República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0804288-8 A2**

* B R P I 0 8 0 4 2 8 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 06/10/2008
(43) Data da Publicação: 13/07/2010
(RPI 2062)

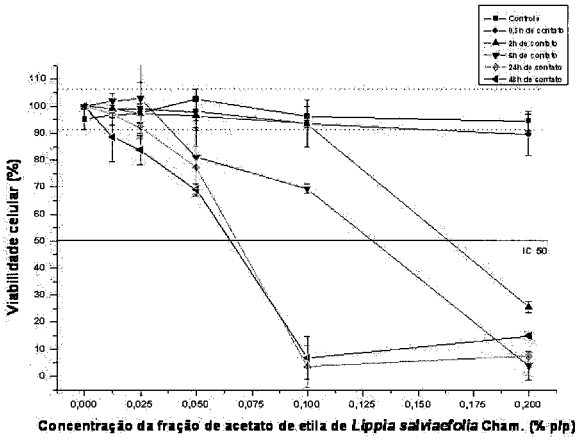
(51) Int.Cl.:
A61K 36/85
A61K 8/97
A61P 31/00

(54) Título: **EXTRATOS DE LIPPIA SALVIAEFOLIA CHAM., FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÕES E SEU USO**

(73) Titular(es): Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): BEATRIZ RESENDE FREITAS, PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO, TELMA MARY KANEKO

(57) Resumo: EXTRATOS DE LIPPIA SALVIAEFOLIA CHAM., FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÕES E SEU USO. A presente invenção refere-se aos extratos de folhas de Lippia salviaefolia cham., suas frações ativas, composições farmacêuticas e/ou cosméticas e seu uso como antimicrobiano natural (conservante).



PI0804288-8

"EXTRATOS DE *LIPPIA SALVIAEFOLIA* CHAM., FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÕES E SEU USO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham., suas frações ativas, composições farmacêuticas e/ou cosméticas e seu uso como antimicrobiano natural (conservante).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. Estas espécies estão distribuídas principalmente pelos países da América do Sul e América Central, e pelos territórios tropicais da África (TERBLANCHÉ, F. C. & KORNELIUS, G., Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) A literature review. *J. Ess. Oil Re.* 8, 471-485, 1996). A maioria das espécies do gênero *Lippia* é tradicionalmente utilizada no tratamento de afecções gastrintestinais e respiratórias. Algumas espécies demonstraram atividade antimalarial, antiviral e citostática. (MORTON In: *Atlas of Medicinal Plants of Middle America* I, Springfield, Illinois, USA (1981), pp. 745-750; GASQUET, M., DELMAS, F., TIMÓN-DAVID, P., KEITA, A., GUINDO, M. KOITA, N., DIALLO, D., DOUMBO, O., Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, "Malarial-5". *Fitoterapia.* 64, 423-427, 1993; ABAD, M. J., SANCHEZ, S., BERMEJO, P., VILLAR, A., CARRASCO, L., Antiviral activity of some medicinal plants. *Met. Find.*, 17 (Suppl. A) p.108, 1995). Em geral, o gênero apresenta um perfil consistente de composição química, atividades farmacológicas e uso tradicional. Duas das espécies mais importantes desse gênero são *L. multiflora* e *L. alba* (PASCUAL, M. E., SLOWING, K., CARRETEO, E., SÁNCHEZ MATA, D., VILLAR, A., *Lippia:* Traditional uses, chemistry and Pharmacology: a review. *J. of*

Ethnopharmacol. 76, Issue 3, 201-214, 2001). Na literatura, existe ainda registro de outras espécies do gênero *Lippia* com atividade antimicrobiana como a *Lippia sidoides* (COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R.; 2002. Constituintes químicos da *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. *Rev. Bras. de Farmacog.*, v. 12, supl., p. 66-67.) e a *Lippia adoensis* (TAGET, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K. GEBRE-MARIAM, T., Antimicrobial actives of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *J. of Ethnopharmacol.* 100, p. 168-175, 2005), dentre outras. Entretanto, não existem referências na literatura sobre atividade farmacológica, estudos de toxicidade ou uso tradicional da espécie *L. salviaefolia.*

A *L. salviaefolia* é uma planta originaria do cerrado brasileiro, pertence ao grande grupo das Dicotiledôneas, família das Verbenáceas. Como hábito vegetativo, é caracterizado como arbusto com folhas aromáticas, tubo da corola amarelado e flores brancas aromáticas.

Bactérias e fungos são capazes de crescer nos produtos cosméticos quando existem nutrientes disponíveis e as condições do meio são satisfatórias. Para esta finalidade, os conservantes devem apresentar atividade antimicrobiana efetiva e serem seletivamente tóxicos e eficazes contra bactérias, Gram-positivas e/ou Gram-negativas, bolores e leveduras. Entretanto, devido às características intrínsecas, a maioria dos conservantes de origem sintética pode apresentar reações tóxicas ao usuário, tais como irritação local, dermatite de contato, hipersensibilidade e outras.

A comprovação da qualidade microbiana em produtos cosméticos visa evitar a transmissão de doenças quando estes são utilizados de forma correta, além de assegurar a estabilidade da

preparação e, conseqüentemente, sua eficácia. Os cosméticos necessitam de conservantes capazes de reduzir a carga microbiana em níveis aceitáveis durante seu uso dentro do prazo de validade. Assim, se faz necessária a avaliação da eficácia dos conservantes em formulações cosméticas, determinando a segurança do uso do produto, visando testar a capacidade conservadora do cosmético durante sua fabricação e durante o seu prazo de validade, ao longo do seu uso pelo consumidor.

Em geral, os conservantes de origem sintética, têm características lipofílicas, a utilização de extratos aquosos ou hidroalcóolicos pode ser mais efetiva, uma vez que o crescimento dos microrganismos ocorre principalmente em meio aquoso.

A utilização de componentes ativos de origem natural na produção de cosméticos tem crescido muito nos últimos anos. A busca cada vez maior de cosméticos eficazes e seguros tem sido constante.

O desenvolvimento de medicamentos e derivados de origem vegetal é de grande importância na cultura e tradição da história da humanidade. A maioria da população urbana pobre, assim como em pequenas comunidades rurais, confia e faz grande uso da medicina natural, utilizando plantas, assim como extratos naturais no tratamento de suas enfermidades. Esse fato se dá devido à cultura dessas populações e principalmente pela acessibilidade e disponibilidade desse tipo tratamento. Como conseqüência, existe uma crescente tendência mundial, em integrar a medicina tradicional ao cuidado médico primário (FENNEL, C. W., LINDSEY, K. L., MC. GAW, L. J., SPARG, S. G., STAFFORD, G. I., ELGORASHI, E. E., GRACE, O. M., VAN STADEN, J., Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. of Ethnopharmacol.* 94, 205-217, 2004). Adicionalmente, pesquisas para

desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos efetivos são necessárias devido ao desenvolvimento da resistência microbiana e a ocorrência de infecções oportunistas fatais associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA, C., MARINO, S., VIVOT, E., CRUAÑES, M. C., MUÑOZ, J. DE D., CRUAÑES, J., FERRARO, G., GUTKIND, G., MARTINO, V., Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J. of Ethnopharmacol.* 77, 37- 40, 2001). Inúmeras pesquisas extensivas têm sido desenvolvidas no intuito de encontrar e classificar agentes antimicrobianos de extratos de plantas e produtos naturais, sendo que um grande número de plantas representa fonte potencial nesta busca. (DE SMET, P.A.G.M., 1997, The role of plant – derived drugs and herbal medicines. *Healthcare Drugs*, v. 54, n. 6, p. 801-840; COWAN, M. M., Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microb. Rev.*, v. 12, p. 564-582, 1999; HERNÁNDEZ-PEREZ, M., RABANAL, R. M., ARIAS, A., DE LA TORRE, M. C., RODRIGUES, B. Aethiopinone, an antibacterial and citotoxic agent from *Salvia aethiopis* roots. *Pharm. Biol.* 37 (1), 17-21, 1999; SOKMEN, A., JONES, B. M., ERTURK, M., The in Vitro antibacterial activity of Turkiv medicinal plants. *J. of Ethnopharmacol.* 67, 79-86, 1999; KELMANSON, J. E., JÄGER, A. K., VAN STADEN, J., Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. of Ethnopharmacol.* 69, 241-246, 2000; SRINIVASAN, D., NATHAN, S., SURESH, T., PERUMALSAMY, O., Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J. of Ethnopharmacol.* 74, 217-220, 2001, MARTINI, N. D., KATERERE, D. R. P., ELLOF J. N., Biological activity of five antimicrobial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J. of Ethnopharmacol.*. 93, 207-212, 2004; MITSCHER, L. A., DRAKE S., GALLAPUDI, S. R., OIUNTE, K., A modern look at

folkloric use of anti-infective agents. *J. of Natural Product.* 50, 1025-1040, 1987; CUTCHEON, A. R., STOKES, R. W., THORSON, L. M., ELLIS, S. M. HANCOCK, R. E. W., Anti-mycobacterial screening of British Columbian medicinal plants. *Intern. J. of Pharmacognosy.* 32, 77-83. 1997; MENG, J. C., ZHU, Q. X., THAN, R. X., New antimicrobial mono and sesquiterpenes from Soroseris hookeriana subsp. *Erysimoides, Planta Medica.* 66, 541-544, 2000; RUBERTO, G., BARATTA, M. T., DEANS, S. G., DORMAN, H. J. D.,. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foenicullum vulgare* and *Criyhmum maritimum* essential oils. *Planta Medica.* 66, 687-693, 2000; HO, K. Y., TSAI, C. C., HUANG, H. S., CHEN, C. P., LIN, T. C., LIN, C. CAntimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis – idaea,* L. *J. of Pharm. and Pharmacol.* 53, 187-191, 2001).

A variação observada freqüentemente, nos resultados quando são testados extratos de plantas para atividade antimicrobiana pode ser atribuída a inúmeros fatores. Estes incluem a técnica de ensaio, meio de cultura, cepa das bactérias ou fungos, tempo, fonte da planta (fresca ou seca), e a quantidade testada do extrato dentre outros (FENNEL, C. W., LINDSEY, K. L., MC. GAW, L. J., SPARG, S. G., STAFFORD, G. I., ELGORASHI, E. E., GRACE, O. M., VAN STADEN, J., Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. of Ethnopharmacol.* 94, 205-217, 2004). Porém, estes fatores não são empecilhos na busca da padronização e maiores pesquisas englobando a atividade antimicrobiana de extratos naturais.

O estudo da atividade antimicrobiana de substâncias usadas em produtos farmacêuticos e cosméticos é um tema que vem se desenvolvendo bastante, e somente nos últimos 60 anos tem sido tratado de maneira científica. Grande importância é dada ao assunto,

devido à preocupação não somente com o aspecto microbiológico, mas também com o potencial de irritação e toxicidade ao consumidor (PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T., *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2003).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada por meio da determinação da menor quantidade da substância em estudo necessária para inibir o crescimento do microrganismo em teste; esse valor é conhecido como CMI (MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J., *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000. 9th ed. p. 750-751). Um aspecto bastante relevante na determinação da CMI de extratos vegetais é a preocupação, mencionada anteriormente, principalmente em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais e/ou combinações (PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T., *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2003).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA, C., MARINO, S., VIVOT, E., CRUAÑES, M. C., MUÑOZ, J. DE D., CRUAÑES, J., FERRARO, G., GUTKIND, G., MARTINO, V., Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J. of Ethnopharmacol.* 77, 37-40, 2001). O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é que a

utilização do estudo da CMI serve como primeiro "screening" na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes.

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem a difusão em ágar e macro e microdiluição (PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T., *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.* São Paulo: Atheneu, 2003; COLLINS, C.H., Antimicrobial susceptibility tests. In: _____. *Microbiological methods.* 7.ed. Oxford : Butterworth-Hunemann, 1995, p. 178-205; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J., *Brock biology of microorganisms.* Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000. 9th ed. p. 750-751). Para determinar a CMI ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado abundantemente o método sensível de microdiluição (ELOFF J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Médica,* v. 64, p. 711-713, 1998).

A estabilidade pode ser definida como a capacidade de um produto contendo ou não substâncias ativas, de manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas, toxicológicas e bioativas, dentro dos limites especificados previamente durante todo seu prazo de validade, pois esses produtos quando comercializados passam por um sistema de estocagem e distribuição e podem ficar sujeitos ao calor prolongado e a umidade (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos/Agência Nacional de vigilância Sanitária - 1ª ed. – Brasília ANVISA, 2004. 52 p. (Série validade em cosméticos); v.1).

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto

nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade. Essa estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto.

A qualidade microbiana de um produto cosmético e farmacêutico deve ser avaliada com o objetivo de garantir a eficácia e segurança em seu prazo de validade e condição de uso. A comprovação dos níveis de contaminação microbiana dos produtos não estéreis visa evitar a transmissão de doenças e assegurar a estabilidade do produto. A presença de microrganismos, acima dos limites aceitáveis, pode acarretar problemas clínicos aos usuários e também, dependendo do microrganismo presente, o efeito tóxico do produto contaminado põe em risco a vida do paciente (PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T., *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2003). O perigo relativo criado pela contaminação microbiológica desses produtos pode ser relatado pela severidade da infecção ou doença causada. Microrganismos como *Pseudomonas, Proteus, Staphylococcus, Serratia, Streptococcus, Penicilium, Aspergillius* e o gênero *Candida* são classificados como de riscos à saúde (BAIRD, R.M., HODGES, N.A., Denyer, S.P. (Eds) (2000) Handbook of Microbiological Quality Control: Pharmaceuticals and Medical Devices Taylor & Francis, London, 2000, p.254).

Uma das principais fontes de contaminação microbiana das formulações cosméticas e farmacêuticas é a água (CROSHAW, B., Preservatives for cosmetics and toiletries. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.28, p.3-16, 1977; DIEHL, K. H., Important secondary conditions for optimal use of cosmetic preservatives. *Parfum Kosmet.*, Heidelberg, v.71, n.60, p.396-400, 1990; MALCOLM, S. A., Microbiological monitoring and quality control. *Manuf. Chem. Aerosol News,* London, v.51, nov., p.55-

56, 1980). O gênero *Pseudomonas* é o mais citado na literatura (ORTH, D. S., Preservative Efficacy Testing of Aqueous Cosmetics and Drugs Without Counting Colonies. *Cosmet. & Toilet.* 116:41-47, 2001; TENEMBAUM, S. Considerations leading to development of the microbial limit guidelines of the CTFA. *Cosmetics & Toiletries*, v.93, n.3, p.78-83, 1977; VAN ABBÉ, N. J. HUGHES, O., DIXON, H. WOODROFFE, R. S. C., The hygienic manufacture and preservation of toiletries and cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1970, v.21, p.719-800), mas também foram encontrados *Xanthomonas, Flavobacterium, Achromobacter* e *Aerobacter*. Segundo alguns autores; TENEMBAUM, S., Considerations leading to development of the microbial limit guidelines of the CTFA. *Cosmet. Toilet.*, v. 93, n.3, p. 78-83, 1977) a carga bacteriana atingiu a ordem de 10^6 UFC/mL.

Outras fontes importantes de contaminação microbiana referem-se às matérias-primas de origem natural (McCARTHY, T. J., Microbiological control of cosmetic products. *Cosmet. & Toilet.,* Oak Park, v.95, n.8, p. 23-27, 1980; O'NEILL, J. J., MEAD, C. A., The parabens: bacterial adaptation and preservative capacity. *J. Soc. Cosmet. Chem.* New York, v.33, p.75-84, 1982). Os autores BONOMI e NEGRETTI investigaram a qualidade microbiana de várias dessas matérias-primas, principalmente de origem vegetal, usualmente empregada nas preparações farmacêutica (BONOMI, E., NEGRETTI, F., Ricerche sul contenudo microbico di materie prime impiegatte nelle preparazioni farmaceutche. *Ann. Ist. Super. Sanitá*, v. 13, n.4, p. 805-832, 1977). As matérias-primas de origem sintética ou semi-sintética apresentam, geralmente, baixa carga microbiana contaminante com exceção de algumas como poliglicóis ou polietilenoglicóis.

Os produtos com sua formulação e sua embalagem primária contribuem para o desenvolvimento microbiano, pois podem

conter carboidratos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, glicosídeos, alcoóis graxos, esteróides, peptídeos e vitaminas. Esses substratos podem servir de nutrientes para microrganismos contaminantes (MADDEN, I., JACKSON, G. I., Cosmetic preservation and microbes: viewpoint of the Food and Drug Administration. *Cosmet. & Toilet.*, Oak Park, v. 96, n. 10, p. 75-78, 1981). O material de acondicionamento pode ser fonte de contaminação, quando não adequadamente limpos (SMART, R., SPOONER, D. F., Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.23, 1972, p.721-737; VAN ABBÉ, N. J. HUGHES, O., DIXON, H. WOODROFFE, R. S. C., The hygienic manufacture and preservation of toiletries and cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1970, v.21, p.719-800). Os componentes podem interagir com os conservantes utilizados na formulação, como os parabenos que podem ser adsorvidos por recipientes plásticos resultando em diminuição de sua atividade conservante (BAHAL, S.M. & ROMANSKY, J.M., Sorption of parabens by fexible tubings. *Pharm Dev Technol.*, Aug; 6(3) : 431-40, 2001). Outro aspecto a ser considerado é o da contaminação do produto pelo próprio usuário sendo necessárias recomendações adequadas na sua utilização e o uso de conservantes na formulação.

Os pesquisadores BONOMI e NEGRETTI também investigaram o conteúdo microbiano das matérias-primas empregadas nas preparações farmacêuticas. Segundo esses autores, os problemas criados pela contaminação microbiana podem ser minimizados pelo uso de matérias-primas que não apresentem histórico de carga microbiana ("bioburden") inaceitável, pela adoção das boas práticas de fabricação validadas para reduzir o risco de contaminação durante o processo, e pelo uso efetivo de sistemas conservantes em formulações (BONOMI, E., NEGRETTI, F., Ricerche sul contenudo microbico di materie prime

impiegatte nelle preparazioni farmaceutche. *Ann. Ist. Super. Sanitá*, v. 13, n.4, p. 805-832, 1977).

Diante de todos os fatores que podem contribuir para a contaminação e visando a eficácia do produto e a segurança do consumidor, classicamente tem sido utilizada a adição de conservantes nas formulações. Estas são substâncias adicionadas às formas farmacêuticas e cosméticas com o intuito de evitar a contaminação microbiana. Sua função é inibir o crescimento de microrganismos no produto, conservando-o livre de deteriorações causadas por bactérias, bolores e leveduras. Eles podem ter atividade bacteriostática e/ou fungistática, sendo utilizados principalmente nos produtos de múltiplas doses, que podem apresentar contaminação. Escolher um sistema conservante adequado para um produto cosmético requer consideração cuidadosa quanto ao tipo do produto, seu uso, características de formulação e provável desafio microbiano. A seleção definitiva do(s) agente(s) conservante(s) deve ser um compromisso entre eficácia antimicrobiana e compatibilidade com o produto (PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T., *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2003).

A efetividade do sistema conservante em preparações farmacêuticas ou cosméticas está relacionada com a composição da formulação, o tipo de material de acondicionamento, grau de pureza das matérias-primas, utilização correta pelo consumidor, forma de aplicação, e do próprio sistema conservante. Mesmo com todo rigor exigido de higiene durante a fabricação (GMP – Good Manufacturing Practice), controle de qualidade e uso de matérias-primas com conteúdo permissível de microrganismo, ainda existe a possibilidade de contaminação secundária. Entretanto, alguns componentes mesmo não

sendo substâncias antimicrobianas típicas, podem ajudar contra a proliferação de microrganismos, aumentando a efetividade dos conservantes. Os requisitos gerais para o crescimento microbiano são: água, energia, fontes de nitrogênio, minerais e vitaminas em um ambiente com níveis adequados de oxigênio, pH e temperatura (PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., OHARA, M. T., *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.* São Paulo: Atheneu, 2003).

Os conservantes, mesmo os origem natural são substâncias intrinsecamente tóxica, portanto a concentração utilizada deve ser pequena. O sistema conservante utilizado em uma formulação pode exercer um efeito bacteriostático, ou seja, mantém o mesmo nível de microrganismos ou diminui, porém não destrói. Ou ainda um efeito biocida de destruição. A ação do sistema conservante normalmente se processa por meio da combinação com grupamentos químicos dos conservantes com as proteínas microbianas, ou através da ação competitiva com determinados processos enzimáticos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra a cromatografia em camada delgada das frações de acetato de etila de *L. salviaefolia.*

A figura 2 refere-se aos espectros da fração 4 da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia.* Análise por CG-EM.

A figura 3 indica a atividade antimicrobiana do extrato total de *L. salviaefolia* frente a *S. aureus.* Experimento realizado em três replica com três repetições para cada concentração. Valores correspondem a média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 4 apresenta a atividade antimicrobiana da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* em frente a *S. aureus*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 5 demonstra a atividade antimicrobiana da fração de clorofórmica de *L. salviaefolia* frente a *S. aureus*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração clorofórmica do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 6 refere-se a atividade antimicrobiana das frações (1-9) da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* na concentração de 1,0 mg/mL, frente a *S. aureus*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções das frações (1-9) de acetato de etila do extrato total na concentração de 1,0 mg/mL.

A figura 7 mostra a atividade antimicrobiana da fração 3 proveniente da fração de acetato de etila frente a *S. aureus*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da

fração 3 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações

A figura 8 indica a atividade antimicrobiana da fração 4 proveniente da fração de acetato de etila frente a *S. aureus*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração 4 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 9 apresenta a atividade antimicrobiana do extrato total de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 10 demonstra a atividade antimicrobiana da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 11 revela a atividade antimicrobiana da fração de clorofórmica do extrato de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+:

Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração clorofórmica do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 12 refere-se a atividade antimicrobiana da fração 3 proveniente da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração 3 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 13 apresenta a atividade antimicrobiana da fração 4 proveniente da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* frente a *E. coli*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem a média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis= Cc: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL), soluções da fração 4 proveniente da fração de acetato de etila do extrato total em diferentes concentrações.

A figura 14 mostra a atividade antimicrobiana da naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *S. aureus*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

A figura 15 demonstra a atividade antimicrobiana da naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *E. coli*. Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação

espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Cloranfenicol (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

A figura 16 revela a atividade antimicrobiana da naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *C. albicans.* Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Nistatina (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

A figura 17 apresenta a atividade antimicrobiana da naringenina, extratos e frações da *L. salviaefolia* frente a *P. aeruginosa.* Experimento realizado em três replica com três repetições. Valores correspondem à média de cada variável. Determinação espectrofotométrica a 630 nm. Variáveis: Controle de crescimento; Cs: controle do solvente; C+: Amikacinal (1 mg/mL); solução de naringenina em diferentes concentrações.

A figura 18 mostra o branco 24h – Controle do composto dérmico-epidérmico após 24hs no sistema de cultivo na interfase ar-líquido.

A figura 19 revela o composto dérmico-epidérmico após 24hs de contato com a base gel sem a adição de *L. salviaefolia.*

A figura 20 refere-se ao composto dérmico-epidérmico após 24hs de contato com a formulação gel incorporado com fração de acetato de etila de L. salviaefolia.

A figura 21 demonstra o composto dérmico-epidérmico após 24hs de contato com a base creme sem a adição de *L. salviaefolia.*

A figura 22 indica o composto dérmico-epidérmico após 24hs de contato com a formulação creme incorporada com fração de acetato de etila de *L. salviaefolia.*

A figura 23 refere-se ao composto dérmico-epidérmico após 24hs de contato com a base xampu sem a adição de *L. salviaefolia.*

A figura 24 demonstra o composto dérmico-epidérmico após 24hs de contato com a formulação xampu incorporado com fração de acetato de etila de L. salviaefolia.

A figura 25 apresenta o branco 48hs – Controle do composto dérmico-epidérmico após 48hs no sistema de cultivo na interfase ar-líquido.

A figura 26 indica o composto dérmico-epidérmico após 48hs de contato com a base gel sem a adição de *L. salviaefolia.*

A figura 27 refere-se ao composto dérmico-epidérmico após 48hs de contato com a formulação gel incorporado com fração de acetato de etila de L. salviaefolia.

A figura 28 demonstra o composto dérmico-epidérmico após 48hs de contato com a base creme sem a adição de *L. salviaefolia.*

A figura 29 demonstra o composto dérmico-epidérmico após 48hs de contato com a formulação creme incorporada de fração acetato de etila de *L. salviaefolia.*

A figura 30 mostra o composto dérmico-epidérmico após 48hs de contato com a base xampu sem a adição de *L. salviaefolia.*

A figura 31 revela o composto dérmico-epidérmico após 48hs de contato com a formulação xampu com incorporada com fração de acetato de etila de *L. salviaefolia.*

A figura 32 apresenta a viabilidade celular através do estudo de citoxicidade em cultura de queratinócitos humanos da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia,* em diferentes concentrações

(0,0125 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, e 0,2 %) e diferentes tempos de contato (0,5h, 1h, 2hs, 6hs, 24hs e 48hs).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham., suas frações ativas, composições farmacêuticas e/ou cosméticas e seu uso como antimicrobiano natural (conservante).

Em uma primeira realização o presente pedido destina-se aos extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham., tais como, extratos hidroalcoólico, diclorometano, acetato de etila e/ou clorofórmico. Preferencialmente, o presente pedido destina-se aos extratos de acetato de etila e a clorofórmica da *L. salviaefolia.*

As frações ativas caracterizam-se por conter os componentes ativos, por exemplo, flavonóides totais e fenóis totais, em particular, os ativos contidos, nas frações da presente invenção, referem-se aos 4',5-dihidroxi-7-metoxi-flavonona, a naringenina e o apiflorol.

Em uma segunda realização, o pedido de patente provê formulações cosméticas e/ou farmacêuticas contendo os ditos extratos e/ou suas frações ativas. De forma geral, as formulações referem-se às emulsões, géis, cremes, pomadas, soluções, porém, não se limitando a estes. Em particular, as formulações da presente invenção tratam de cremes, xampus e géis.

As composições creme podem ser elaboradas com cera auto-emulsionante e/ou tensoativo, por exemplo, estearatos de poliglicerila, álcool cetoestearílico, sesquiestearato de metilglicose PEG-20; opcionalmente, agentes de consistência polimérica, tais como, o monoestearato de glicerila, dispersão de hidroxietilcelulose 2% p/v; como emoliente, o óleo mineral, acetato de cetila e/ou álcool de lanolina acetilado, silicone volátil, 2-octil-dodecanol; como umectante, propilenoglicol e/ou glicerina; e conservantes, tais como os parabenos.

COMPOSIÇÃO CREME

Emulsões (Creme)	**% p/p**
Cera auto-emulsionante e/ou tensoativos e agentes de consistência	5,0-15,0
Emolientes	3,0-10,0
Umectantes	1,5-7,5
Extrato da fração de. Acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,2
Agente de consistência polimérico	0,15-1,0
Essência	q.s.
Água destilada q.s.p.	100,00

As composições géis podem apresentar em sua composição agente de consistência poliméricos e/ou gelificantes, por exemplo, polímeros carbonílicos, hidroxicelulose; agentes acidificantes e/ou alcalinizantes, como a solução de hidróxido de sódio a 20% (p/v), trietanolamina; tensoativos, tais como, álcool cetoestearílico, álcool

cetílico etoxilado e/ou propoxilado, poliól de éster de ácido graxo, como umectante, tais como, propilenoglicol, sorbitol 70% e/ou glicerina; e conservantes, tais como, os parabenos.

COMPOSIÇÃO GEL

Gel	**% p/p**
Agente de consistência polimérico	0,15-5,0
Umectante	2,0-8,0
Agente acidificante/alcalinizante	q.s.
Tensoativo	0,5-3,5
Extrato da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,2
Essência	q.s.
Água destilada q.s.p.	100,00

A composição de xampu pode conter em sua formulação os tensoativos aniônico, catiônico e/ou anfótero podendo ser primário ou secundário, tais como, lauril éter sulfato de sódio, lauril sulfato de trietanolamina, lauril sulfosuccinato dissódico e/ou lauril sulfato de sódio, dietanolamida de ácidos graxos de coco, cocoamido propil betaína, fosfato 3-oleílico; agente neutralizante como a solução ácida cítrico a 10% (p/v); agente de consistência como diestearato de glicol, solução de cloreto de sódio 20% (p/v); e conservantes, tais como os parabenos.

COMPOSIÇÃO XAMPU

XAMPÚ	**% p/p**
Tensoativos aniônicos primários	8,0-40,0
Tensoativos secundários	3,0-15,0
Umectante	0,5-6,0
Agente acidificante/alcalinizante	q.s.
Agente de consistência	0,1-5,0
Extrato da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,02
Essência	q.s.
Corante	q.s.
Água destilada q.s.p.	100,00

Em uma terceira realização a presente invenção refere-se ao uso desses extratos no preparao de formulações cosméticas e/ou farmacêuticas como antimicrobiano e/ou conservante. A atividade antimicrobiana das frações de *Lippia salviaefolia* Cham. é indicada para bactérias Gram-negativas; Gram-positivas, leveduras e fungos (bolor).

Ainda, o sistema conservante, resultante do uso das frações ativas dos extratos de *Lippia salviaefolia* Cham. apresenta um amplo espectro de ação, eficácia em extensa faixa de pH, maior compatibilidade com os demais componentes da formulação, mínima interferência nas características organolépticas (tais como, cor, odor, sabor, entre outros), ser seguro, atóxico, não irritante, nem sensibilizante, adequado coeficiente de partição óleo em água, de modo a permitir concentração efetiva em ambas as fases, rápida inativação

dos contaminantes prevenindo a adaptação microbiana, fácil manipulação, custo baixo, estabilidade de concentração.

EXEMPLOS

Para a fixação da planta *Lippia salviaefolia Cham*, utilizou-se F.A.A. [formaldeído 37% (v/v): ácido acético glacial: etanol 70% (v/v); (2:1:1)], armazenada em etanol 70% (v/v).

Para a descrição histológica, foram realizados cortes a mão livre, utilizando lâmina de barbear. O material foi clarificado em solução de hipoclorito de sódio 70% (v/v) e submetido à coloração diferencial com azul de alcian 1% (p/v) e fucsina básica 1% (p/v). Cortes transversais e paradérmicos de limbo foliar e transversais de limbo, pecíolo e caule, foram montados em preparações semi-permanentes, em glicerina 50% (v/v), com gotas de formalina e analisados em microscópio óptico binocular Coleman.

Na obtenção dos extratos, aquoso e hidroalcoólico, as folhas foram previamente dessecadas em estufa com temperatura controlada de 38°C e circulação de ar por quatro dias, seqüencialmente divididas e pulverizadas em moinho de facas com malha de 1 mm de diâmetro.

O processo de obtenção foi realizado por extração em Soxhlet para o extrato hidroalcoólico; e decocção para o extrato aquoso. Todos os solventes utilizados tanto na extração quanto nos procedimentos cromatográficos eram de grau cromatográfico. Pesou-se cerca de 50 g da planta pulverizada em balança eletrônica, seqüencialmente foram extraídas com etanol PA, até a exaustão, por três dias, à temperatura aproximada de 70°C. O extrato seco foi concentrado em rota evaporador e posteriormente liofilizado. Com o resíduo da extração anterior foi realizada uma extração por decocção, a

partir de cerca de 30 g da planta. Os extratos obtidos foram armazenados, devidamente acondicionados sob refrigeração.

A partir dos extratos etanólico e aquoso foram feitos testes iniciais de eficácia como conservantes naturais.

O extrato etanólico foi submetido à partição para verificação da fração com maior atividade antimicrobiana. Pesou-se 10,45 g do extrato etanólico liofilizado que foi dissolvido em cerca de 100 mL de hexano, acondicionado em banho de ultra-som, por 2 minutos e filtrado em Funil de Büchner sob pressão reduzida. A técnica foi repetida três vezes, obtendo desta forma a fração hexânica. Em seqüência, o resíduo desta primeira extração, após filtração, foi tratado com clorofórmio empregando-se a mesma técnica da primeira fração. Após obtenção da fração clorofórmica, repetiu-se todo o procedimento utilizando como solvente o acetato de etila para obtenção da fração de acetato de etila. E por fim, o resíduo da fração de acetato de etila foi extraído com n-butanol empregando a mesma técnica, obtendo a fração butanólica. Para secagem dos extratos utilizou-se evaporador rotatório a vácuo. Desta forma, obtiveram-se quatro frações diferentes a partir do extrato etanólico de *L. salviaefolia*. Todas as frações foram concentradas em rota-evaporador e posteriormente liofilizadas.

Para o fracionamento da fração de acetato de etila obtida a partir do extrato total de *L. salviaefolia*, foram utilizados os seguintes métodos cromatográficos: Coluna Cromatográfica e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Foi realizada inicialmente uma separação prévia através de uma coluna cujas características da coluna utilizada na separação preliminar dos componentes da fração de acetato de etila (Tabela 1).

TABELA 1

Fase Estacionária (FE)	Sílica PF
Peso de FE (g)	50,0
Peso da amostra (g)	1,0
Diâmetro (cm)	3,5

Pesou-se 1,0 g da fração de acetato de etila, proveniente do extrato total das folhas de *Lippia salviaefolia*, sendo solubilizada em metanol e incorporada a uma pequena porção de sílica (aproximadamente 0,5 g), posteriormente depositada na parte superior da coluna para realizar separação. Como fase móvel, utilizou-se a mistura diclorometano: metanol em diferentes proporções conforme descrito na tabela 2 que mostra a fase móvel utilizada na coluna para a separação dos componentes da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* e frações obtidas. Todas as extrações foram realizadas em duplicata, cada fração obtida foi concentrada e liofilizada. Depois de liofilizada cada fração foi submetida à avaliação de sua atividade antimicrobiana para identificação da fração com melhor resultado.

TABELA 2

Proporção (CH_2Cl_2 : MeOH)	Volume utilizado (mL)	Fração obtida
10:0	2x100	1 e 2
9:1	2x100	3 e 4
8:2	2x100	5 e 6
7:3	2x100	7
1:1	2x100	8
0:10	2x100	9

As frações obtidas na separação preliminar foram novamente fracionadas através de cromatografia em camada delgada.

Para tanto foram empregadas placas contendo uma camada de 1 mm de sílica gel PF254. Os sistemas eluentes utilizados eram compostos por diclorometano e metanol na proporção volumétrica de 9:1. Antes de efetuar a corrida cromatográfica a cuba foi previamente saturada com o próprio sistema eluente.

Para a realização da análise estrutural utilizou-se o cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama. Os espectros obtidos foram comparados com bancos de espectros do próprio aparelho assim como com dados espectrais da literatura.

No estudo da atividade antimicrobiana, os extratos hidroalcoólico e aquoso, assim como as diferentes frações do extrato etanólico, foram diluídas em dimetilsufoxido (DMSO): metanol (1:1). As concentrações correspondentes são expressas em termos de miligramas (mg) do extrato ou fração por mililitros (mL) do solvente.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada contra quatro tipos de microrganismos: bactérias Gram-positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); e fungo: *Candida albicans* (ATCC 10231).

Quanto ao método de difusão em ágar, os organismos testados foram inoculados em um "slant" de "Trypic Soy Agar" (TSA) para as bactérias, e "Sabouraud Dextrose Agar" (SDA) para o fungo. Depois de um período de incubação de 24 h a 32°C para bactéria e 25°C para o fungo, as culturas foram suspensas em solução salina estéril e ajustadas de modo a obter uma leitura turbidimétrica comparável com o padrão de McFarland nº 05. A partir dessas suspensões microbianas, 1,0 mL foi dissolvido em 4,0 mL de TSA para bactéria e SDA para o fungo, seqüencialmente, estes 5 mL resultantes constituíam a segunda camada da placa de Petri, com uma primeira camada de 10 mL de ágar

sem microrganismo. De modo asséptico, próximo ao fogo, com ferramentas apropriadas foram feitos alguns poços com aproximadamente 6 mm de diâmetro, onde as frações e os extratos foram depositados para estudo de suas ações. Em cada placa de Petri foram feitos 5 poços: um utilizado como controle negativo, outro para controle positivo, e os três restantes para as amostras em triplicada.

Três concentrações foram preparadas para o extrato aquoso, e o extrato etanólico total: 20, 10 e 5 mg/mL. Enquanto duas concentrações foram preparadas para as frações do extrato etanólico. 40,0 µL de cada solução (extrato aquoso, extrato etanólico e frações) eram colocadas nos poços. Em cada placa de Petri existia um poço contendo uma solução de 40 µL DMSO: Metanol (50:50) v/v usado como controle negativo, e como controle positivo um poço com 20 µL de uma solução padrão de (1mg/mL) de cloranfenicol, (potência: 100.000 UI/mL), para bactérias; nistatina, (potência: 100.000 UI/mL) para fungo; e amicacina, (potência: 916 µg/mg), para *Pseudomonas aeruginosa*. As placas eram incubadas por 24 h a 32°C (bactérias) e por 48 h a 25°C (fungo). Os diâmetros das zonas de inibição resultantes foram medidos por "Antibiotic Zone Reader – Fisher- Lilly" (mm). Cada experimento foi repetido ao menos três vezes. A zona de inibição mensurada corresponde à média dos diâmetros das zonas de inibição encontradas.

Os microrganismos testados foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Aspergillus niger* ATCC16404. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos que apresentaram melhores resultados no teste por difusão em ágar foi realizada através da CMI e visou a seleção dos extratos que foram incorporados nas formulações cosméticas. O ensaio utilizado foi pelo

método de microdiluição em meio líquido com técnicas assépticas. Para maior confiabilidade dos resultados, a determinação da CMI dos extratos selecionados foi avaliada, após incubação com temperatura controlada, por espectrofotometria em microplacas. Esse teste é uma adaptação do procedimento de diluição em meio líquidos que utiliza maior volume (10 mL), com os volumes de inóculo, reduzindo amostra e meio de cultura para 230 µL, possibilitando maior número de réplicas. Em uma etapa inicial, foi padronizado e validado o método, o equipamento utilizado foi o leitor de microplacas LM-LGC fornecendo precisão de leitura espectrofotométrica.

Em cada poço foram colocados 200 µL descritos a seguir; C: controle negativo (meio); Cs: controle do solvente (meio, microrganismo e solvente); Cc: controle de crescimento (meio e microrganismo); C+: Controle positivo (meio, microrganismo e antimicrobiano de referência); Cext: controle do extrato (meio e extrato); e amostras estudadas nas concentrações apropriadas. Para todas essas variáveis são utilizados no mínino quatro poços de cada microplaca.

Através do estudo em cromatografia gasosa-espectrofotômetro de Massa (CG-EM) foi constatado que os três principais compostos majoritários cujo padrão de fragmentação, da fração 4 descrita na tabela 2, fora compatível são 4',5-Dihidroxi-7-metoxi-flavonona, a naringenina, e o apiflorol. Tais valores serviram de base para comparação com o extrato total e as frações ativas da *L. salviaefolia.*

As bases cosméticas utilizadas na presente invenção envolvem preferencilamente, emulsão (creme), gel e xampu. Foram preparadas 6 formulações testes (2 emulsões, 2 géis e 2 xampus) selecionadas a partir do aspecto sensorial através de critério pessoal (espalhamento adequado na pele, toque sedoso e aspecto). Estas

formulações foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade física (centrifugação e estresse térmico), e ao teste de estabilidade acelerada. Ao final destes testes foi eleita uma formulação de emulsão, uma de gel e uma de xampu, com as quais se prosseguiu o teste de eficácia de conservante. As composições de cada formulação preliminar estão descritas nas tabelas a seguir:

TABELA 3

EMULSÕES (CREME)	% p/p
CREME A	
Cera auto-emulsionante não iônica	10,0
Óleo mineral	2,0
Acetato de cetila e álcool de lanolina acetilado	1,0
Silicone volátil	3,0
Sesquiestearato de metilglicose PEG-20	2,0
Propilenoglicol	5,0
Extrato da fração de Acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,2
Essência	q.s.
Água destilada q.s.p.	100,00

O procedimento para o preparo do Creme A envolveu o aquecimento das fases, aquosa e oleosa, separadamente, até a temperatura de 70-75°C. Ao atingirem este valor, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, de forma lenta e constante e com auxílio da agitação mecânica (*Mixer*). Após a obtenção da emulsão, homogeneizou-se até seu resfriamento a 40°C e acrescentaram-se o ciclometicone, a essência e o extrato, previamente diluído em q.s. etanol P.A. O valor de pH da formulação foi corrigido para 6,0-6,5.

TABELA 4

EMULSÕES (CREME)	% p/p
CREME B	
Álcool cetoestearílico etoxilado	2,0
Monoestearato de glicerila	1,0
Acetato de cetila e álcool de lanolina acetilado	1,0
2-octil-dodecanol	4,0
Silicone volátil	0,3
Sesquiestearato de metilglicose PEG-20	2,0
Glicerina	5,0
Hidroxietilcelulose 2% - p/v	20,0
Extrato da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,2
Essência	q.s.
Água destilada q.s.p.	100,00

Misturou-se, com auxílio da espátula de plástico, o Hostacerin® SAF e q.s. de água destilada flexível. Adicionaram-se a essência e o extrato homogeneizando-se o sistema. O valor de pH da formulação foi corrigido para 6,0-6,5.

TABELA 5

GEL	% p/p
Gel A	
Hidroxietilcelulose	2,0
Propilenoglicol	6,0
Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	2,0
Extrato da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,2
Essência (Cosmetic 258)	q.s.
Água destilada q.s.p.	100,00

Hidratou-se a hidroxietilcelulose com q.s. de água destilada na temperatura de 50°C e agitou-se com espátula de plástico flexível até a formação do gel. Adicionaram-se o propilenoglicol, a essência (previamente dispersa no Procetyl® AWS) e o extrato, completando-se a massa do gel com q.s.p. de água destilada e homogeneizou-se. O valor de pH da formulação permaneceu entre 6,0-6,5.

TABELA 6

GEL	**% p/p**
Gel B	
Polímero carboxivinílico	0,8
Propilenoglicol	5,0
Hidróxido de sódio (solução 20%) pH 6,0	q.s.
Poliol de éster de ácido graxo	0,8
Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	2,0
Extrato da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,2
Essência (Cosmetic 35)	0,2
Água destilada q.s.p.	100,00

O polímero carboxivinílico foi disperso em q.s. de água destilada e permaneceu em repouso por 3 h, a fim de completar a hidratação. Após esse período, foi adicionado o propilenoglicol homogeneizando-se com auxílio de espátula de plástico flexível. A essência e o Cetiol® HE foram previamente dispersos em Procetyl® AWS e adicionados à mistura, e posteriormente o extrato homogeneizando-se o sistema. A formulação foi pesada, completou-se a massa com água destilada e corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5, com auxílio do hidróxido de sódio e homogeneização manual.

TABELA 7

XAMPU	**% p/p**
Xampu A	
Lauril éter sulfato de sódio	20,0
Lauril sulfato de trietanolamina	5,0
Dietanolamida de ácidos graxos de coco	3,0
Propilenoglicol	5,0
Ácido cítrico (solução 10% p/v) pH 6,0	q.s.
Cloreto de sódio (solução 20% p/v)	0,8
Extrato da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,02
Essência	0,3
Corante	58,0
Água destilada q.s.p.	100,00

Pesaram-se os componentes lauril éter sulfato de sódio, lauril sulfato de trietanolamina e dietanolamida de ácidos graxos e homogeneizou-se com auxílio de espátula de plástico flexível. Adicionaram-se 50 g de água destilada com agitação suave. Acrescentaram-se o corante, a essência e o extrato, completou-se a massa com água destilada e misturou-se suavemente. Corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5 com ácido cítrico, adicionou-se a solução de cloreto de sódio até obter o espessamento adequado (observada visualmente e característica de um xampu) e homogeneizou-se o sistema.

TABELA 8

XAMPÚ	% p/p
Xampú B	
Lauril sulfosuccinato dissódico e lauril sulfato de sódio	10,0
Lauril éter sulfato de sódio	5,0
Diestearatoglicol, tensoativo aniônico e anfótero	1,5
Cocoamido propil betaína	8,0
Fosfato 3-oleílico	0,5
Hidróxido de sódio pH 6,0	q.s.
Cloreto de sódio (solução 20% p/v)	q.s.
Extrato da fração de acetato de etila de *L. salviaefolia*	0,02
Perfume	q.s.
Água destilada q.s.p.	100,00

Pesou-se o lauril sulfossuccinato dissódico, o lauril sulfato de sódio (Genapol® SSB), o lauril sulfato de sódio (Genapol® LSS), o diestearato glicol (Genapol® EGL), a cocoamidopropil betaína (Dehyton® KB) e o fosfato 3- oleílico (Hostaphat® 0-300) e homogenizou-se suavemente com auxílio de espátula de plástico flexível. Foram incorporados à formulação, q.s. de água destilada, a essência e o extrato, completou-se o volume com água destilada e misturou-se suavemente com a mesma agitação. Corrigiu-se o valor do pH para 6,0-6,5 com hidróxido de sódio e adicionou-se a solução de cloreto de sódio,

até alcançar espessamento adequado (observada visualmente e característica de um xampu) e homogeneizou-se o sistema.

Todas as pré-formulações cosméticas foram submetidas a estudo de estabilidade acelerada. Assim, com o intuito de avaliar criteriosamente a atividade conservante dos extratos da *L. salviaefolia* nas pré-formulações cosméticas descritas acima, estas foram submetidas a condições drásticas "Stress test". Antes de iniciar o estudo de estabilidade o produto foi submetido ao teste de centrifugação e ao estresse térmico.

Na centrifugação, dez gramas das formulações (creme A e creme B) foram submetidas a ciclos de rotação de 1000, 2500 e 3500 rpm em centrífuga, durante quinze minutos para cada velocidade.

As amostras (Creme A e B e Xampu A e B) foram colocadas em banho-maria termostatizado, entre 40 e 80°C. Realizou-se a elevação da temperatura de 10 em 10°C, mantendo por 30 minutos em cada valor. Foram avaliadas as amostras ao término do teste (80°C), após as mesmas retornarem à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0°C).

Após 24 horas de preparo, considerado como ti (tempo inicial), as formulações escolhidas, creme A e B, gel A e B e xampu A e B, foram submetidas às seguintes condições e períodos de avaliação:

No armazenamento, as formulações foram mantidas à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0°C), durante 14 dias, sendo avaliadas no 3°, 7° e 14° dias.

O produto foi exposto à luz solar de forma indireta e não diretamente ao sol. Pois a luz solar direta pode alterar significativamente a cor e o odor do produto e levar à degradação de componentes da formulação.

As preparações foram submetidas à temperatura de 45,0 ± 2,0°C em estufa, durante 14 dias, sendo avaliadas no 1°, 3°, 7° e 14°

dias. Ainda, as formulações foram submetidas a ciclos de congelamento (-10,0 ± 2,0°C) por 24 horas em *freezer*, seguido de descongelamento e aquecimento em estufa (50,0 ± 2,0°C) por 24 horas, completando-se dessa forma um ciclo. As amostras foram submetidas a seis ciclos, sendo avaliadas no 3° (6° dia) e 6° ciclos (12° dia).

Também, as formulações foram mantidas à temperatura de -10,0 ± 2,0°C em *freezer*, durante 14 dias e avaliadas no 7° e 14° dias. A avaliação ainda se deu em refrigerador onde as formulações foram mantidas em (6,0 ± 2,0 °C), durante 14 dias e avaliados no 3°, 7° e 14° dias.

Após 24 horas do preparo (ti), cada formulação foi avaliada quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e de viscosidade aparente. Os resultados obtidos em ti foram considerados como referência para comparação com as demais leituras das amostras, em todas as condições, durante o Teste de Estabilidade Acelerada.

Os microrganismos desafiantes utilizados na validação e no teste de eficácia de conservantes foram: *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6548), *Burkholderia cepacia* IAL 1834 ATCC (17759), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

A escolha da condição de inativação do sistema conservante tem como objetivo validar o método usado no teste de eficácia do sistema conservante. A confiabilidade do método usado no teste de eficácia de conservante depende da sua capacidade em evitar a interferência do sistema conservante no crescimento dos microrganismos.

Para a escolha de condição de neutralização ou inativação do sistema conservante, o estudo foi conduzido com as formulações de

creme A, Gel B e Xampu B. Esses produtos foram preparados em condições assépticas e considerados como a amostra-teste. Como controle da viabilidade dos microrganismos utilizou-se solução salina 0,9% (p/v).

As amostras do Creme A, Gel B e Xampu B foram avaliadas quanto à eficácia do sistema conservante. O teste de desafio foi executado para cada um dos microorganismos acima mencionados.

Aproximadamente 20g de cada amostra teste foi inoculada com um dos microrganismos desafiantes em cerca de 10^5 a 10^6 UFC/g, proveniente da suspensão previamente padronizada conforme descrito anteriormente e respeitando-se a relação entre o volume do inóculo e da suspensão, para ser menor ou igual a 1% (p/v) do volume da amostra. Imediatamente após a inoculação, foi homogeneizado por um minuto em agitador e submetido à diluição seriada e à contagem das colônias de microrganismos viáveis (UFC/g), pela técnica de semeadura em profundidade. Para o procedimento de diluições decimais empregou-se o diluente Dey Engley (D/E). Como meio de cultura foi utilizado ágar caseína soja e ágar sabouraud-dextrose 4%.

As amostras desafiadas e os controles foram mantidos em temperatura ambiente no decorrer do teste. A periodicidade de cada avaliação do sistema conservante das amostras foi mantida. Ressalta-se que, para todos os métodos utilizados na avaliação da eficácia de sistema conservante, foram realizados ensaios logo após a inoculação do microrganismo, considerado tempo zero (t_0).

Para a verificação da viabilidade dos microrganismos durante os testes, realizou-se o mesmo procedimento utilizado para amostra, embora empregando solução salina 0,9 % (p/v), considerado no ensaio como controle da viabilidade do microrganismo.

Os tempos para a avaliação, no presente pedido, foram logo após a inoculação e após 2, 7, 14, 21 e 28 dias. Foram nomeados, respectivamente, de t_0, t_2, t_7; t_{14}; t_{21} e t_{28}.

Para a avaliação da segurança das formulações cosméticas sem e com incorporação de *L. salviaefolia* em estudos histológicos, os substitutos cutâneos dermo-epidérmico foram inicialmente fora preparadas as bases dérmicas. Seqüencialmente foram preparadas culturas secundárias de queratinócitos sobre as bases dérmicas em cultivo na interface ar-líquido. A derme foi preparada com 2 x 2 cm^2 e mantida em PBS (Phosphate Buffered Saline – Solução Salina Fosfato Tamponada), foi colocado um anel sobre a derme para semear os queratinócitos em alta densidade, deixando "overnight" para retirar o anel. No sétimo dia o conjunto foi passado para o sistema de rede em placas de seis poços. As culturas foram mantidas em estufa de cultivo com atmosfera de CO_2 a 5%, à temperatura constante de 37°C, sendo que em cada poço continham 3 mL de KGM (Keratinocyte Growth Medium), o meio de cultivo foi trocado a cada dois dias até o 14° dia e diariamente até o 21° dia. Para início do teste de avaliação de segurança todo meio foi aspirado e, com o auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL, colocou-se 1 gota (cerca de 20-30 µL) de cada amostra (gel, creme e xampu sem e com a incorporação de *L. salviaefolia*) sobre os compostos cultivados na interfase ar-líquido, em uniplicata, mantendo um poço como controle sem a adição de amostra.

Depois de adicionado às amostras nos compostos cultivados na interfase ar-líquido, os sistemas foram mantidos por 24 horas ou 48 horas no meio de cultivo. O sistema dermo-epidérmico foi lavado 3 vezes com PBS e transferido, com o auxílio de uma pinça e agulha, para um papel de filtro. Seqüencialmente o sistema foi tratado e fixado, para microscopia óptica, por 24-72 horas, em geladeira, com

paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão cacodilato de sódio pH 7,2. Foi lavado novamente três vezes com PBS e deixado em álcool 70% na geladeira. A análise da morfologia da pele humana, sistema dermo-epirdérmico, foi feita em microscópio óptico, com aumento de 1000 vezes (microscópio Labophot – Nikon).

Preparou-se solução estoque na concentração de 2 mg/mL, solubilizando-se o extrato seco de acetato de etila de *L. salviaefolia* em polietilenoglicol 400 (PEG 400). Os queratinócitos HK186 em baixa densidade (com camada de sustentação) formada por Fibroblastos CCl-92 previamente irradiados com 60 Gy, na passagem P0 foram amplificados para uma garrafa de 75 cm^2 em meio KGM. À partir de cultura primária, após atingir a quantidade de células necessárias, foram tripsinizados e semeados a 50.000 células/poço de HK186 em duas placas "multiwell" de 96 poços. Após 24 horas foram adicionados 100 µL das diluições seriadas necessárias da solução mãe de *L. salviaefolia* em PEG para atingir as concentrações de 2%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,125% (p/v) da fração de acetato de etila do extrato de *L. salviaefolia* em meio KGM, recém preparado e previamente esterilizado por filtração, em triplicatas.

As amostras foram mantidas em contato com essa solução de *L. salviaefolia* por 2, 6, 24 e 48 horas. Foi feito também um controle sem tratamento, onde foi adicionado o meio de cultura KGM em 11 replicas e mantidas em incubação até o fim de teste (48 horas). E a avaliação da interferência do solvente: após o período de incubação o meio de cultura foi trocado por meio KGM, contendo quantidades crescentes do solvente 0%, 5%, 1%, 2%, a serem testados e então a placa foi novamente incubada nos intervalos de tempo de 2, 6, 24 e 48 horas, para o intervalo de tempo 2 horas foram utilizadas apenas as concentrações de 2% e 1%, ou seja, reproduzindo as condições mais

drásticas do teste de viabilidade celular para *L. salviaefolia*. Após estes períodos pré-estabelecidos de contato, trocou-se o meio de cultura por KGM e as amostras foram mantidas até o final do teste, 2 dias, sendo então submetidas a coloração por rodamina (avaliação qualitativa) e MTS (avaliação quantitativa) para verificação da viabilidade celular.

Após 48 horas, as soluções, contidas nos poços, foram aspiradas e adicionaram-se alíquotas de 120 μL da solução MTS/PMS em KGM em todos os poços da placa, que foi imediatamente acondicionada em estufa de atmosfera controlada a 37°C, com 5% de CO_2 e 95% de umidade relativa, por 2 horas. Decorrido este período inicial, foi realizada a primeira medida de absorbância, a 490 nm, em espectrofotômetro de placa de ELISA acoplado a impressora. Incubou-se novamente a placa e tomaram-se mais três leituras, com intervalo de 1 hora.

Com o intuito de se quantificar a proliferação das células, aplicou-se o método colorimétrico intitulado Cell Titer 96®.

Para preparação das soluções de MTS/PMS em KGM: soluções de MTS e PMS foram descongeladas em banho termostatizado, a 37°C, por 10 minutos. Na preparação foi utilizado transferiu-se 15,873% de MTS, para um tubo de fundo cônico contendo 83,333% de meio de cultura celular (KGM). Em seguida adicionou-se 0,794% de PMS agitando a solução vigorosamente.

Os extratos hidroalcoólico e aquoso foram obtidos após constatação da ineficiência do extrato aquoso como agente antimicrobiano, e ação do extrato hidroalcoólico foi feita a partição extrato hidroalcoólico para obtenção das frações e estudo de suas atividades antimicrobianas, com o intuito de identificar a fração com melhor atividade antimicrobiana. Nas tabelas 9 e 10 são descritos o peso seco e rendimento de cada extrato e frações.

A tabela 9 refere-se ao rendimento dos extratos aquoso e hidroalcoólico obtidos da *L. salviaefolia*

TABELA 9

Rendimento dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *L. salviaefolia*

Extrato	Massa (g)	Rendimento % (p/p)
Aquoso	2,10	7
hidroalcoólico	15,40	30,8

A tabela 10 mostra o rendimento das frações obtidas a partir da partição do extrato hidroalcoólico de *L. salviaefolia.*

TABELA 10

Rendimento das frações do extrato hidroalcoólico de *L. salviaefolia*

Fração	Massa (g)	Rendimento % (p/p)
Hexânica	0,45	4,31
Clorofórmica	2,21	21,19
Acetato de Etila	4,32	41,34
Butanólica	0,24	2,30

A fração que apresenta maior rendimento é a fração de acetato de etila, com um rendimento de 41,34% (tabela 10).

Após a partição e estudo da atividade antimicrobiana por meio de difusão das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica. Constatou-se que frações ativas mais eficazes são: a fração de acetato de etila e a fração clorofórmica. Feita uma análise em CCD, verificou-se que as frações clorofórmica e de acetato de etila tem composição parecida. Devido ao fato de terem composição parecida e ao CMI das duas frações serem parecidos, a fração de acetato de etila, por ter maior massa, melhor rendimento e apresentar melhor facilidade de manuseio, devido a menor concentração de compostos graxos.

A partir da extração em coluna cromatográfica da fração de acetato de etila obtemos as frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Cada uma dessas frações foi submetida ao estudo de atividade antimicrobiana à 1,0 mg/mL frente a *S. aureus*, microrganismo mais sensível aos testes de atividade antimicrobiana. Possibilitando a identificação das frações com atividade antimicrobiana considerável e conseqüente de maior interesse para o estudo em questão. Sendo as frações 3 e 4 que apresentaram melhor atividade antimicrobiana.

A análise em CCD foi realizada como um "screening", possibilitando identificação das frações que apresentam os compostos majoritários. Verificou-se que os compostos majoritários estão nas frações 3 e 4. Assim como as melhores atividades antimicrobianas. A análise constitucional foi realizada pelo CG-EM.

A análise estrutural foi realizada apenas para as frações mais purificadas e com maior atividade antimicrobiana, pois nestas

frações estão presentes componentes de interesse, com maior atividade microbiana. Devido à semelhança de composição entre as frações 3 e 4, observada em CCD, somente a fração 4 foi submetida à análise estrutural por CG-EM. A análise por CG-EM da fração 4 obtida com os procedimentos de separação revelou a presença de flavononas. Os três principais compostos majoritários cujo padrão de fragmentação é compatível são 4',5-Dihidroxi-7-metoxi-flavonona (tempo de retenção = 17,032), a naringenina (tempo de retenção= 17,537 min.), e o apiflorol (tempo de retenção = 17,988).

Utilizou-se um "screening" inicial para verificação das frações e extratos com atividade antimicrobiana. Os resultados da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar dos extratos aquosos etanólicos e das frações do extrato etanólico estão presentes na tabela 11. Observou-se que o extrato etanólico mostrou boa atividade antimicrobiana contra *S. aureus, E. coli, e C. albicans*. Os diâmetros das áreas de inibição mensurados, referentes aos extratos estudados ficaram entre 13,3 - 1,3 mm dependendo do microrganismo estudado.

A tabela 11 mostra a atividade antimicrobiana mensurada pelo diâmetro de inibição do crescimento, dos extratos de *L. salviaefolia* e frações pelo método de difusão em ágar. Sendo i: inativo; ---: teste não realizado; EE: extrato etanólico de *L. salviaefolia*, EAq: extrato aquoso de *L. salviaefolia*, Fr.H.: fração hexânica; Fr.$CHCl_3$: fração de clorofórmio; Fr.Ac.Et.: fração de acetato de etila; Fr.ButOH.: fração butanólica.

TABELA 11

Método e difusão em ágar, diâmetro do halo de inibição (mm) dos extratos e frações de *L. salviaefolia*

Amostras	*S. aureus*	*E. coli*	*C. albicans*	*P. aeruginosa*
EE (20 mg/mL)	10,9 ± 0,68	11,3 ± 0,77	5,5 ± 0,66	i
EE (10 mg/mL)	9,1 ± 0,34	8,4 ± 0,57	3,5 ± 1,05	I
EE (5 mg/mL)	7,3 ± 0,09	6,9 ± 0,08	1,3 ± 0,94	I
EAq (20 mg/mL)	i	i	i	I
Fr.H. (10 mg/mL)	i	i	i	I
Fr.$CHCl_3$. (10 mg/mL)	10,8 ± 0,33	13,3 ± 0,68	3,4 ± 0,43	I
Fr.$CHCl_3$. (5 mg/mL)	9,1 ±0,34	12,7 ±0,68	2,9 ± 0,09	I
Fr.Ac.Et. (10 mg/mL)	10,7 ± 0, 47	10,7 ± 0,52	2,4 ± 0,05	I
Fr.Ac.Et. (5 mg/mL)	8,3 ± 0,38	8,3 ± 0,38	1,7 ± 0,25	I
Fr.ButOH. (10 mg/mL)	i	i	i	I
Cloranfenicol	18,25 ± 1,55	15,87 ± 0,89	---	---
Nistatina	---	---	21,11 ± 1,71	---
Amicacina	---	---	---	17,7 ± 1,8

As frações hexânica e butanólica apresentaram pouca atividade frente aos microrganismos testados. Entretanto, o uso das

frações clorofórmicas e de acetato de etila foram efetivas, o que corrobora uma boa atividade antimicrobiana frente *S. aureus, E. coli* e *C. albicans*, entre outras.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 11, pode-se notar que os valores referentes às zonas de inibição para a fração de acetato de etila estão bem próximos daqueles apresentados pela fração clorofórmica, sendo que os valores das zonas de inibição para fração de acetato de etila são levemente menores do que os valores correspondentes à fração clorofórmica.

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso, do extrato etanólico total e das frações de *L. salviaefolia* foi testada pelo método de difusão em ágar contra quatro microrganismos: um Gram-positivo (*S. aureus*), dois Gram-negativos (*E. coli e P. aeruginosa*) e um fungo (*C. albicans*). Os resultados demonstraram considerável atividade antimicrobiana para o extrato etanólico total e para as frações clorofórmica e de acetato de etila.

Os extratos de *L. salviaefolia* mostrados aqui no presente pedido relatam ser um ativo funcional em dosagens menores àquelas apresentadas no estado da técnica referente ao método de difusão. Logo o método de difusão em ágar foi utilizado apenas como um "screening" para encontrarmos as frações ativas. O CMI do extrato total como das suas frações de *L. salviaefolia* foi determinado pelo método de microdiluição.

Os resultados referentes à determinação da CMI confirmam os resultados apresentados pelo teste de difusão em ágar. As frações hexânica e butanólica são inativas. Porém como se pode observar na tabela 8, o extrato total, fração clorofórmica, fração de acetato de etila, e as frações 3 e 4 provenientes da fração de acetato de etila foram ativas frente *S. aureus, E. coli, C. albicans* e *A. niger*. Por outro lado, somente as frações clorofórmica e a de acetato de etila foram ativas frente a *P. aeruginosa*.

Na tabela 12 as concentrações mínina inibitórias (CMI) para naringenina são apresentadas, para o extrato total de *L. salviaefolia*; para as frações ativas do extrato total: fração de acetato de etila e fração clorofórmica; e ainda para as frações 3 e 4 derivadas da fração de acetato de etila. Como pode ser observado, as frações 3 e 4 derivadas da fração de acetato de etila, não apresentaram CMI superior aos da sua fração original, tornado injustificável a purificação das frações de acetato de etila e de clorofórmio, esse fator pode ser explicado pelo efeito sinérgico favorável entre as substâncias presentes nos extratos.

A tabela 12 revela a CMI da naringenina, do extrato total e frações da *L. salviaefolia* pelo método de microdiluição, frente a bactérias e fungos, sendo EE: extrato etanólico; $CHCl_3$.Fr: Fração clorofórmica do extrato etanólico; Ac.Et.Fr.: Fração de acetato de etila do extrato etanólico; Fr. 3: Fração 3 da fração de acetato de etila; Fr. 4: Fração 4 da fração de acetato de etila.

TABELA 12

Concentração Mínima Inibitória de *L. salviaefolia* (CMI mg/mL)

Método de microdiluição

Cepas	Naringenina	EE	$CHCl_3$. Fr	Ac.Et.Fr.	Fr. 3	Fr. 4
S. aureus	0,125 – 0,25	0,125 - 0,25	0,05 - 0,075	0,035 - 0,05	0,05 - 0,125	0,75 - 0,125
E. coli	1,0 – 1,5	1,0 - 1,5	0,75 - 1,0	0,5 - 0,75	0,75 - 0,125	0,75 - 0,125
P. aeruginosa	> 2,0	> 2,0	1,5 - 2,0	1,5 - 2,0	> 2,0	> 2,0
C. albicans*	1,5 – 2,0	1,5 - 2,0	0,2 - 0,25	0,25 - 0,375	0,375 - 0,75	0,4 - 0,75
A .niger*	> 2,0	1,5 - 2,0	1,0 - 1,25	1,25 - 1,5	1,5 - 2,0	1,5 - 2,0

De acordo com a tabela 12, observou-se que, ao realizar o teste de atividade antimicrobiana da *L. salviaefolia,* a fração clorofórmica e a fração de acetato de etila possuem a maior atividade antimicrobiana, em que apresentaram um CMI de 0,2% para as bactérias e fungos testados.

As frações 3 e 4 provenientes da fração de acetato de etila apresentaram CMI próximos, quando comparando entre si (tabela 12). Esse fato pode ser explicado devido à semelhança constitucional entre as frações. Porém a CMI apresentada tanto pela fração 3 como pela fração 4, não foram mais eficazes que as frações de acetato de etila ou a fração de clorofórmio (tabela 12). Este fato pode ser explicado devido ao efeito sinérgico apresentado pelos constituintes de cada fração. Desta forma, para a *L. salviaefolia,* à medida que se purifica a fração diminui a atividade antimicrobiana.

Foram isolados três compostos majoritários em CG-EM. Os três principais compostos majoritários cujo padrão de fragmentação é compatível são 4',5-Dihidroxi-7-metoxi-flavonona, a naringenina, e o apiflorol. Dentre esses compostos a naringenina é encontrada para comercialização. Deste modo estudou-se a atividade antimicrobiana para naringenina. Verificou-se que a naringenina assim como o extrato etanólico total da *L. salviaefolia* (Tabela 12), tem os maiores valores de CMI encontrados no estudo da atividade antimicrobiana. Para o *S. aureus* o CMI da naringenina e do extrato total foram entre 0,125-0,25 mg/mL; para *E. coli*, CMI entre 1,0 – 1,5mg/mL; para *P. aeruginosa* > 2,0 mg/mL; para *C. albicans* entre 1,5 – 2,0 mg/mL; e para *A. niger* entre 1,5 – 2,0 mg/mL. Esse fato evidencia que para alcançar os melhores níveis da atividade antimicrobiana da *L. salviaefolia*, deve-se fazer o processo de extração inicial e a partição do extrato total até que se consiga obter a fração clorofórmica e a fração de acetato de etila. A partir deste ponto se prosseguir a purificação e isolamento dos compostos a atividade antimicrobiana tente a diminuir.

A alta eficiência da fração de acetato de etila e da fração clorofórmica pode ser explicada pelo efeito sinérgico entre todos os componentes destas frações de *L. salviaefolia*. Este fato pode ser explicado devido à semelhança constitucional das duas frações observada no teste de CCD.

A razão para a diferença entre a sensibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas se faz devido à diferença na constituição das paredes celulares de cada uma. Bactérias Gram-negativas tem uma membrana fosfolipídica carreada de componentes lipopolisacarídeos. Isto faz com que a parede celular seja impermeável a algumas substâncias químicas antimicrobianas. Por outro lado, bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis, uma vez que tem uma

membrana celular constituída apenas por uma camada de peptidioglicano, não sendo uma barreira de permeabilidade efetiva. Entretanto, em relação a estas diferenças de permeabilidade, a *L. salviaefolia* se mostrou eficaz tanto para Gram-positivas como para Gram-negativas, especialmente as frações: acetato de etila e clorofórmica (Tabela 12).

O *A. niger* normalmente é insensível à maioria dos extratos de plantas testados em relação à atividade antimicrobiana, e a *C. albicans* mostrou-se um fungo de difícil inibição. Entretanto como pode ser observado na tabela 12, tanto a fração clorofórmica como a fração de acetato de etila da *L. salviaefolia* foi ativa com valores de CMI considerável. Ainda, todos os extratos testados de *L. salviaefolia* possuíram atividade contra bactérias e fungos, especialmente a fração clorofórmica e a fração de acetato de etila. Indicando boa atividade antimicrobiana.

Após centrifugação das emulsões: creme A (CA) e creme B (CB), não foi observada coalescência ou separação de fases, demonstrando estabilidade física adequada.

As formulações dos cremes A e B mantiveram-se estáveis, suportando as alterações de temperatura a que foram submetidas no teste de estresse térmico, não apresentando separação de fases.

Os resultados quanto às características organolépticas, valores de pH e viscosidade aparente das formulações avaliadas inicialmente e após exposição às condições do teste (geladeira de 4-8°C, estufa a 45°C; ciclos gela e degela; freezer a -10°C; temperatura ambiente a 22°C e luz solar) para os cremes A e B, para os géis A e B e para os xampus A e B.

A presença de microrganismos, em determinados níveis e tipos, em produtos não estéreis, pode ser condição relacionada à

deterioração do produto, bem como o não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação pode, também, conduzir a produção com qualidade sanitária inadequada. Esse processo pode até ser observado nos casos em que o substrato oferece condições mínimas necessárias para o desenvolvimento microbiano. Os contaminantes que sobrevivem multiplicam-se em meio pobre de fatores nutricionais ou mesmo adaptam-se em condições bastante desfavoráveis. A proliferação de microrganismos pode provocar alterações de diversas naturezas, como perda do teor da substância ativa e alterações físico-químicas e/ou organolépticas do produto.

Para cosméticos é permitido nível limite de microrganismos viáveis, o ensaio consiste na contaminação proposital da amostra com microrganismos padrão e determina-se a carga dos sobreviventes em períodos pré-estabelecidos durante 28 dias, utilizando-se técnica de contagem microbiana validada.

Ao se comparar às condições estudadas observa-se que somente na condição 2 foi possível recuperar todos os microrganismos (Tabela 13). Esses resultados indicaram que para a enumeração dos microrganismos haveria a necessidade de uma diluição 10^{-1} das formulações Creme A, Gel B e Xampu B, com diluente Dey Engley (D/E). Frente a esses resultados para o teste de eficácia de conservantes, procedeu-se à diluição das formulações antes enumeração ou contagem de microrganismos viáveis, nos períodos imediatamente após a inoculação, após 2, 7,14, 21 e 28 dias.

A Tabela 13 apresenta os resultados da recuperação dos microrganismos nas duas condições de neutralização, onde o controle = solução salina a 0,9% (p/v) estéril; amostra-teste = produto preparado com conservante, em condições assépticas e cada algarismo representa a média do ensaio realizado em cinco réplicas. Observa-se que o

controle apresentou a recuperação sempre maior que 70% para todos os microrganismos, demonstrando a viabilidade dos microrganismos durante a validação e garantindo que as recuperações menores que 70% eram devidas à condição não adequada para o crescimento dos microrganismos.

TABELA 13

Condição	Microrganismo	Controle	Creme A	Gel B	Xampu B
1	*P. aeruginosa*	>70%	>70%	>70%	<70%
	E. coli	>70%	>70%	>70%	>70%
	S. aureus	>70%	>70%	<70%	<70%
	C. albicans	>70%	<70%	<70%	<70%
	Burkholderia cepacia	>70%	>70%	>70%	<70%
	A. niger	>70%	<70%	<70%	<70%
2	*P. aeruginosa*	>70%	>70%	>70%	>70%
	E. coli	>70%	>70%	>70%	>70%
	S. aureus	>70%	>70%	>70%	>70%
	C. albicans	>70%	>70%	>70%	>70%
	Burkholderia cepacia	>70%	>70%	>70%	>70%
	A. niger	>70%	>70%	>70%	>70%

Para avaliação da eficiência do sistema conservante, o teste consiste na contaminação de *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia, Candida albicans* e *Aspergillus niger* em cada amostra e determina-se a carga dos sobreviventes em períodos pré-estabelecidos durante 28 dias, utilizando-se técnica de contagem microbiana convencional validada. Os resultados da avaliação da atividade conservante, extrato a 0,2%

(p/v), nas formulações de Creme A, Gel B e Xampu B são apresentados a seguir.

A tabela 14 apresenta a carga de sobreviventes de *Escherichia coli* ATCC 10536 (UFC/g ou mL) no teste de eficácia de conservantes, onde t_0 = contagem imediatamente após a inoculação; t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação e t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

TABELA 14

Intervalos de tempo/ Amostras	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$1,7 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$2,0 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$1,8 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$2,1 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$9,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$

A tabela 15 mostra a carga de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027(UFC/g ou mL) no teste de eficácia de conservantes, onde t_0 = contagem imediatamente após a inoculação; t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação e t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

TABELA 15

Intervalos de tempo/Amostras	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$3,0 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$2,1 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$6,2 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	< 10	< 10

A tabela 16 apresenta a carga de sobreviventes de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538(UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes, onde t_0 = contagem imediatamente após a inoculação; t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação e t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

TABELA 16

Intervalos de tempo/Amostras	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$4,7 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$6,6 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$4,1 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$2,5 \times 10^6$	$7,3 \times 10^4$	$5,1 \times 10^6$	< 10	< 10	< 10

A tabela 17 mostra a carga de sobreviventes de *Burkholderia cepacia* ATCC (UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de

Conservantes, onde t_0 = contagem imediatamente após a inoculação; t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação e t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

TABELA 17

Intervalos de tempo/Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$9,5 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$7,8 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Xampu	$9,8 \times 10^5$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$2,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10

A tabela 18 revela a carga de sobreviventes de *Candida albicans* ATCC 10231(UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes, onde t_0 = contagem imediatamente após a inoculação; t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação e t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

TABELA 18

Intervalos de tempo/Amostra	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	$8,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10	< 10
Gel	$7,6 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	< 10	< 10	< 10
Xampu	$6,2 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	$7,2 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$

A tabela 19 refere-se à carga de sobreviventes de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (UFC/g ou mL) no Teste de Eficácia de Conservantes, onde t_0 = contagem imediatamente após a inoculação; t_{48} = contagem em 48 horas após inoculação e t_7, t_{14}, t_{21} e t_{28} = contagem em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.

TABELA 19

Intervalos de tempo/Amostras	t_0	t_{48}	t_7	t_{14}	t_{21}	t_{28}
Creme	4,1 x 10^5	1,4 x 10^5	1,7 x 10^5	8,0 x 10^4	5,9 x 10^4	9,0 x 10^4
Gel	3,8 x 10^5	1,9 x 10^5	1,7 x 10^5	1,9 x 10^5	2,6 x 10^5	1,5 x 10^5
Xampu	4,0 x 10^5	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Solução salina	6,9 x 10^5	1,3 x 10^5	1,0 x 10^5	4,9 x 10^4	4,6 x 10^4	9,2 x 10^4

Os testes foram realizados, concomitantemente com solução salina a 0,9% (p/v) inoculada com a mesma carga microbiana da amostra teste, a suspensão foi considerada controle como intuito a verificação da viabilidade dos microrganismos desafiantes durante os 28 dias do teste. Nesta condição, verificou-se que para as bactérias *Escherichia coli* (tabela 14), *Pseudomonas aeruginosa* (tabela 15), *Staphylococcus aureus* (tabela 16) e *Burkholderia cepacia* (tabela 17) apresentaram-se viáveis durante todos os testes, assim como para os fungos *Candida albicans e Aspergillus niger* que se mantiveram, também, adequados no decorrer do tempo de avaliação.

De acordo com os resultados analíticos descritos nas tabelas 14, 15, 16, 17, 18 e 19 pode-se afirmar que: as amostras de creme, gel e xampu na concentração de 0,2% da fração de acetato de

etila do extrato etanólico de *L. salviaefolia* atendem a especificação adotada para as bactérias: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia,* e *Cândida albicans.*

Após o período de contato de 24 horas ou 48 horas, das amostras com o substituto cutâneo dérmico-epidérmico, corte e coloração por hematoxilina-eosina, foi observado o efeito das bases sem a incorporação da *L. salviaefolia* e das formulações cosméticas com a incorporação da *L. salviaefolia*, na epiderme de cada sistema dérmico-epidérmico. Avaliando, desta forma, a segurança de cada formulação.

Na figura 18 temos o controle chamado de branco 24h em que não foi adicionada nenhuma amostra, mas, permaneceu no sistema de cultivo na interfase ar-líquido durante as 24 horas de teste. Nesta ilustração o epitélio se mostrou organizado e reproduzindo a morfologia esperada para derme e epiderme, com diferença tintoriais devido ao amadurecimento celular, podendo ser observado ainda as lamelas de queratina, constituindo a camada córnea. Além da observação das camadas intermediária ou espinhosa e a granulosa.

Na figura 19 consta o estudo histológico da pele após o contato de 24 h com a formulação base gel, observados em microscopia óptica, revelam a morfologia da epiderme e da derme, apesar da separação dermo-epidérmica pode ser observada uma leve toxicidade devido a leve alteração na morfologia da epiderme.

Na figura 20 consta o estudo histológico da pele após o contato de 24 horas com a formulação cosmética gel, incorporada com *L. salviaefolia* como conservante natural. Neste caso pode-se observar uma maior toxicidade da formulação uma vez que houve uma alteração significativa na morfologia da epiderme, e morte de grande parte dos queratinócitos. Constatado devido à impossibilidade de identificação destas células como ainda pode-se visualizar na figura 18. Essa maior

toxicidade quando comparamos o gel sem a incorporação da *L. salviaefolia* se deve a toxidade inerente ao extrato, porém é importante resaltar que a própria formulação sem a adição da *L. salviaefolia* já tinha demonstrado certa toxicidade.

A formulação creme foi a que apresentou menor toxicidade mantendo derme e epiderme com características morfológicas normais após o tempo de contato de 24 h (Figura 21).

Na figura 22 constatou-se a influência da formulação cosmética creme incorporada com *L. salviaefolia*, apesar do maior desprendimento da queratina foi verificada uma baixa toxicidade. Observando ainda as células de queratinócitos viáveis na epiderme. Além da manutenção na morfologia da derme e da epiderme.

Na figura 23 constatou-se a toxicidade da formulação de xampu mesmo sem a adição da *L. salviaefolia*, isso se deve a presença de tensoativos, por isso são empregados, na sua maioria, em produtos de uso externo e com enxágüe. Na figura 23 observa a desprendimento de toda parte córnea de queratina, da epiderme e uma própria alteração estrutural da epiderme principalmente na camada intermediária, apesar de ainda ser possível observar células de queratinócitos viáveis principalmente próximas às papilas dérmicas na camada basal.

Na figura 24 tem-se o composto dérmico-epidérmico após 24 h de contato com a formulação cosmética xampu incorporada com *L. salviaefolia*. Os efeitos tóxicos são similares aos efeitos apresentados pela figura 23 representando a base de xampu sem a adição da fração de acetato de etila do extrato de *L. salviaefolia*. Na qual se verifica um desprendimento da camada córnea e a separação dermo-epidérmica, com alteração estrutural da epiderme. Características evidenciadas pela toxidade da base do xampu e toxicidade da *L. salviaefolia*, entretanto toda a toxicidade constatada nas figuras 23 e 24 não devem ser

atribuídas somente ao extrato uma vez que a formulação sem a o extrato também se mostrou tóxica, provavelmente pela presença dos tensoativos na formulação.

Na figura 25 temos o controle chamado de branco 48 h em que não foi adicionada nenhuma amostra, mas, permaneceu no sistema de cultivo na interfase ar-líquido durante as 48 horas de teste. Nesta ilustração o epitélio se mostrou organizado apesar da separação da derme e da epiderme, sendo que na avaliação da toxicidade para este teste não foi levado em consideração a separação da derme e epiderme, pois pode ser um artefato, desta forma a toxicidade foi avaliada conforme ao aspecto das diferenças morfológicas e diferenças tintoriais da pele. Na figura 25 podem-se evidenciar diferenças tintoriais, devido ao amadurecimento celular, podendo ser observado ainda as lamelas de queratina, constituindo a camada córnea. Além da observação das camadas intermediária ou espinhosa e a granulosa.

Na figura 26 tem-se a influência da amostra de gel base em 48 horas de contato com o composto dérmo-epidérmico. Nesta ilustração temos a visualização apenas da parte epidérmica em que é possível verificar a toxicidade da base gel devido às características morfológicas e tintoriais presentes na epiderme, principalmente na visualização das células de queratinócitos que ficam pouco evidentes e no desprendimento da parte córnea.

Na figura 27 verifica-se a toxicidade do gel com *L. salviaefolia* em contato com o composto dérmico-epidérmico, constatando diferença na morfologia e aspectos tintoriais, desprendimento da derme e epiderme, desprendimento da camada superficial da camada córnea, dificuldade de identificação de queratinócitos viáveis. Entretanto é importante ressaltar que nesta figura temos a toxicidade da formulação base associada à toxicidade da

L. salviaefolia. E quando comparada com a figura 26 não existem diferenças significativas. O que sugere que parte da toxicidade deve-se aos próprios constituintes da formulação base.

O estudo histológico por microscopia óptica visando avaliar a toxicidade das formulações cosméticas de creme por 48 h de contato está evidenciado nas figuras 28 e 29.

Na figura 28 consta apenas à influência da base da formulação sem a adição da *L. salviaefolia* e na figura 57 tem-se a formulação incorporada com o extrato da planta. Em ambas as figuras têm-se a visualização apenas da epiderme. Na figura 28 pode visualizar mais facilmente queratinócitos viáveis.

Enquanto que na figura 29, a presença das células de queratinócitos viáveis não é tão facilmente detectável, sugerindo uma maior toxicidade apresentada pela formulação com a incorporação da *L. salviaefolia.*

A avaliação da toxicidade das formulações de xampu base e xampu incorporado com *L. salviaefolia* em composto dérmico-epidérmico estão elucidados nas figuras 30 e 31. Verificaram-se toxidades significativas, em ambas as formulações, devido a diferenças morfológicas e tintoriais da epiderme.

Na figura 30 evidenciamos a separação da derme e da epiderme além da separação da camada córnea e da camada superficial na epiderme, adicionalmente a dificuldade em se evidenciar células de queratinócitos viáveis.

Assim como na figura 30 na figura 31 constata-se a separação da derme e epiderme, entretanto a epiderme não apresentou grandes alterações morfológicas, o que caracteriza um nível de toxicidade semelhante entre as formulações com e sem a incorporação de *L. salviaefolia.*

Depois de verificar a interferência das formulações bases, sem a incorporação da *L. salviaefolia*, foi constatado que mesmo as bases das formulações, principalmente na formulação de xampu, exercem efeito tóxico perante as culturas dos substitutos cutâneos dermo-epidérmico. Desta forma em alguns casos não se pode afrimar que tais efeitos tóxicos são devidos exclusivamente à fração de acetato de etila da *Lippia saviaefolia*.

No experimento da citoxicidade em cultura de queratinócitos humanos a fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* foi colocada diretamente sobre os queratinócitos. Desta maneira o teste é mais sensível que o teste *in vivo* ou até mesmo, desta maneira os resultados são expostos com maior segurança em relação aos estudos de toxicidade no composto dérmico-epidermico. Salientando ainda a relação de diversas concentrações e diferente tempo de contato da fração de acetato de etila da *L. salviaefolia* em contato com os queratinócitos humanos.

De acordo com resultados obtidos no teste de citoxicidade (Figura 32) verificou-se que a *L. salviaefolia* na concentração de 0,2%, correspondente ao CMI, foi tóxica em quase todos os tempos de contato, exceto com meia hora de contato, em que se observa uma viabilidade celular de cerca de 90%.

Na concentração de 0,1% da fração de acetato de etila da *L. salviaefolia*, observou-se citoxicidade nos tempos de 24 e 48 horas. Entretanto nesta mesma concentração (0,1%) com 6h de contato alcançou uma viabilidade celular de 70%, atingindo segurança nos tempos de 2h e meia hora de contato (Figura 32).

Na concentração de 0,05 % da fração de acetato de etila da *L. salviaefolia*, com 48 horas de contato demonstrou uma viabilidade celular de cerca de 70%. Nesta mesma concentração com 24 e 6 horas

de contato apresentou viabilidade celular em torno de 80%, atingindo a faixa de segurança com meia e 2h de contato (Figura 32).

Já nas concentrações de 0,025 e 0,0125% de acetato de etila de *L. salviaefolia*, apenas em 48 horas de contato observou leve toxicidade em que a viabilidade celular ficou entre 80 e 90%. Nos demais tempos de contato testados, mostraram-se seguras (Figura 32), sugerindo que formulações cosméticas de uso externo, contendo até 0,025 % de acetato de etila de *L. salviaefolia*, podem ser consideradas seguras.

Deste modo, sugere-se que a fração de acetato de etila de *L. salviaefolia* na concentração do CMI (2,0 mg/mL), demonstrou ser citotóxica apenas após 6 horas de contato, sendo que com 2 horas de contato atingiu uma viabilidade celular de pouco menos de 30%, atingindo segurança e viabilidade celular apenas com meia hora de contato com perfil semelhante ao controle.

O presente pedido apresenta como perspectiva uma avaliação de absorção para constatação de qual concentração da *L. salviaefolia* entra realmente em contato com os queratinócitos viáveis. Entretanto, mesmo com a toxicidade determinada a *L. salviaefolia* pode ser utilizada como conservante em formulações de enxágüe, como no caso do xampu, onde a legislação permite o uso de substâncias mais agressivas. Outro possível uso para a *L. salviaefolia* destina-se como antimicrobiano seletivo. De acordo com a presente invenção, o CMI para a fração de acetato de etila apresenta valores dentro do que limite de segurança para *S. aureus*, com CMI de 0,035 – 0,005 mg/mL; para *C. albicans* com CMI de 0,25-0,375 mg/mL e para *E. coli* com CMI de 0,5 – 0,75 mg/mL.

REIVINDICAÇÕES

1. EXTRATOS DE FOLHAS DE *LIPPIA SALVIAEFOLIA* CHAM., caracterizado pelo fato de compreender extratos hidroalcoólico, diclorometano, acetato de etila e/ou clorofórmico.

2. EXTRATOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos extratos compreenderem preferencialmente os extratos de acetato de etila e/ou clorofórmico.

3. EXTRATOS, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato dos extratos compreenderem frações ativas.

4. FRAÇÕES ATIVAS, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato das frações ativas compreenderem os ativos escolhidos entre flavonóides totais e fenóis totais, em particular, os 4',5-dihidroxi-7-metoxi-flavonona, a naringenina, o apiflorol e/ou suas combinações.

5. FRAÇÕES ATIVAS, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato das frações ativas de acetato de etila e/ou clorofórmica compreenderem CMI de 0,2%.

6. FRAÇÕES ATIVAS, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de compreenderem formulações cosméticas e/ou farmacêuticas.

7. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato das formulações compreenderem formas de apresentação tais como, emulsões, géis, cremes, pomadas, soluções e/ou xampus.

8. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato das formulações compreenderem, preferencialmente, cremes, géis e xampus.

9. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato das formulações cremes compreenderem componentes escolhidos entre cera auto-emulsionante e/ou tensoativo, por exemplo, estearatos de poliglicerila, álcool cetoestearílico, sesquiestearato de metilglicose PEG-20; opcionalmente, agentes de consistência polimérica, tais como, o monoestearato de glicerila, dispersão de hidroxietilcelulose 2% p/v; como emoliente, o óleo mineral, acetato de cetila e/ou álcool de lanolina acetilado, silicone volátil, 2-octil-dodecanol; como umectante, propilenoglicol e/ou glicerina; e conservantes, tais como os parabenos.

10. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato das formulações géis compreenderem componentes escolhidos entre agentes de consistência poliméricos e/ou gelificantes, por exemplo, polímeros carbonílicos, hidroxicelulose; agentes acidificantes e/ou alcalinizantes, como a solução de hidróxido de sódio a 20% (p/v), trietanolamina; tensoativos, tais como, álcool cetoestearílico, álcool cetílico etoxilado e/ou propoxilado, polióI de éster de ácido graxo, como umectante, tais como, propilenoglicol, sorbitol 70% e/ou glicerina; e conservantes, tais como, os parabenos.

11. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato das formulações xampus compreenderem componentes escolhidos entre tensoativos aniônico, catiônico e/ou anfótero, primário e/ou secundário, tais como, lauril éter sulfato de sódio, lauril sulfato de trietanolamina, lauril sulfosuccinato dissódico e/ou lauril sulfato de sódio, dietanolamida de ácidos graxos de coco, cocoamido propil betaína, fosfato 3-oleílico; agente neutralizante, como a solução ácida cítrico a 10% (p/v); agente de consistência como diestearato de glicol,

solução de cloreto de sódio 20% (p/v); e conservantes, tais como os parabenos.

12. USO DOS EXTRATOS, de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de composições farmacêuticas e/ou cosméticas como antimicrobiano.

13. USO DOS EXTRATOS, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato da aplicação como antimicrobiano compreender a utilização como agente conservante em formulações cosméticas e/ou farmacêuticas.

14. USO DOS EXTRATOS, de acordo com as reivindicações 12 e 13, caracterizado pelo fato de ter atividade antimicrobiana compreender a ação em bactérias Gram-negativas; Gram-positivas, leveduras e/ou fungos (bolor).

FIGURA 1



FIGURA 2

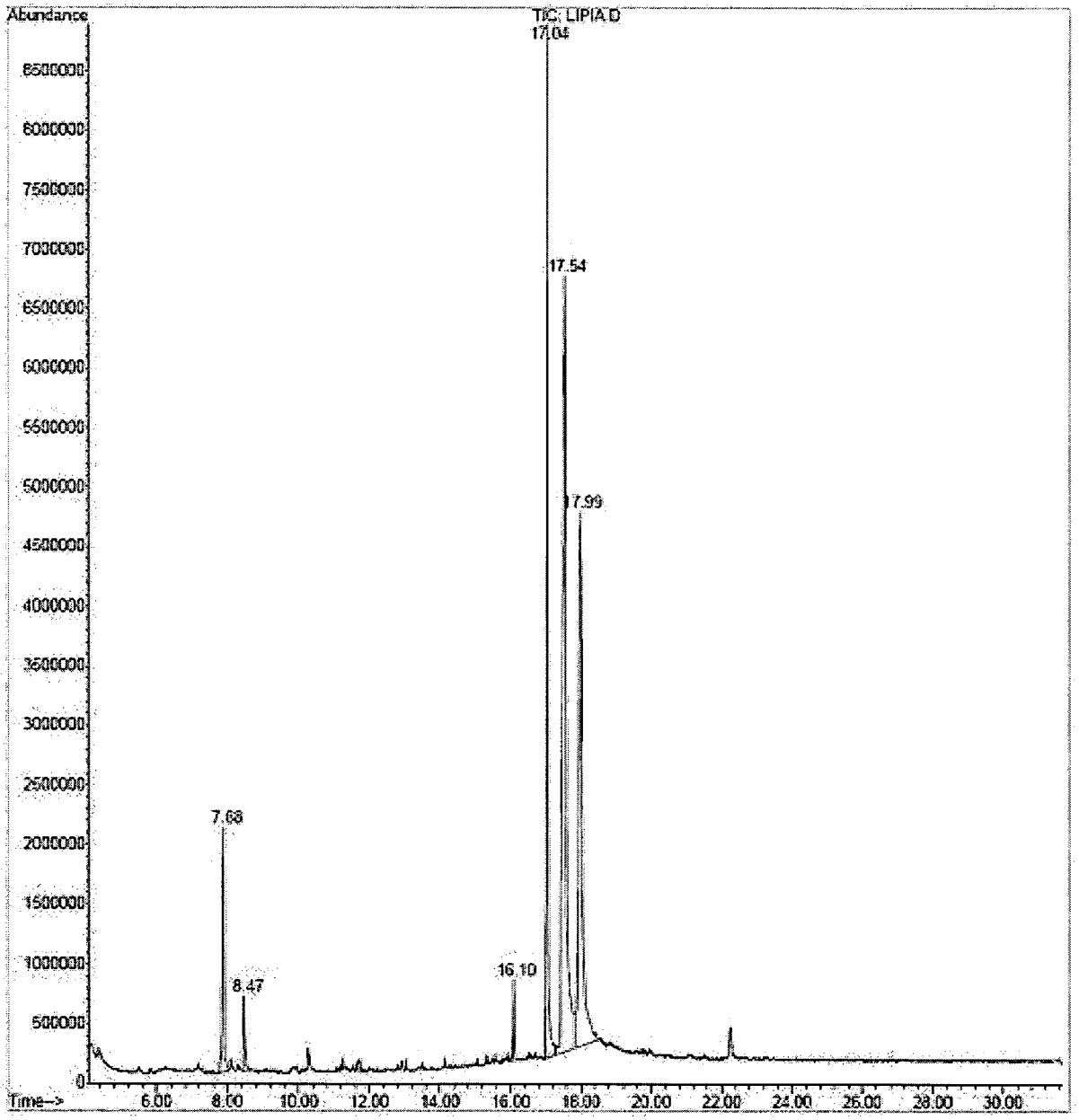

Abundance
TIC: LIPIA.D
17.04
17.54
17.99
7.68
8.47
16.10
Time-->
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00

FIGURA 3

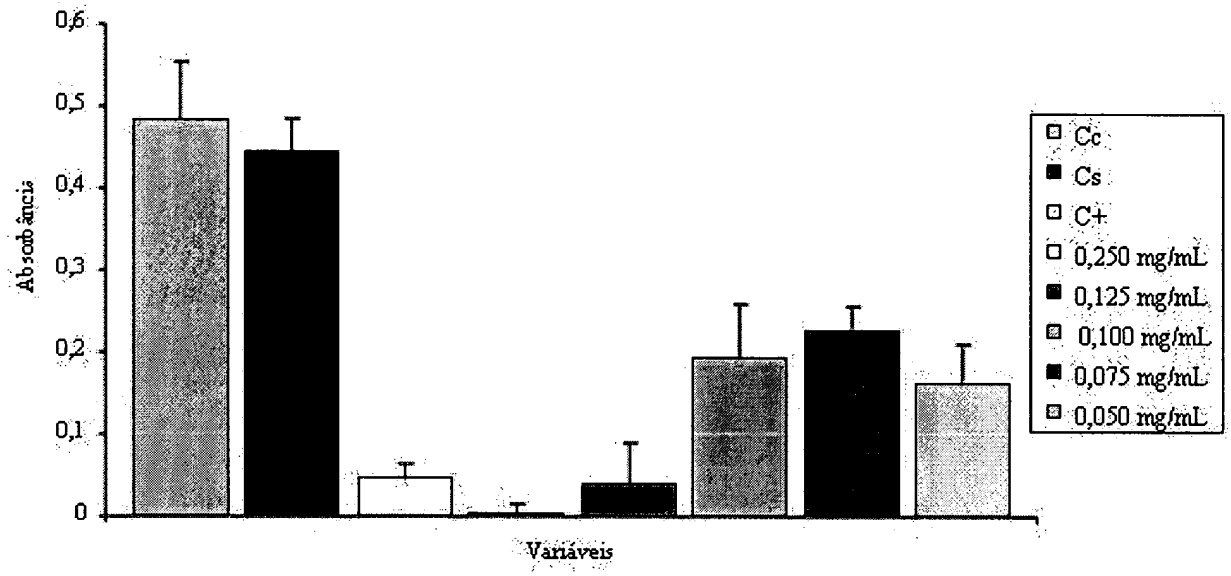

0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,250 mg/mL
0,125 mg/mL
0,100 mg/mL
0,075 mg/mL
0,050 mg/mL

FIGURA 4

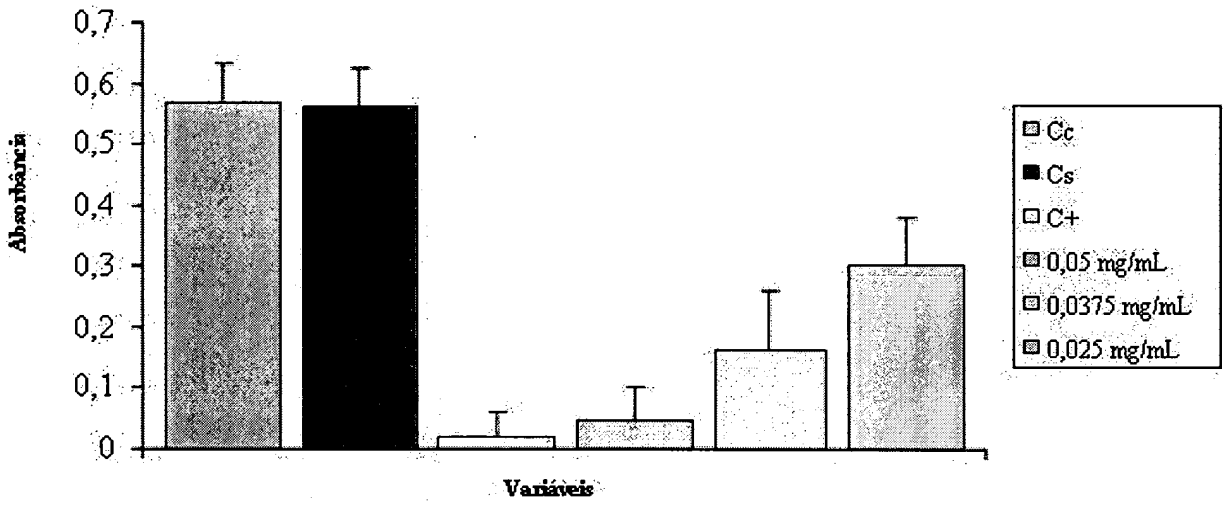

0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,05 mg/mL
0,0375 mg/mL
0,025 mg/mL

FIGURA 5

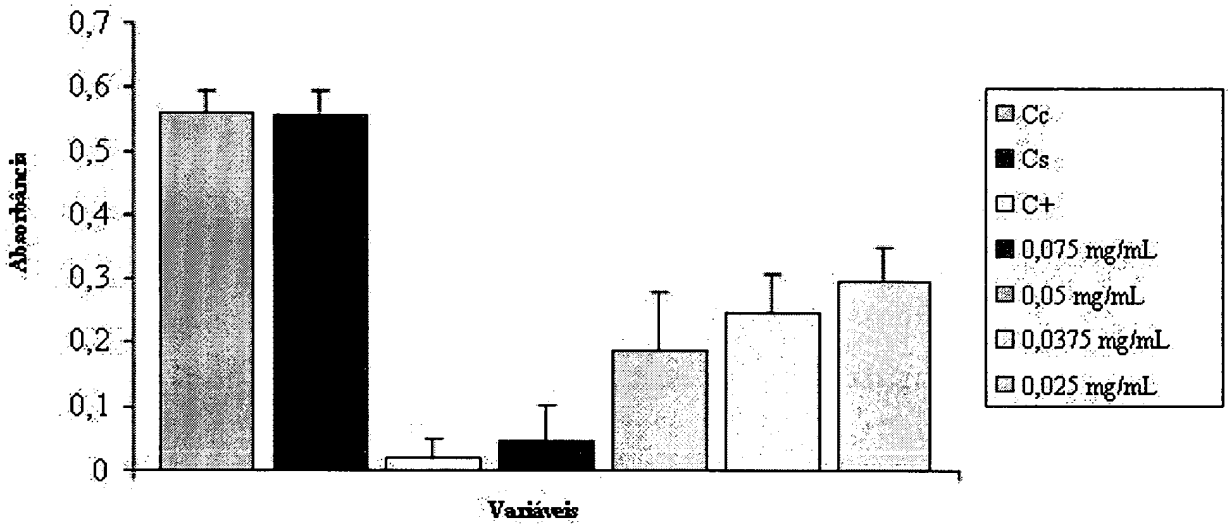

0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,075 mg/mL
0,05 mg/mL
0,0375 mg/mL
0,025 mg/mL

FIGURA 6

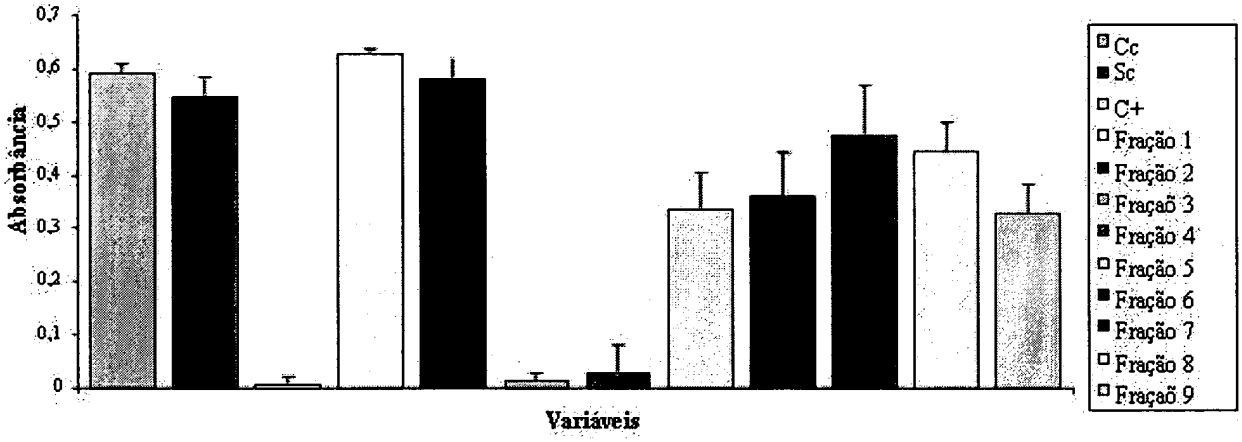

0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Sc
C+
Fração 1
Fração 2
Fração 3
Fração 4
Fração 5
Fração 6
Fração 7
Fração 8
Fração 9

FIGURA 7

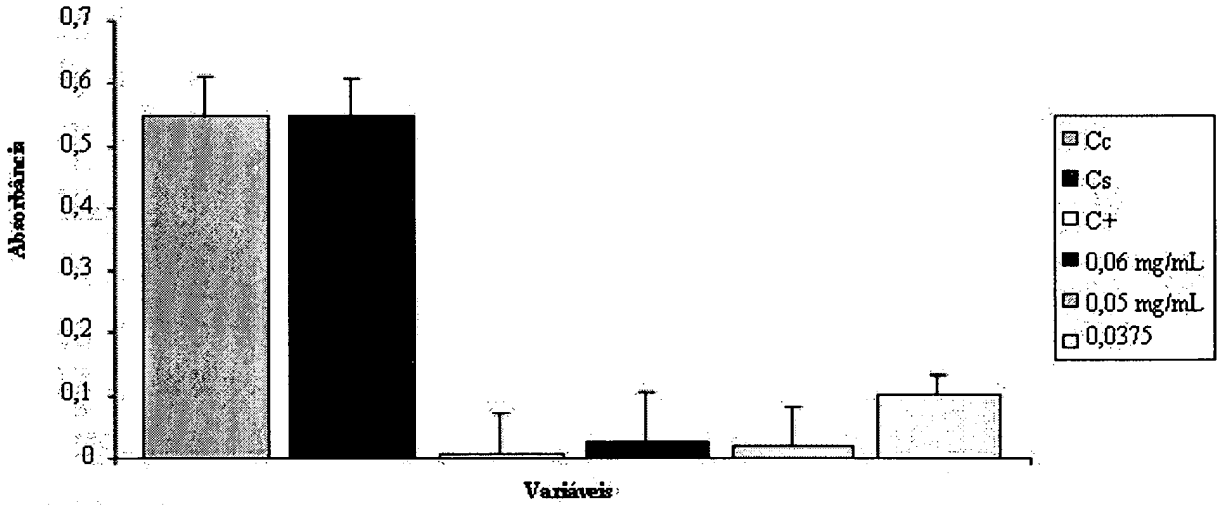

0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,06 mg/mL
0,05 mg/mL
0,0375

FIGURA 8

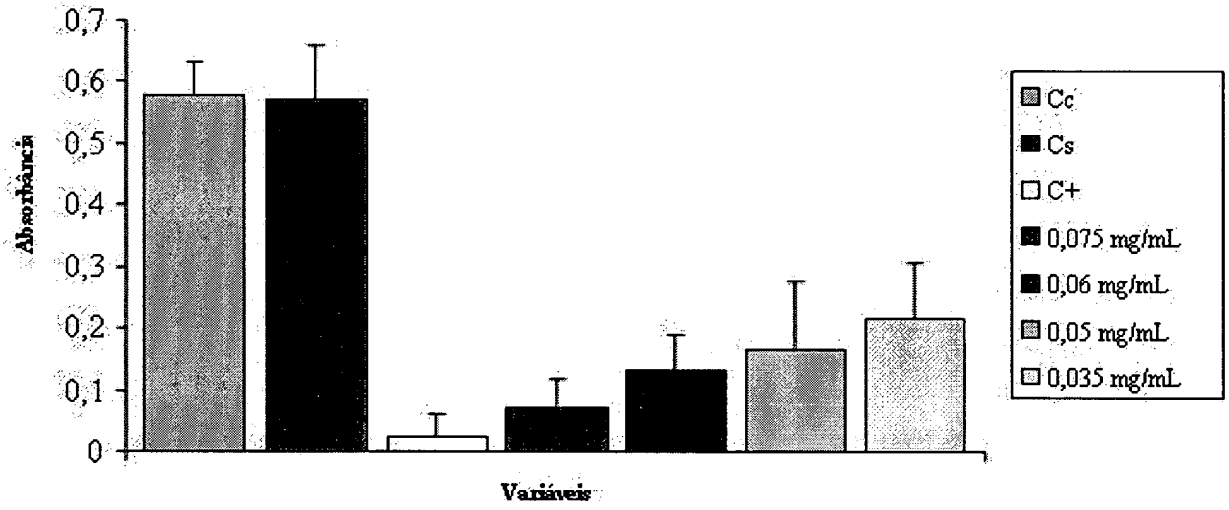

0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,075 mg/mL
0,06 mg/mL
0,05 mg/mL
0,035 mg/mL

FIGURA 9

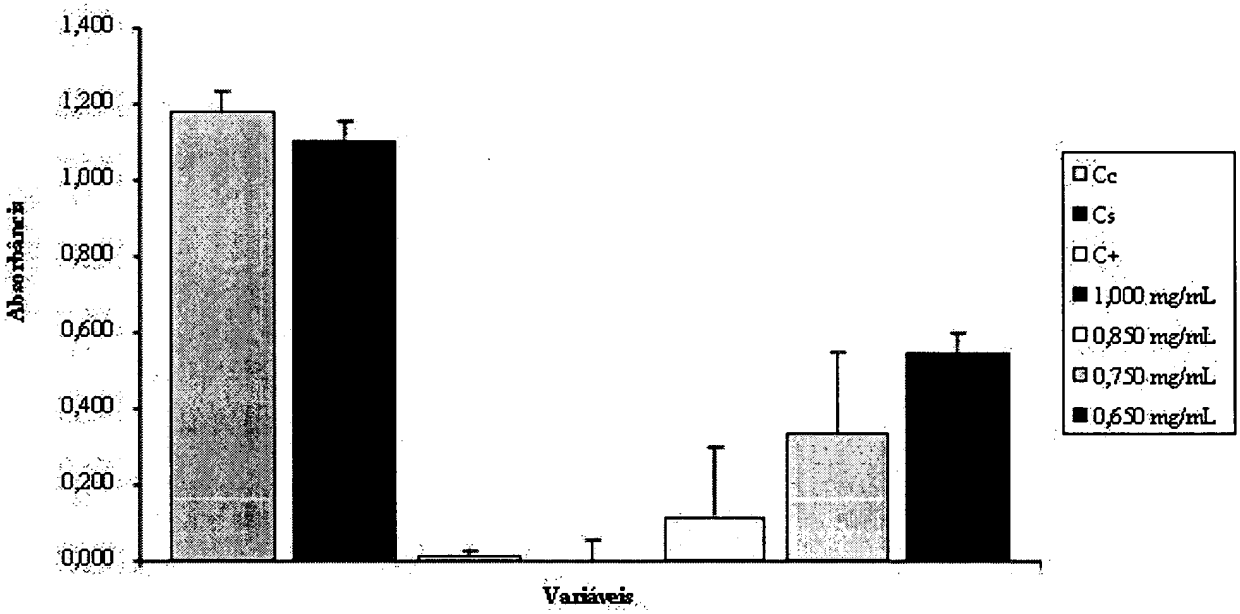

1,400
1,200
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
1,000 mg/mL
0,850 mg/mL
0,750 mg/mL
0,650 mg/mL

FIGURA 10

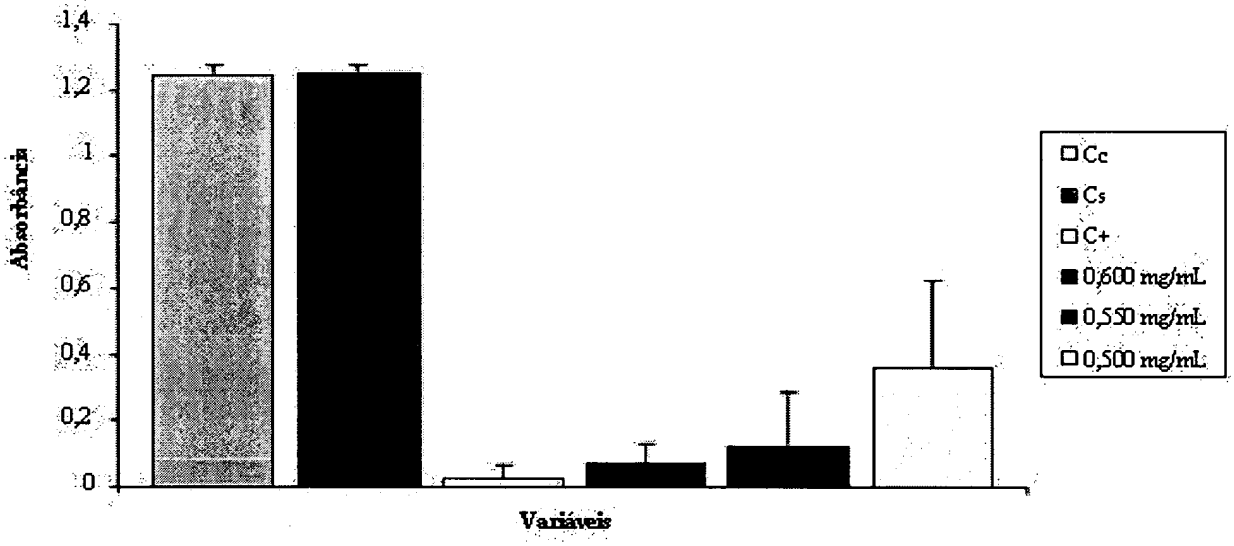

1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,600 mg/mL
0,550 mg/mL
0,500 mg/mL

FIGURA 11

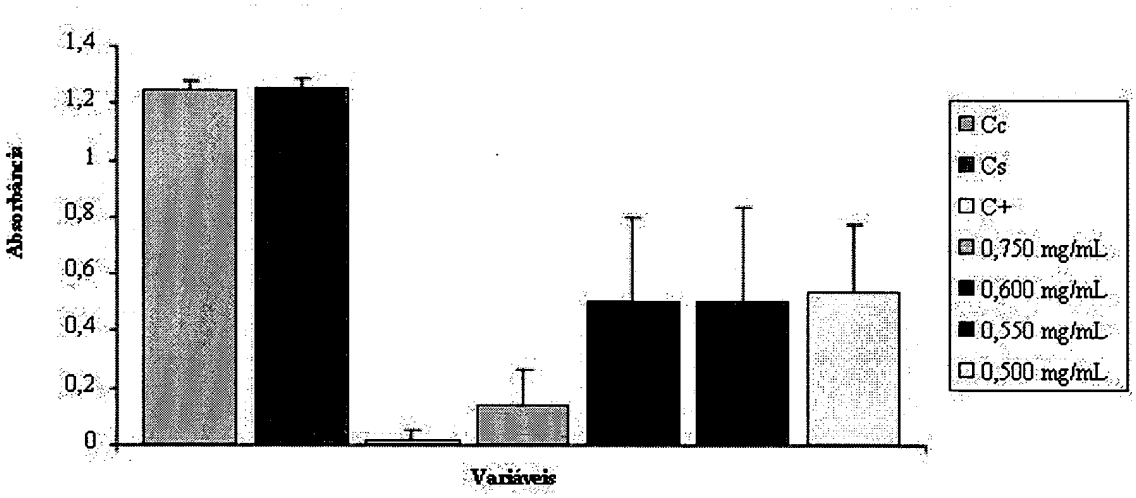

1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,750 mg/mL
0,600 mg/mL
0,550 mg/mL
0,500 mg/mL

FIGURA 12

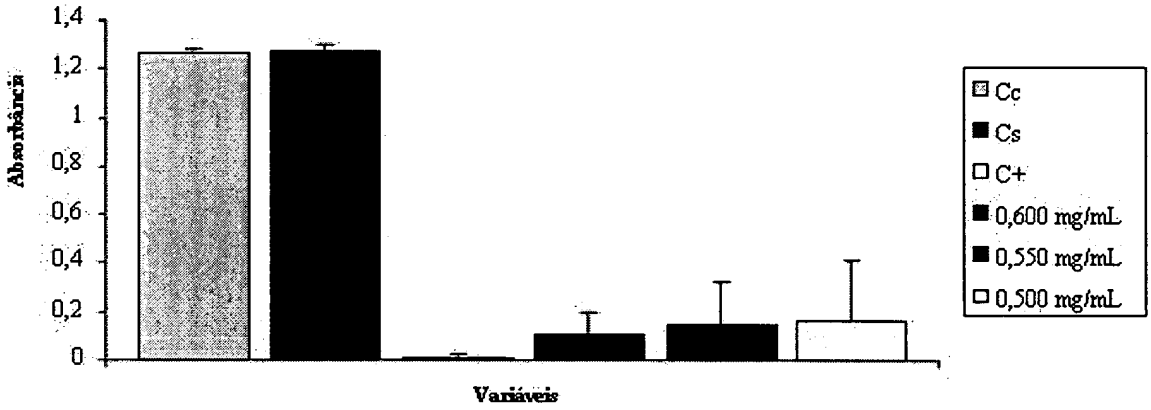

1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,600 mg/mL
0,550 mg/mL
0,500 mg/mL

FIGURA 13

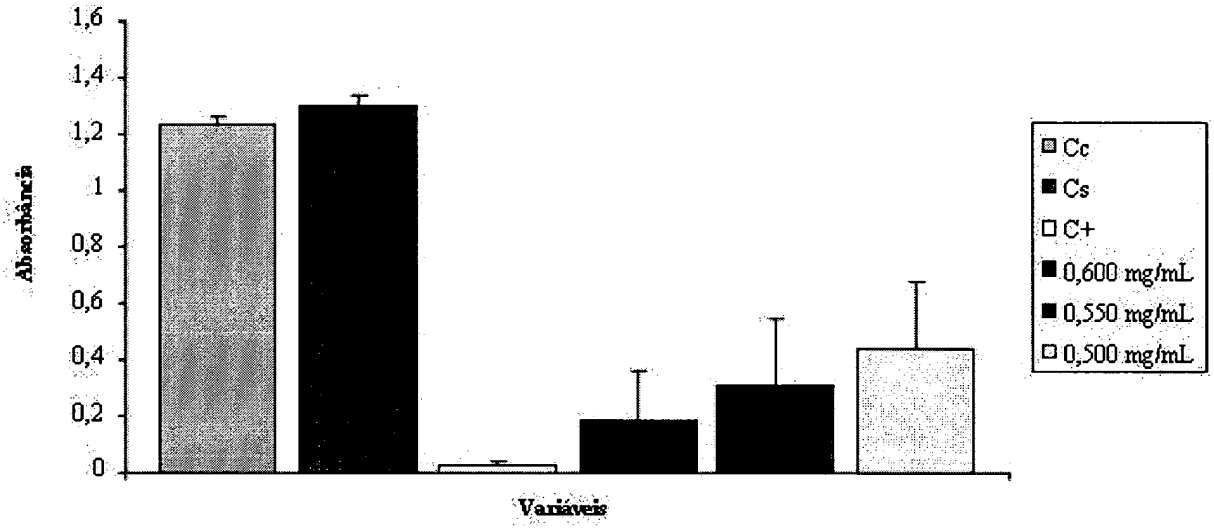

1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
0,600 mg/mL
0,550 mg/mL
0,500 mg/mL

FIGURA 14

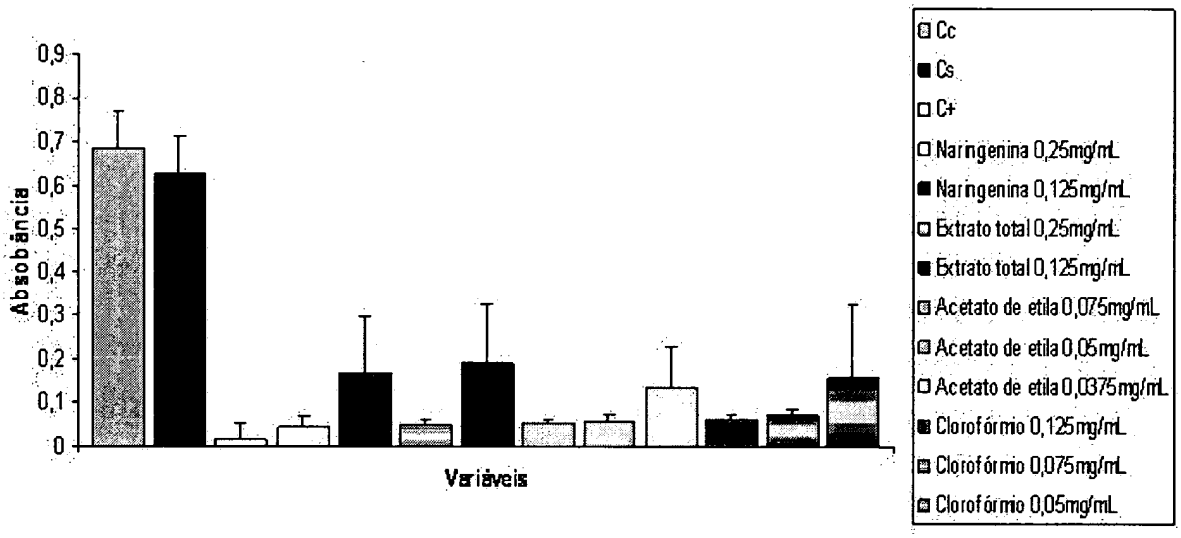

Absorbância
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Variáveis
Cc
Cs
C+
Naringenina 0,25mg/mL
Naringenina 0,125mg/mL
Extrato total 0,25mg/mL
Extrato total 0,125mg/mL
Acetato de etila 0,075mg/mL
Acetato de etila 0,05mg/mL
Acetato de etila 0,0375mg/mL
Clorofórmio 0,125mg/mL
Clorofórmio 0,075mg/mL
Clorofórmio 0,05mg/mL

FIGURA 15

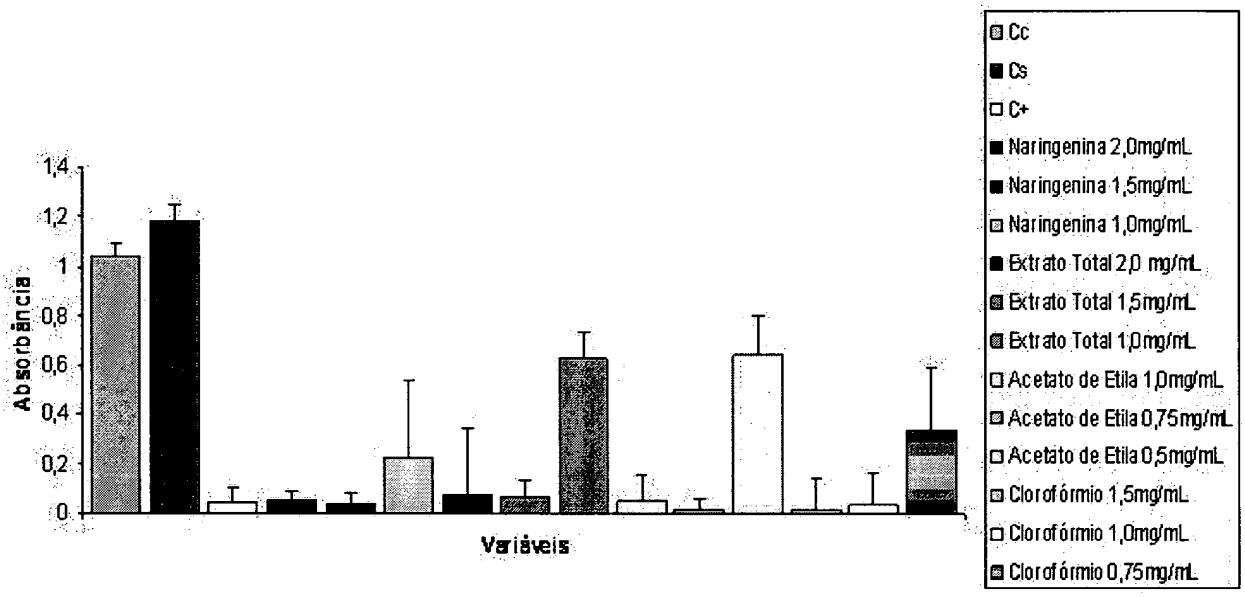

Absorbância
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Variáveis
Cc
Cs
C+
Naringenina 2,0mg/mL
Naringenina 1,5mg/mL
Naringenina 1,0mg/mL
Extrato Total 2,0 mg/mL
Extrato Total 1,5mg/mL
Extrato Total 1,0mg/mL
Acetato de Etila 1,0mg/mL
Acetato de Etila 0,75mg/mL
Acetato de Etila 0,5mg/mL
Clorofórmio 1,5mg/mL
Clorofórmio 1,0mg/mL
Clorofórmio 0,75mg/mL

FIGURA 16

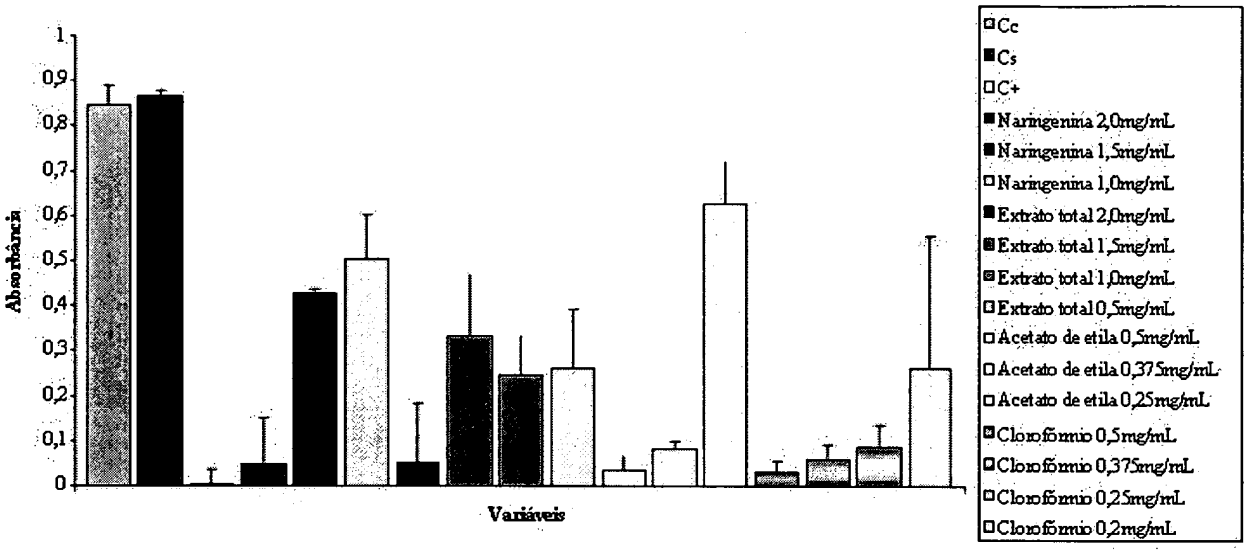

Absorbância
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Variáveis
Cc
Cs
C+
Naringenina 2,0mg/mL
Naringenina 1,5mg/mL
Naringenina 1,0mg/mL
Extrato total 2,0mg/mL
Extrato total 1,5mg/mL
Extrato total 1,0mg/mL
Extrato total 0,5mg/mL
Acetato de etila 0,5mg/mL
Acetato de etila 0,375mg/mL
Acetato de etila 0,25mg/mL
Clorofórmio 0,5mg/mL
Clorofórmio 0,375mg/mL
Clorofórmio 0,25mg/mL
Clorofórmio 0,2mg/mL

FIGURA 17

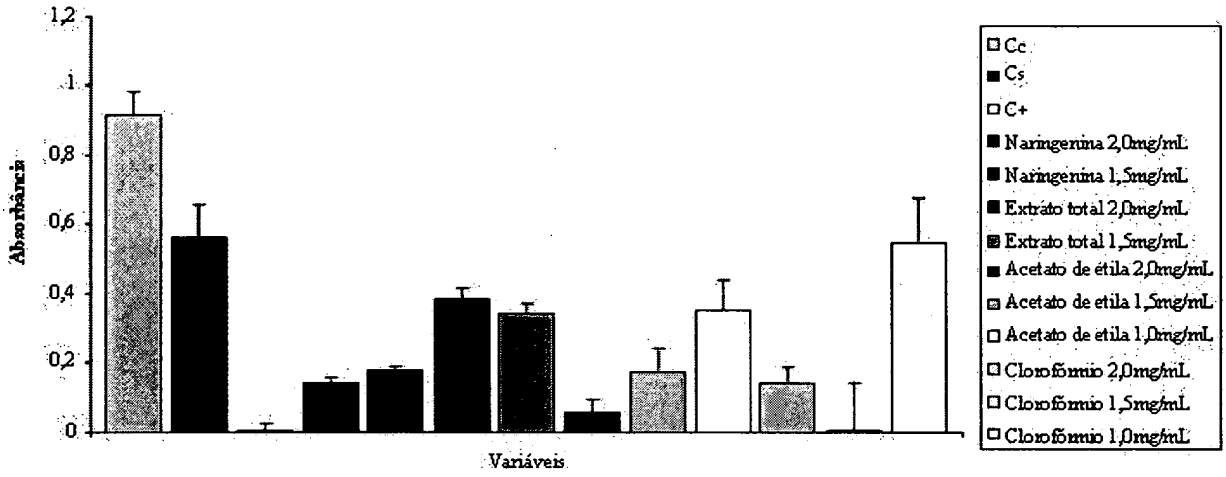

1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbância
Variáveis
Cc
Cs
C+
Naringenina 2,0mg/mL
Naringenina 1,5mg/mL
Extrato total 2,0mg/mL
Extrato total 1,5mg/mL
Acetato de etila 2,0mg/mL
Acetato de etila 1,5mg/mL
Acetato de etila 1,0mg/mL
Clorofórmio 2,0mg/mL
Clorofórmio 1,5mg/mL
Clorofórmio 1,0mg/mL

FIGURA 18



FIGURA 19

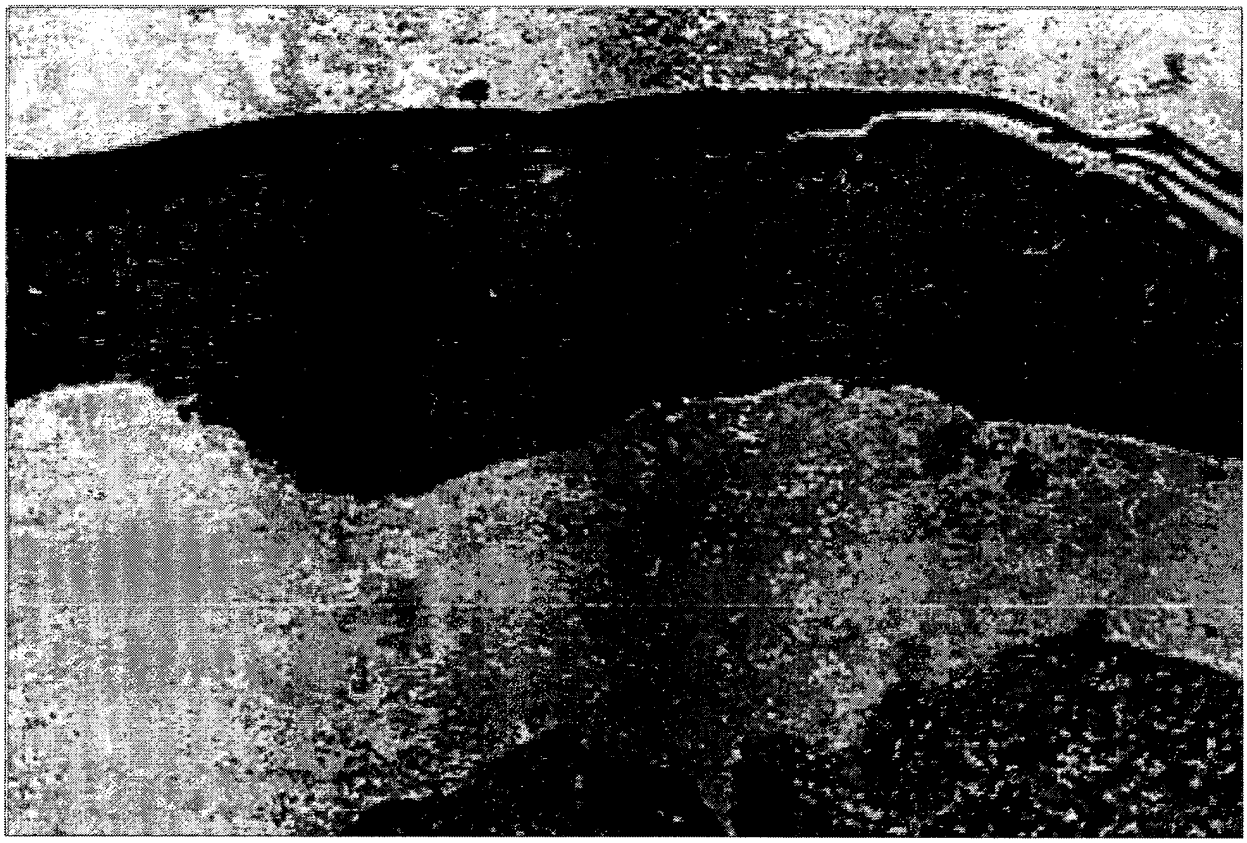


FIGURA 20

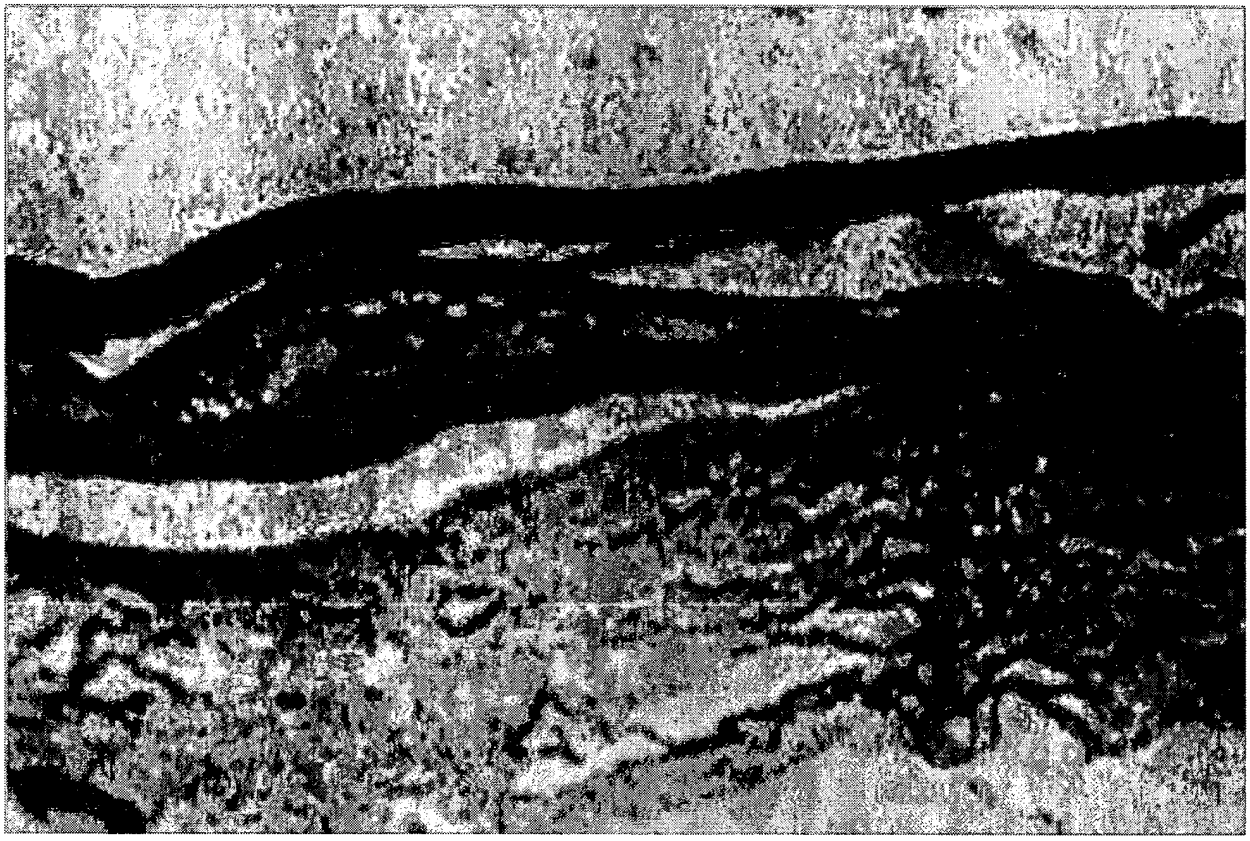


FIGURA 21

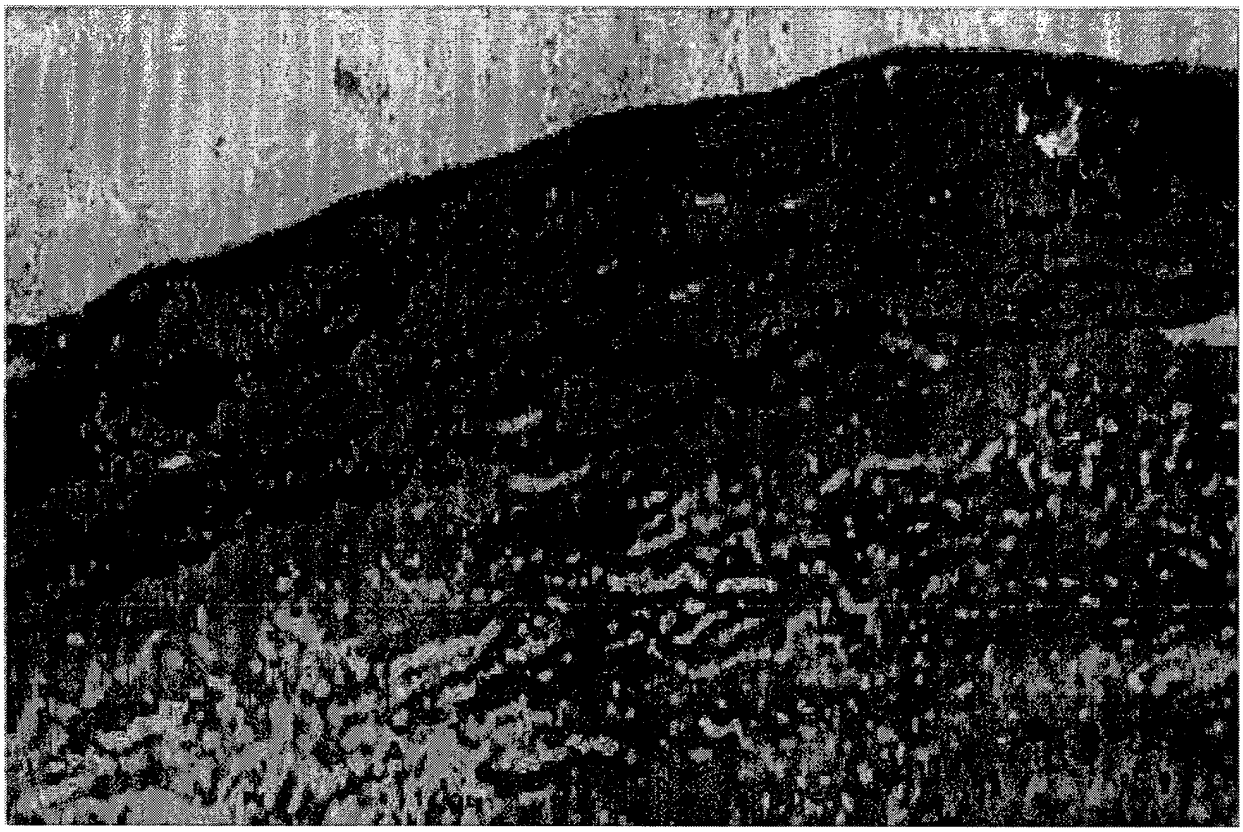


FIGURA 22

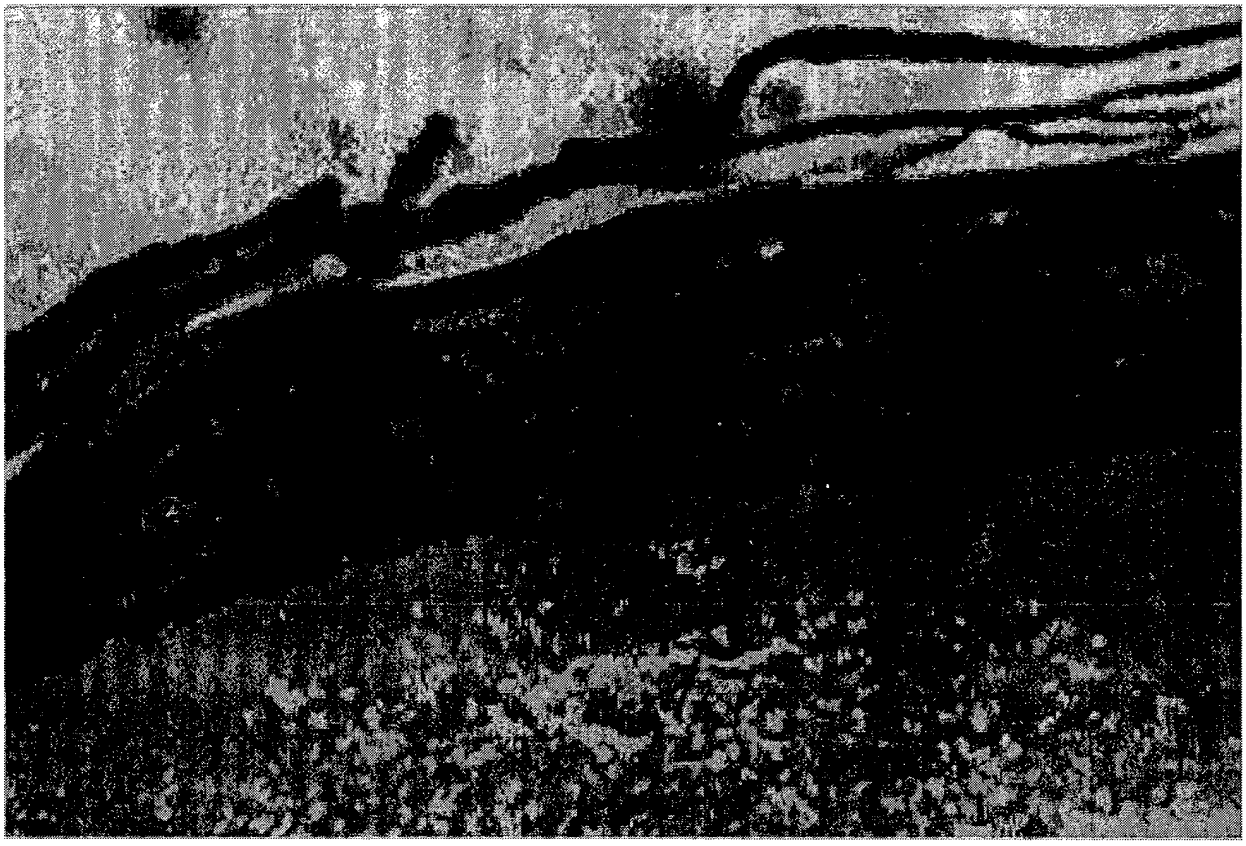


FIGURA 23

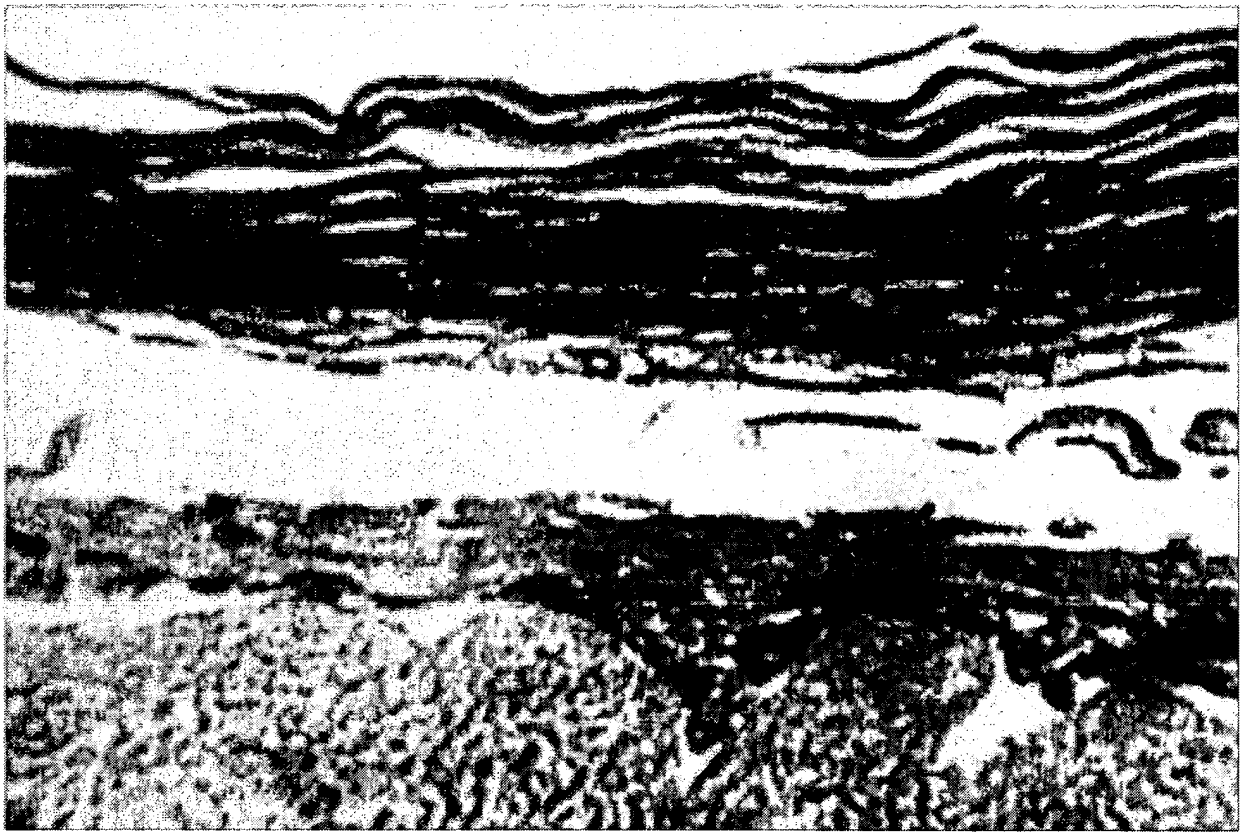


FIGURA 24

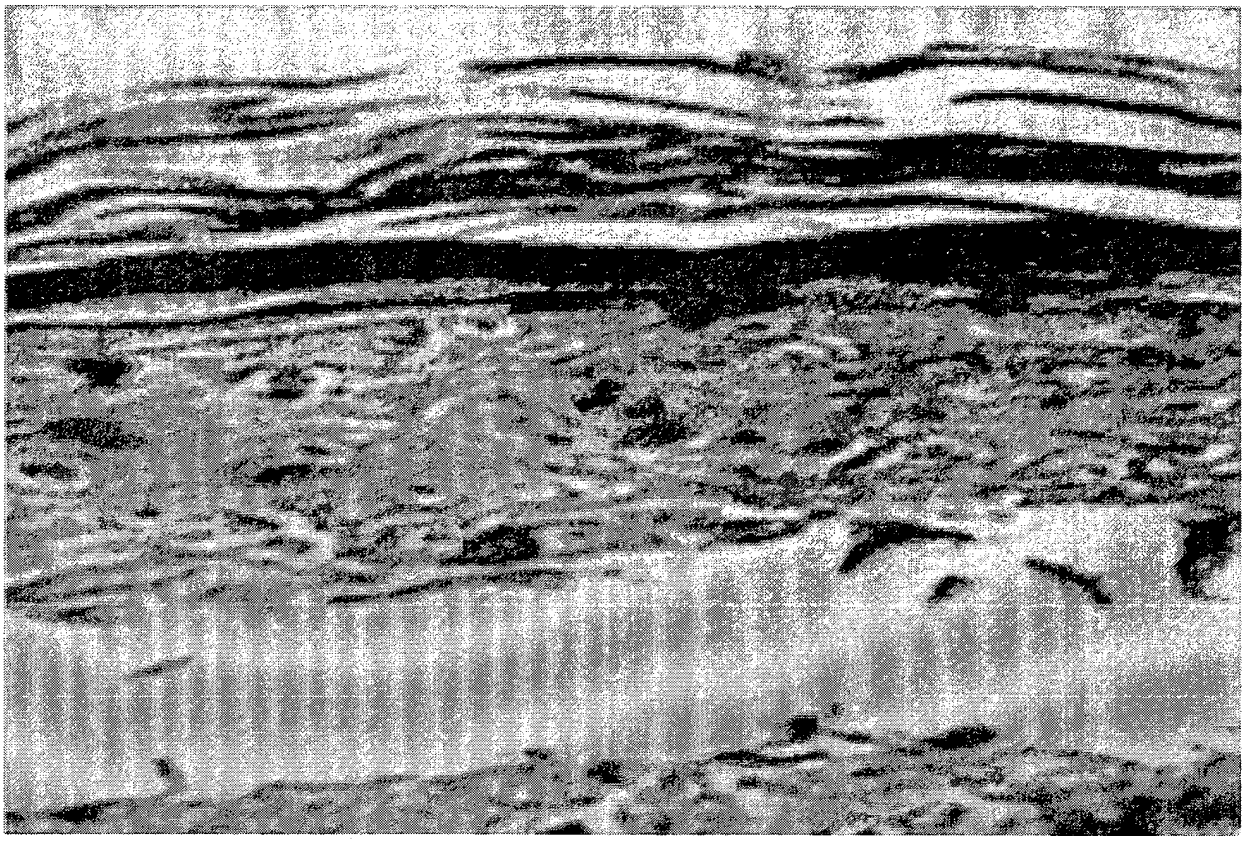


FIGURA 25

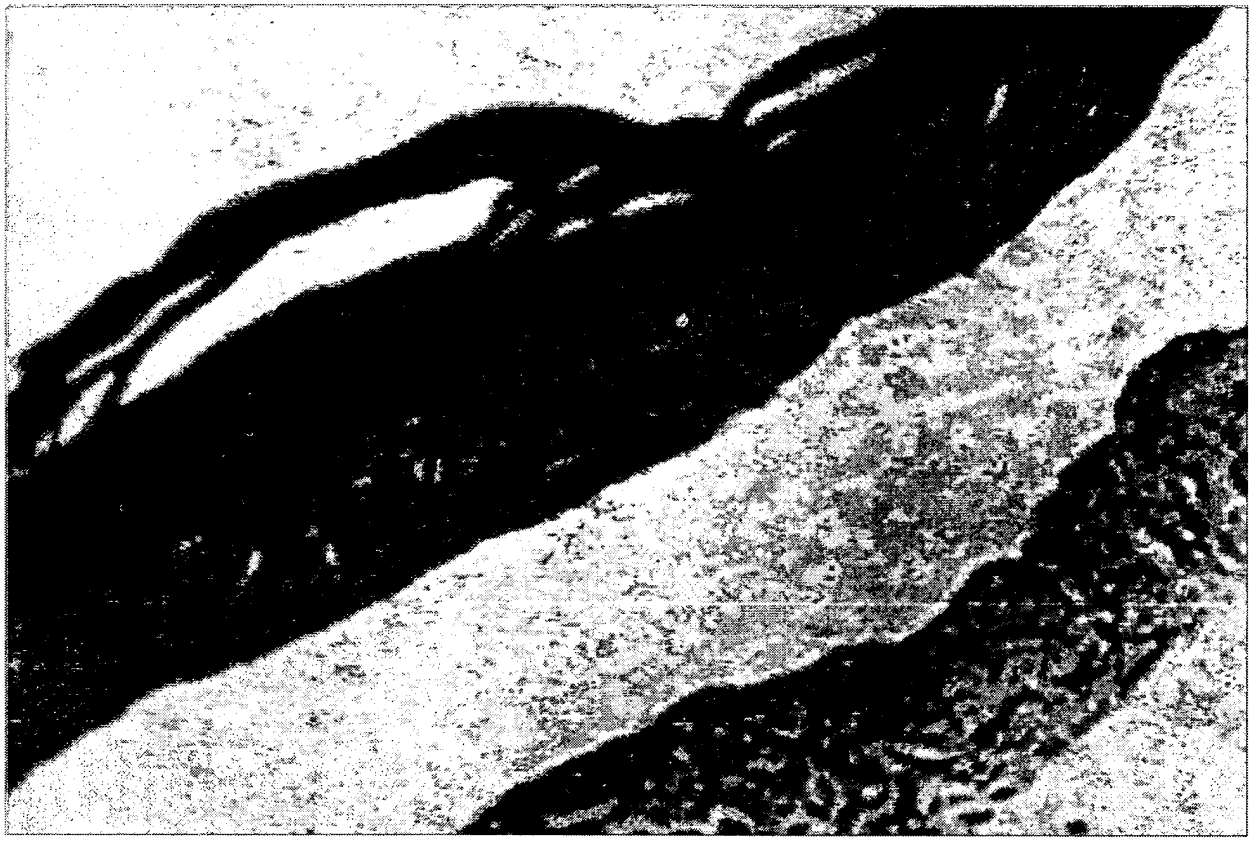


FIGURA 26



FIGURA 27



FIGURA 28



FIGURA 29



FIGURA 30

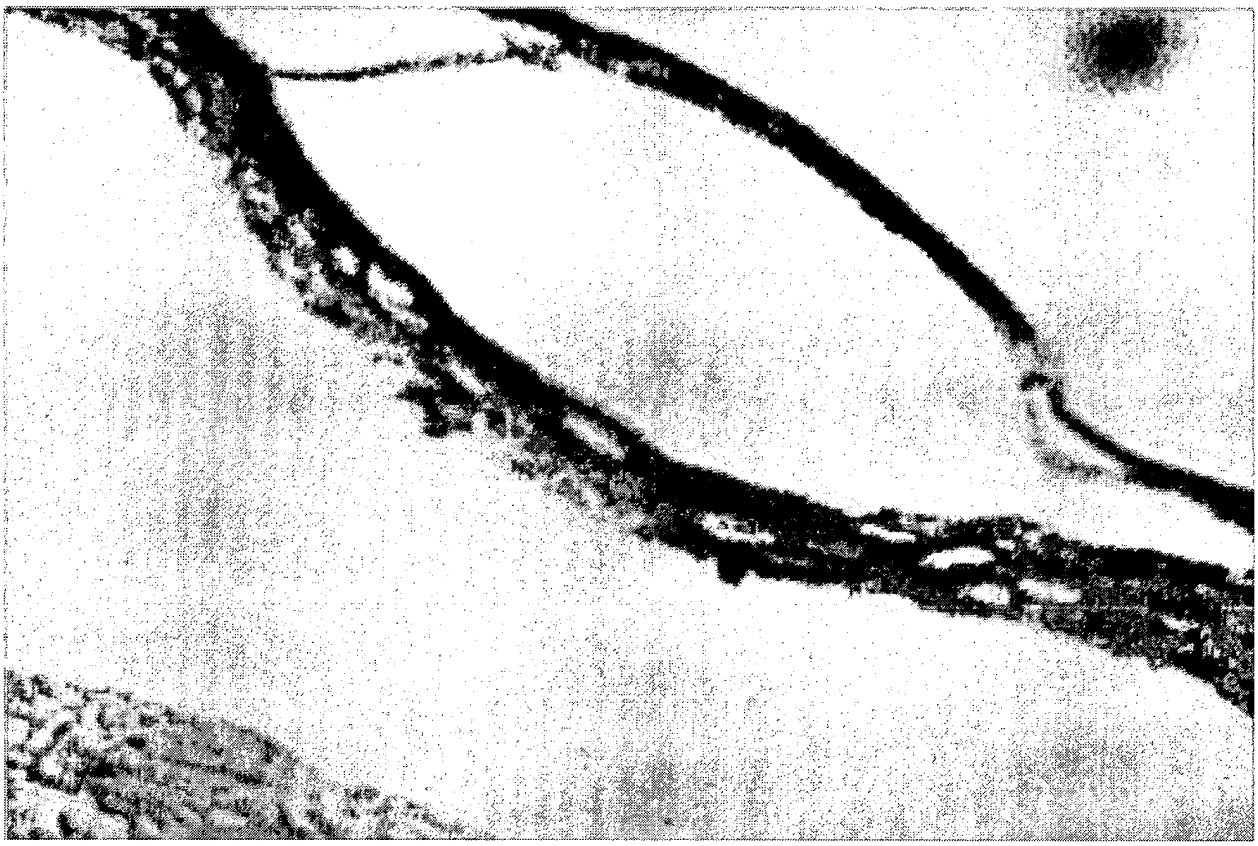
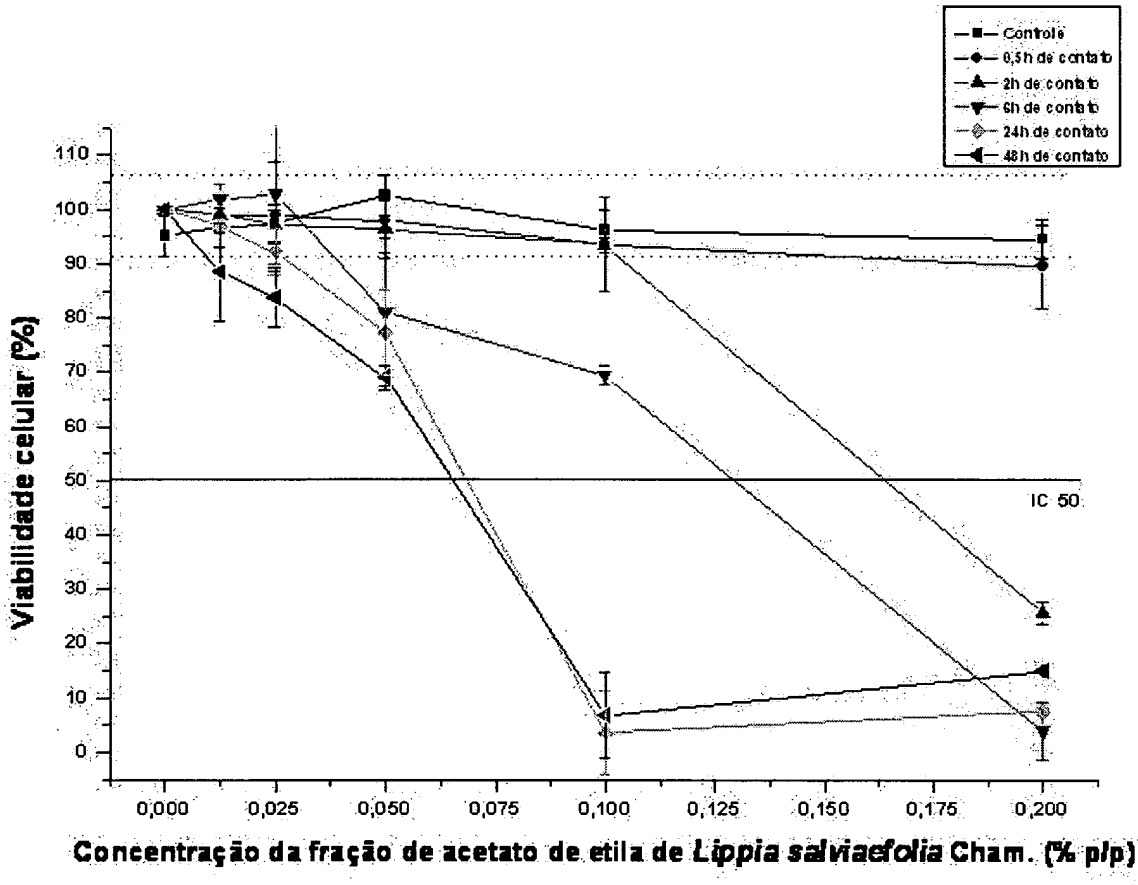


FIGURA 31



FIGURA 32


Controle
0,5h de contato
2h de contato
6h de contato
24h de contato
48h de contato
Viabilidade celular (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
IC 50
0,000
0,025
0,050
0,075
0,100
0,125
0,150
0,175
0,200
Concentração da fração de acetato de etila de Lippia salviaefolia Cham. (% p/p)

PI0804288-8

RESUMO

"EXTRATOS DE *LIPPIA SALVIAEFOLIA* CHAM., FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÕES E SEU USO"

A presente invenção refere-se aos extratos de folhas de *Lippia salviaefolia* Cham., suas frações ativas, composições farmacêuticas e/ou cosméticas e seu uso como antimicrobiano natural (conservante).