

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CONSERVANTE DA ETILHEXILGLICERINA EM EMULSÃO ANIÔNICA

Palavras-Chave: ETILHEXILGLICERINA, FORMULAÇÕES COSMÉTICAS, TESTE DESAFIO DE CONSERVANTES

Autores(as):

MARIANA MINSKI FURTADO, FCF – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. KARINA COGO MÜLLER (orientadora), FCF – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. GISLAINE RICCI LEONARDI (co-autora), FCF – UNICAMP

SEBASTIÃO DONIZETI GONÇALVES (co-autor) – PROSERV QUÍMICA LTDA

1. INTRODUÇÃO

A estabilidade, segurança e eficácia das formulações cosméticas podem ser comprometidas pela contaminação com microrganismos, o que pode afetar as características físico-químicas do produto e diminuir sua durabilidade (Khan et al., 2020). Para inibir ou retardar o crescimento microbiano, são adicionados conservantes a esses produtos. Contudo, a segurança e a toxicidade de diversos conservantes sintéticos convencionais vêm sendo questionadas, o que tem elevado a demanda por cosméticos com alternativas de origem natural ou mesmo sem conservantes (*preservative-free*) (Alvarez-Rivera et al., 2018).

Nesse cenário, ingredientes multifuncionais com atividade antimicrobiana, como a etilhexilglicerina (EHX), têm sido estudados para uso como agentes de preservação. A EHX, conhecida por suas propriedades emolientes e umectantes, tem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano e potencializar a eficácia de conservantes tradicionais, como o fenoxietanol (FX) (Leschke et al., 2008). Estudos indicam que, por agir como um surfactante, a EHX afeta a tensão interfacial nas membranas celulares dos microrganismos, o que permite uma melhor penetração de outros compostos antimicrobianos, potencializando-os (Leschke et al., 2008; Aerts et al., 2016).

Apesar das evidências de sua atividade contra microrganismos, há poucos estudos científicos que avaliam sua eficácia conservante em formulações cosméticas. Além disso, a substância não consta na RDC N° 528, de 2021, como um conservante de uso permitido em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes no Brasil (Anvisa, 2021).

Portanto, o presente estudo objetiva avaliar a atividade antimicrobiana da EHX, utilizada de forma isolada e em associação com o conservante tradicional FX, em formulações de emulsão aniônica. A atividade antimicrobiana foi investigada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e pela realização do Teste De Desafio de Conservantes (*Challenge test*) contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Adicionalmente, a estabilidade das formulações foi avaliada, uma vez que os conservantes estudados podem apresentar incompatibilidade em emulsões aniônicas devido à interação com os íons do surfactante, o que pode levar à separação de fases e à perda de eficácia do conservante (Kobierski et al., 2011; Dayan, 2016).

2. METODOLOGIA

2.1. ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado para determinar a menor concentração de FX e EHX capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Utilizando água estéril como diluente, diferentes concentrações dos conservantes foram testadas separadamente em placas de 96 poços.

As bactérias foram cultivadas em caldo Mueller Hinton e a levedura *C. albicans* em meio RPMI 1640, com concentrações finais de 5×10^5 UFC/mL e 5×10^2 UFC/mL, respectivamente. Após incubação a 37°C por 24h (bactérias) e 48h (levedura), a absorbância das placas bacterianas foi lida em espectrofotômetro a 660 nm e, após coloração com resazurina a 0,01%, novamente a 570 nm. Para a cepa fúngica, as leituras foram feitas a 570 nm, antes e depois da coloração.

2.2. DESENVOLVIMENTO DE EMULSÃO ANIÔNICA

As emulsões cosméticas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Barzotto et al. (2009). A fase oleosa foi vertida lentamente sobre a fase aquosa, ambas pré-aquecidas a 70°C , sob agitação constante. Após o resfriamento da emulsão e o alcance da viscosidade adequada, os conservantes foram incorporados.

Para este estudo, foram desenvolvidos quatro grupos de emulsões aniônicas: controle (sem conservante), uma formulação com 0,5% de FX, outra com 0,7% de EHX e uma quarta com a associação de ambos conservantes a 0,25% cada.

2.3. TESTE DE DESAFIO DE CONSERVANTES

2.3.1. PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Previamente à execução dos testes, os inóculos microbianos foram padronizados. A concentração das suspensões foi inicialmente ajustada em espectrofotômetro para uma absorbância de 0,1, correspondendo a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL para bactérias (a 660 nm) e 1×10^6 UFC/mL para fungos (a 530 nm). Para confirmar este valor, realiza-se uma contagem de colônias em placas após diluição seriada e incubação em condições apropriadas para cada microrganismo. O resultado do cálculo das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) deve ser próximo à concentração determinada pela absorbância para validar o inóculo.

2.3.2. TESTE PRELIMINAR DE VALIDAÇÃO DO NEUTRALIZANTE

O teste de validação do neutralizante é um procedimento preliminar essencial ao teste de desafio, realizado para garantir que a substância neutralizante inibe eficazmente a ação do conservante sem ser tóxica para os microrganismos. O ensaio, baseado no capítulo <1227> da *United States Pharmacopeia* (USP), utiliza três grupos experimentais principais: (1) um contendo o produto cosmético com o neutralizante, (2) um controle apenas com o neutralizante e (3) um controle de viabilidade microbiana, em que os três são contaminados com suspensão microbiana à 1×10^2 UFC/mL. A eficácia foi avaliada comparando a recuperação de microrganismos do grupo com produto com o grupo controle de neutralizante. A não toxicidade do neutralizante foi verificada ao comparar sua recuperação com o grupo de viabilidade. Para que o neutralizante seja considerado válido para o uso, a recuperação microbiana em ambas as comparações deve ser de, no mínimo, 50%.

2.3.3. TESTE DE DESAFIO

O teste de desafio de conservantes (*Challenge test*) foi realizado para avaliar a eficácia do FX e da EHX nas emulsões, seguindo os critérios do capítulo <51> da USP. No ensaio, as formulações são contaminadas com altas concentrações de bactérias (1×10^6 UFC/mL) e fungos (1×10^5 UFC/mL) e armazenadas em temperatura ambiente. Em intervalos de 0, 7, 14 e 28 dias, amostras são coletadas, diluídas em um agente neutralizante e plaqueadas para a contagem de microrganismos sobreviventes. O critério de eficácia exige uma redução na contagem bacteriana de no mínimo 2,0 log em 14 dias, e sem aumento em 28 dias, enquanto para leveduras não deve ocorrer aumento em relação à contagem inicial em 14 e 28 dias.

2.4. ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

O estudo foi realizado de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004). As amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa, a 40 ± 2 °C; à refrigeração em geladeira, a 5 ± 2 °C; à exposição à radiação luminosa (luz solar ambiental); e por fim, ao abrigo da luz em temperatura ambiente (20 a 25°C). A avaliação das amostras ocorreu nos intervalos de 0, 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Foram analisadas as características organolépticas (separação de fases, precipitação, cor e odor) e físico-químicas (pH). A emulsão controle (sem conservantes) foi mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os resultados do teste de CIM, presentes nas Tabelas 1 e 2, foram realizados em duplicata e em dias diferentes. Os dados mostram que tanto a EHX quanto o FX inibiram o crescimento de todas as cepas testadas. Ambos os compostos apresentaram igual eficácia contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. No entanto, a EHX demonstrou uma atividade superior contra as demais cepas, sendo duas vezes mais potente que o FX contra *S. aureus* e quatro vezes mais potente contra a levedura *C. albicans*.

CIM EHX			CIM FX		
Cepas	Resultado 1 [ug/mL]	Resultado 2 [ug/mL]	Cepas	Resultado 1 [ug/mL]	Resultado 2 [ug/mL]
<i>E. coli</i>	2.000	2.000	<i>E. coli</i>	2.000	2.000
<i>S. aureus</i>	8.000	8.000	<i>S. aureus</i>	16.000	16.000
<i>P. aeruginosa</i>	8.000	8.000	<i>P. aeruginosa</i>	8.000	8.000
<i>C. albicans</i>	4.000	4.000	<i>C. albicans</i>	16.000	16.000

Tabela 1. Resultados da CIM para EHX.

Tabela 2. Resultados da CIM para FX.

3.2. TESTE DE DESAFIO DE CONSERVANTES

3.2.1. PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Os resultados da Tabela 3 demonstram que a padronização dos inóculos foi bem-sucedida. As concentrações em UFC/mL, obtidas por contagem em placa para as cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, foram consistentes com os respectivos valores de referência. Isso valida o método de ajuste por absorbância e confirma que os inóculos estavam adequados para os ensaios subsequentes.

Cepas	Absorbância do inóculo	Comprimento de onda	Diluição	Contagem	UFC/mL	Referência
<i>E. coli</i> ATCC	0,118	660 nm	1:100.000	240	$2,4 \times 10^8$	1×10^8
<i>S. aureus</i>	0,135	660 nm	1:100.000	56	$0,56 \times 10^8$	1×10^8
<i>P. aeruginosa</i>	0,101	660 nm	1:100.000	240	$2,4 \times 10^8$	1×10^8
<i>C. albicans</i>	0,163	530 nm	1:1.000	45	$0,45 \times 10^6$	1×10^6

Tabela 3. Concentrações de inóculos determinadas por espectrofotometria e contagem de UFC/mL.

3.2.2. TESTE PRELIMINAR DE VALIDAÇÃO DO NEUTRALIZANTE

O teste de validação do neutralizante para a cepa *C. albicans* foi realizado para garantir que a ação dos conservantes seria efetivamente inibida durante a análise, sem que o próprio neutralizante fosse tóxico para a levedura. Para isso foi utilizado o meio Sabouraud Dextrose caldo + 0,7% de lecitina de soja + 2% de tween 80 como meio neutralizante e Sabouraud Dextrose ágar + 0,7% de lecitina de soja + 2% de tween 80 como meio ágar de recuperação.

Para a avaliação da eficácia, comparou-se a recuperação microbiana em amostras da emulsão contendo os conservantes (Grupo 1) com um controle contendo apenas o neutralizante e o inóculo (Grupo 2). Os resultados foram os seguintes: a formulação com 0,5% de FX obteve 76,88% de recuperação; a formulação com 0,7% de EHX obteve 78,75% de recuperação; e a formulação com a mistura de 0,25% de FX e 0,25% de EHX obteve 120,00%. Como todos os valores de recuperação foram superiores ao critério mínimo de 50%, o neutralizante foi considerado eficaz. Já para a avaliação da não toxicidade, comparou-se a recuperação do Grupo 2 com o controle de viabilidade microbiana (Grupo 3). A recuperação no grupo com neutralizante foi de 84,75% em relação ao controle. Este valor, também acima de 50%, confirma que o neutralizante não apresenta toxicidade para a cepa de *C. albicans*.

Os testes para os demais microrganismos serão finalizados para a apresentação no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp.

Grupos Experimentais	Amostras	UFC/mL	% Recuperação
(1)	Emulsão Aniônica FX 0,5%	$6,15 \times 10^5$	76,88
	Emulsão Aniônica EHX 0,7%	$6,30 \times 10^5$	78,75
	Emulsão Aniônica FX 0,25% + EHX 0,25%	$9,60 \times 10^5$	120,00
(2)	Controle de Neutralizante	$5,00 \times 10^5$	84,75
(3)	Controle de Viabilidade Microbiana	$5,90 \times 10^5$	100,00

Tabela 4. Resultado da contagem de UFC/mL para validação do neutralizante com *C. albicans*.

3.2.3. TESTE DE DESAFIO

O teste de desafio encontra-se em andamento para a cepa *C. albicans*. A análise completa dos dados será concluída a tempo para a apresentação no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp. Até o momento, os resultados parciais obtidos no sétimo dia do experimento, conduzido em triplicata, não demonstram aumento da contagem inicial de leveduras.

3.3. ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

A análise de estabilidade das emulsões demonstrou que, ao longo de 90 dias, todas as formulações mantiveram suas características organolépticas (cor, odor, separação de fases) estáveis. No entanto, apresentaram certa instabilidade química, evidenciada por variações no pH.

Houve uma tendência de elevação do pH em todas as emulsões, como demonstrado na Figura 1, especialmente sob estresse de calor e luz. A formulação contendo apenas EHX foi a que apresentou maior instabilidade de pH. Em contrapartida, a combinação de FX e EHX resultou na formulação com maior estabilidade de pH entre as testadas.

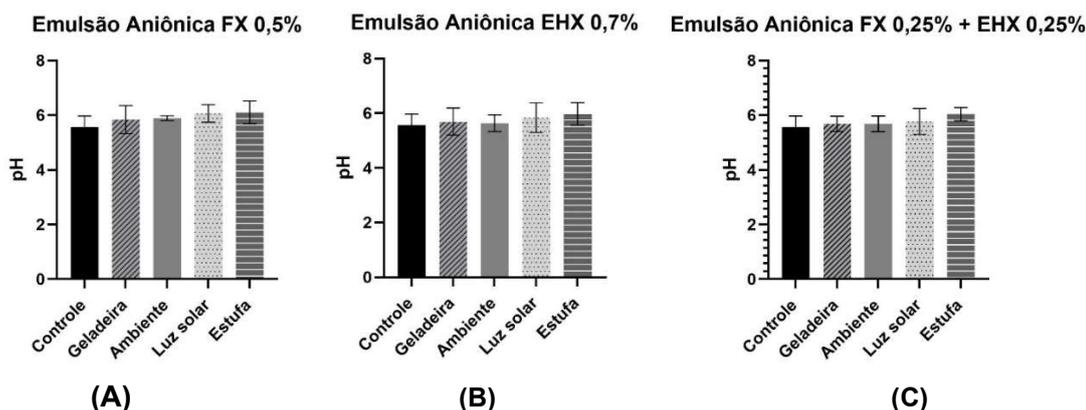


Figura 1. Média \pm desvio padrão dos valores obtidos de pH ao longo de 90 dias em: (A) emulsão aniônica FX 0,5%; (B) emulsão aniônica EHX 0,7%; e (C) emulsão aniônica FX 0,25% + EHX 0,25%.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que a EHX possui notável atividade antimicrobiana *in vitro*, superando o conservante tradicional FX na inibição de *S. aureus* e *C. albicans*. Os testes preliminares, como a padronização dos inóculos para todas as cepas e a validação do neutralizante para *C. albicans*, foram bem-sucedidos, validando a metodologia. É importante ressaltar que os ensaios de validação de neutralizante e de desafio para as cepas bacterianas ainda estão em andamento, assim como o teste de desafio para *C. albicans*.

Apesar da eficácia antimicrobiana já observada, a análise de estabilidade revelou que a formulação contendo apenas EHX apresentou maior instabilidade química, evidenciada por variações de pH. Em contrapartida, a associação da EHX com o FX resultou na formulação com a maior estabilidade de pH entre as emulsões testadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Aerts, O., Verhulst, L., Goossens, A. Ethylhexylglycerin: a low-risk, but highly relevant, sensitizer in “hypoallergenic” cosmetics. *Contact Dermatitis*, 74(5), 281–288, 2016.
2. Alvarez-Rivera, G., Llompart, M., Lores, M., Garcia-Jares, C. Preservatives in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods. In *Analysis of cosmetic products* (pp. 175-224), 2018.
3. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília, v.1, p.52, 2004.
4. ANVISA. RDC nº 528, de 4 de agosto de 2021. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa.
5. Barzotto, I. L., Oliveira, S. M. M., Tavares, B., & Dallabrida, S. Estabilidade de emulsões frente a diferentes técnicas de homogeneização e resfriamento. *Visão Acadêmica*, 10(2), 2009.
6. Dayan, N. *Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide*. John Wiley et Sons, Incorporated, 2016.
7. Khan, Y.H., Rasheed, M., Alotaibi, N.H., Bukhari, S.N.A., Mallhi, T.H. Role of Microbial Degradation on Drug Stability. Em: Akash MSH, Rehman K. (eds) *Drug Stability and Chemical Kinetics*. Springer, Cingapura, 2020.
8. Kobierski S, Ofori-Kwakye K, Müller RH, Keck CM. Resveratrol nanosuspensions: interaction of preservatives with nanocrystal production. *Pharmazie*, 2011. Dec;66(12):942-7. PMID: 22312699.
9. Leschke, M., Siegert-Schülke, W., Mayr, G. P. Boosting efficacy of preservatives. *Personal Care*, 1-4, 2008.
10. USP, United States Pharmacopeia. <51> Antimicrobial Effectiveness Testing. USP 39- NF 34, p. 67-69. Rockville, MD, USA. 2016.
11. USP, United States Pharmacopeia. <1227> Antimicrobial Effectiveness Testing. USP 29- NF 24, p. 67-69. Rockville, MD, USA. 2016.