base de logarítmica e estão descritos na Tabela 5

Tabela 5 – Resultado da redução logarítmica para diferentes concentrações de NP-Ag analisadas.

|                | Microorganismos               | Redução Log10 |             | Resultado por microorganismo | Resultado Final |
|----------------|-------------------------------|---------------|-------------|------------------------------|-----------------|
|                |                               | Dia 14        | Dia 28      |                              |                 |
| 0,2% de NP-Agg | <i>Escherichia coli</i>       | -0,18         | -0,12       | Não Eficaz                   | Não Eficaz      |
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -0,20         | -0,19       | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>S. aureus</i>              | -0,19         | -0,15       | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>Candida albicans</i>       | -0,19         | -0,13       | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>Aspergillus</i>            | 0,70          | -0,13       | Não Eficaz                   |                 |
| 0,4% de NP-Ag  | <i>Escherichia coli</i>       | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   | Não Eficaz      |
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>S. aureus</i>              | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>Candida albicans</i>       | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>Aspergillus</i>            | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |
| 0,6% de NP-Ag  | <i>Escherichia coli</i>       | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   | Não Eficaz      |
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>S. aureus</i>              | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>Candida albicans</i>       | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |
|                | <i>Aspergillus</i>            | Incontáveis   | Incontáveis | Não Eficaz                   |                 |

Devido ao grande número de UFCs, não foi possível realizar a contagem das placas no 14º dia e no 28º, uma vez que a contagem é feita à olho nu. Por conta disso, o valor é dado como "incontável" uma vez que as colônias de microrganismos estão aglomeradas em colônias muito pequenas e próximas uma das outras. Nessa situação, um contador de colônias automatizado é capaz de realizar a contagem.

### Conclusão:

Este trabalho teve como principal objetivo a realização da síntese da solução de nanopartícula de prata sua utilização como sistema conservante para avaliação de sua eficácia, logo o teste de Eficácia de Conservante foi utilizado para avaliar as possíveis variações em diferentes concentrações.

Sendo assim, conclui-se que a solução de nanopartículas de prata nas concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6% não é eficaz, pois, não houve redução significativa no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) nas amostras de creme no período total de incubação de 28 dias. Possivelmente, a concentração da solução foi baixa nas amostras, todavia como a metodologia do teste segue a RDC nº528 não é permitido o uso de mais de 0,4% de conservante na emulsão.

## **Agradecimentos:**

Agradecemos a todos os familiares e amigos que durante essa trajetória nos incentivaram e ofereceram todo o apoio em momentos desafiadores.

Também agradecemos a todos os envolvidos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, aos professores da Universidade São Francisco (USF) do campus Bragança Paulista - SP e em especial as professoras Sandra Elisabeth Paiva Da Silva pois sempre estava disposta a esclarecer dúvidas e a nossa professora orientadora Roberta Martins da Costa Bianchi que aceitou o nosso desafio.

Agradecemos a Flávia Silva Xavier e ao Marcelo Prodossimo Guariniello que estão conosco desde o início da graduação em Engenharia Química por todas as trocas de conhecimento técnico e de vida. A todos que fizeram parte dessa trajetória, somos gratos.

## **Referências Bibliográficas**

AIKEN, J.D.; FINKE, R.G. 1999. **A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis**, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 145:1-44.

ALIVISATOS, A.P. 1997. **Nanocrystals: building blocks for modern materials design**. Endeavour, 21:56-60.

ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. Anvisa, v. 2, p. 1-74, 2012b.

CHOPRA, I. 2007. **The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59:587-590. [Acedido em 20 de Outubro de 2021]

Colloids and Surfaces A: **Effect of the synthesis and storage conditions**. Physicochemical Engineering Aspects, 364:19-25.

D. J. English, **“Microbiology in Cosmetics – Challenges in Cosmetic Manufacturing,”** [Online]. Available: [http://www.cbinet.com/sites/default/files/files/English\\_Don\\_pres.pdf](http://www.cbinet.com/sites/default/files/files/English_Don_pres.pdf).

DO NASCIMENTO, L. D. et al. **Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications**. Biomolecules, v. 10, n. 7, p. 1-37, 2020.

D. S. Orth, J. J. Kabara, S. P. Denyer e S. K. Tan, **“Preservation of cosmetics and drugs”** em Cosmetic and Drug Microbiology, New York, London, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006, p. 2.

E. Liikanen, **“Efficacy of antimicrobial preservation,”** em *European Pharmacopeia, edition 9.3*, 2018, 9. 557

E. Liikanen, **“DIRECTIVA 2003/94/CE DA COMISSÃO de 8 de Outubro de 2003 que estabelece princípios e directrizes das boas práticas de fabrico de medicamentos para uso”**, em Jornal Oficial da União Europeia, 2003.

FONSECA, G.S. 2005. **Nanopartículas de irídio em líquidos iônicos: síntese, caracterização e aplicação em reações de hidrogenação catalítica.** Porto Alegre, RS. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 252 p. [Acedido em 20 de Outubro de 2021]

GUZMÁN, M.G.; DILLE, J.; GODET, S. 2009. **Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity.** International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering, 2:104-111.

HERMAN, A. et al. **Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion.** Indian Journal of Microbiology, v. 53, n. 2, p. 232–237, 2013.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.H.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. 2007. **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 3:95-101. [Acedido em 20 de Outubro de 2021]

KUNICKA-STYCYŃSKA, A.; SIKORA, M.; KALEMBA, D. **Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems.** Journal of Applied Microbiology, v. 107, n. 6, p. 1903–1911, 2009.

LARA, H. H.; GARZA-TREVIÑO E. N.; IXTEPAN-TURRENT L.; e SINGH D. K.; **Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds.**[Acedido 17 de Novembro de 2021]

“**LIST OF PRESERVATIVES ALLOWED IN COSMETIC PRODUCTS,**” em European Commission: Annex V, em CosIng, 2018.

Lundov, M.D., et al. , **Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy.** Contact Dermatitis 2009. 60: p. 70-78.

MELO JR, Maurício Alves et al. **Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino.** Química nova, v. 35, p. 1872-1878, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS, A. N. DE V. S.-A. **Farmacopeia Brasileira, 6a edição.** Farmacopeia Brasileira, 6a edição, v. 1, p. 60–69, 72–85, 2019.

M. Goins, “**Determining antimicrobial effectiveness,**” 9 Março 2018. [Online]. Available: <https://www.qlaboratories.com/determining-antimicrobial-effectiveness/>

Moser, C.L.M., B. K. , **Comparison of Compendial Antimicrobial Effectiveness Tests.** AAPS PharmSciTech, 2011. 12(1): p. 222-226

MORONES, J. R., ELECHIGUERRA, J. L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J. B., RAMIREZ, J. T., e YACAMAN, M. J.; **The Bacterial effect of silver nanoparticles.**

Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M.,Sobarzo Sanchez, E., Daglia, M., Nabavi, S. M. **Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries.** Nutrients,v.7, p.7729 - 7748, 2015

NOSTRO, A. et al. **Preservative properties of Calamintha officinalis essential oil with and without EDTA.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, n. 5, p. 385–389, 2002.

PETICA, A.; GAVRILIU, S.; LUNGU, M.; BURUNTEA, N.; PANZARU, C. 2008. **Colloidal silver solutions with antimicrobial properties.** *Materials Science and Engineering B*, 152:22-27.

PINTO, V.V.; FERREIRA, M.J.; SILVA, R.; SANTOS, H.A.; SILVA, F.; PERREIRA, F. 2010. **Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium**

“**Preservatives for Cosmetic,**” 2016. [Online]. Available:  
[http://www.ingredientstodiefor.com/item/Preservatives\\_for\\_Cosmetics/281/](http://www.ingredientstodiefor.com/item/Preservatives_for_Cosmetics/281/).

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 528, DE 4 DE AGOSTO DE 2021 Dispõe sobre a “**Lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza**” a Resolução GMC MERCOSUL nº 35/20.

Saúde, M.d., **Regime jurídico aplicável aos produtos cosméticos e de higiene corporal**, in Decreto-Lei nº 189/2008, de 24 de Setembro. 2008: Diário da Republica. p. 6826-6905.

S. M. Shaikh, R. C. Doijad, A. S. Shete1 e P. S. Sankpa, “**A review on: Preservatives used in pharmaceuticals and impacts on health,**” Acedido em 19 de Novembro de 2021 . [Online]. Disponível:  
<https://www.pharmatutor.org/articles/a-review-on-preservatives-used-in-pharmaceuticals-and-impactson-health>

S. P. Denyer e R. M. Baird, “**Chelating Agents,**” em *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, 2ª edition, New York, London, CRC Press- Taylor & Francis Group, 2007, p. 360.

Siegert, W., **ISO 11930 - A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation.** *SOFW Journal - International Journal for Applied Science*, 2012. 138: p. 44-53.

Srikanth, R.; Siddartha, G.; Sundhar, Reddy, C. H. S. S.; Harish, B.S.; Janaki Ramaiah, M.; Uppuluri, K. B. **Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from Acetobacter xylinum NCIM2526 and its statistical optimization.** *Carbohydrate Polymers*, v.123, p.8-16,2015

U. T. Shrestha, “**Factors affecting microbial spoilage of pharmaceutical products,**” 11 setembro 2017. [Online]. Available: <http://upendrats.blogspot.com/2017/09/factors-affecting-microbial-spoilageof.html>.

Wang, J.; Lia, Y.; Gao, Y.; Xie, Z.; Zhou, M.; He, Y.; Wu, H.; Zhou, W.; Dong, X.; Yang, Z.; Hu, Y. **Cinnamon oil - loaded composite emulsion hydrogels with antibacterial activity prepared using concentrated emulsion templates.** *Industrial Crops and Products* , v.112, p.281-289, 2018.