

# **AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) E CONSERVANTES QUÍMICOS UTILIZADOS EM BASES COSMÉTICAS**

<https://doi.org/10.5281/zenodo.15530398>

## **COMPARATIVE EVALUATION OF ANTIMICROBIAN ACTIVITY OF ALECRIM OIL (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) AND CHEMICAL CONSERVATIVES USED IN COSMETIC BASES**

MATOS, JANARA DE CAMARGO, MESTRA\*  
CRUZ, NINA ROSA SANTOS, FARMACÊUTICA E TECNÓLOGA\*

\* Faculdade de Tecnologia de Praia Grande  
Curso de Tecnologia em Processos Químicos  
Pça. 19 de Janeiro, 144, Boqueirão, Praia Grande / SP, CEP: 11700-100  
Fone (13) 3591-1303  
[janara.matos@fatecpg.com.br](mailto:janara.matos@fatecpg.com.br)

### **RESUMO**

A contaminação microbiana tem sido um dos problemas mais importantes da indústria cosmética, uma vez que pode abrigar microrganismos potencialmente patogênicos à saúde humana. A escolha das substâncias com atividade antimicrobiana que serão incorporadas aos cosméticos para prevenir a contaminação deve ser feita de forma criteriosa, em concentrações adequadas que garantam eficácia e segurança. Os conservantes químicos disponíveis no mercado apresentam, sem exceção, algum risco de hipersensibilidade e, por isso esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de compostos naturais com atividade antimicrobiana com o propósito de reduzir ou substituir conservantes químicos tradicionais. Os óleos essenciais transformaram-se em géis, cremes, loções e hoje, estudos demonstram o seu possível uso como agentes conservantes naturais. Este trabalho tem o objetivo de verificar se o óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é eficaz como conservante para bases cosméticas comparado aos conservantes químicos metil e propil parabenos. O método utilizado foi o teste de difusão em ágar onde utilizaram-se diferentes concentrações dos conservantes contra a bactéria *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans*. Os resultados indicaram que o óleo essencial de alecrim apresenta potencial intermediário de atividade bacteriostática, uma vez que produziu halos de inibição, porém menores do que os produzidos pelos parabenos. A pesquisa apresentou resultados importantes, embora sejam necessários estudos mais detalhados sobre rendimento, custo de produção e desempenho com outras concentrações desse óleo, para elucidar sua verdadeira bioatividade, seu potencial terapêutico e sua utilidade clínica.

**PALAVRAS-CHAVE:** conservantes, óleos essenciais, atividade antimicrobiana.

### **ABSTRACT**

*Microbial contamination has been one of the most important problems of the cosmetic industry, since it may contain microorganisms potentially pathogenic to human health. The choice of substances with antimicrobial activity that will be incorporated into cosmetics to prevent contamination must be made in a judicious manner, in adequate concentrations that guarantee efficacy and safety. Chemical preservatives available on the market have, without exception,*

*some risk of hypersensitivity and therefore efforts have been directed towards the development of natural compounds with antimicrobial activity for the purpose of reducing or replacing traditional chemical preservatives. The essential oils have become gels, creams, lotions and today, studies demonstrated their possible use as natural preservative agents. This work aims to verify if the oil of alecrim (*Rosmarinus officinalis*) is effective as preservative for cosmetic bases compared to chemical preservatives methyl and propyl parabens. The method used was the agar diffusion test where different concentrations of the preservatives were used against *Escherichia coli* bacteria and the fungus *Candida albicans*. The results indicated that alecrim essential oil has an intermediate potential of bacteriostatic activity, since it produced inhibition halos, but smaller than those produced by parabens. The research presented important results, although more detailed studies on yield are required, to check cost of production and performance with other concentrations of this oil to elucidate its true bioactivity, its therapeutic potential and its clinical utility.*

**KEY-WORDS:** *preservatives, essential oils, antimicrobial activity.*

## INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de cosmético é o segundo maior do mundo e tem apresentado resultados positivos nos últimos 13 anos, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC, 2013). Em 2013, as vendas de cosméticos alcançaram US\$ 48,7 bilhões. (BRAZILIENSE, 2013)

Aproveitando este mercado em expansão, as indústrias cosmética, farmacêutica e de manipulação se fazem presentes, na busca de ingredientes diferenciados, naturais e competitivos que garantam a satisfação e a qualidade microbiológica, sendo forçadas a adotar tecnologias de produção limpas, econômicas e ambientalmente corretas, buscando o uso de fontes alternativas, que garantam a mesma eficácia e eficiência daqueles já tradicionalmente utilizados em processos farmacêuticos.

A indústria, assim como, a farmácia, é responsável pelo produto que manipula, conserva, dispensa e transporta, por isso, a escolha das substâncias com atividade antimicrobiana que serão incorporadas a seus cosméticos, para prevenir a contaminação microbiana durante a produção, a armazenagem e uso diário do consumidor, deve ser feita de forma criteriosa, com concentrações adequadas, seguindo os requisitos de compatibilidade física e química dos componentes de cada formulação, os parâmetros de segurança terapêutica pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira e as normas de qualidade, orientadas pelas RDC nº 33/00, RDC nº 67/07, RDC nº 17/10.

Sabe-se que hoje, mais de 90% dos consumidores brasileiros buscam ingredientes naturais quando vão comprar cosméticos e mais de 80% deles procuram selos éticos e

ambientais e querem saber a origem desses componentes (SEBRAE, 2008). Estes dados evidenciam a crescente preocupação da sociedade com a qualidade dos processos e produtos colocados no mercado, bem como, a segurança destes, para o homem e o meio ambiente.

Além esta nova tendência de mercado, pesquisas como a de Silva (2008) e Artus (2011), tem demonstrado que os conservantes disponíveis no mercado apresentam, sem exceção, algum risco de hipersensibilidade e, por isso esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de compostos naturais com atividade antimicrobiana com o propósito de reduzir ou até mesmo substituir o conservante tradicional. Neste contexto, os óleos essenciais foram descobertos, e crescentemente testados, como potenciais agentes conservantes naturais.

Este trabalho procura atender às expectativas do mercado cosmético, que busca formulações mais naturais, com menor potencial de toxicidade e equivalente proteção microbiológica ao questionar se o óleo essencial de alecrim é realmente eficaz como conservante farmacêutico para uso em bases cosméticas, em comparação a dois conservantes químicos tradicionalmente usados em cosméticos.

## 1. COSMÉTICOS

Cosméticos, Produtos de Higiene e Perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, como o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado. (ANVISA, 2003, p.3)

O mercado brasileiro de produtos cosméticos vem tomando, a cada dia, uma “fatia” maior do mercado em relação à economia nacional. Segundo a ABIHPEC (2013), nos últimos seis anos este setor apresentou um crescimento de 75%, contra 10% da economia brasileira. Isto se deve tanto ao aumento do poder aquisitivo, quanto ao aumento das exigências do consumidor e acirramento da competição no mercado.

Deste modo, pode-se afirmar que as mais de 5,8 mil farmácias de manipulação brasileiras (CFF, 2013) atuam num setor de saúde extremamente competitivo e sensível, uma vez que o mercado exige além de uma excelente qualidade em seus produtos, um preço extremamente competitivo em relação aos produtos industriais. (AMARAL e VILELA, 2003)

Diante do fato do uso de cosméticos e dermocosméticos representarem um importante segmento do mercado farmacêutico brasileiro, a ANVISA, por meio da Resolução nº 33/2000,

instituiu as Boas Práticas de Manipulação (BPM) em Farmácias, buscando estabelecer rígidos parâmetros de qualidade em todas as etapas de fabricação de um produto manipulado de forma magistral. Enquanto que, a RDC nº 481/99 considera a necessidade de estabelecer parâmetros para controle microbiológico de produtos cosméticos, bem como aprimora as ações de controle de produtos sujeitos a Vigilância Sanitária e às ações de proteção ao consumidor. (BRASIL, 1999)

Entretanto, apesar dos cuidados, todos os produtos estão sujeitos à contaminação microbiana, já que o crescimento dos mesmos depende de diversos fatores químicos e físicos, que inclui a disponibilidade de água, a composição, a temperatura de estocagem e a presença ou não de substâncias químicas antimicrobianas. Assim, para garantir a qualidade de produtos cosméticos é necessária a incorporação de conservantes. Estas substâncias, possuem atividade antimicrobiana, e são incorporados nos cosméticos em pequena concentração durante o processo de fabricação, para prevenir a contaminação microbiana na fabricação, armazenagem e uso diário pelo consumidor.

Para evitar o uso indiscriminado de conservantes, a ANVISA instituiu a Resolução nº 162/97 que lista todos os conservantes permitidos para uso em cosméticos.

## **2. AGENTES CONTAMINANTES DE PRODUTOS COSMÉTICOS**

Qualquer alteração nas características físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas ou toxicológicas dos medicamentos ou cosméticos que extrapolem os limites aceitáveis e pré-estabelecidos, coloca em risco a eficácia dos produtos e a segurança dos consumidores.

A presença de contaminantes microbianos pode resultar em alterações físico químicas do produto, comprometendo sua estabilidade. Estas alterações, ainda que não afetem o teor do princípio ativo, podem se manifestar pela mudança de cor, separação de fases, aparecimento de odor desagradável e mudanças nos valores de pH. Portanto, mesmo em produtos não-estéreis há necessidade de se estabelecer padrões quali-quantitativos de microrganismos presentes na amostra, respeitando-se um limite pré-especificado de carga microbiana a fim de assegurar a estabilidade do produto durante o prazo de validade, garantindo inocuidade e eficácia terapêutica ao paciente.

A ANVISA estabelece os parâmetros para controle microbiológico de cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes e os subdivide em dois tipos:

- 1) produtos infantis, para área dos olhos e que entram em contato com mucosas;
- 2) demais produtos susceptíveis à contaminação.

Para o tipo 1 a contagem de microrganismos mesófilos totais aeróbios, não pode ser superior a  $10^2$  UFC/g ou mL de produto. Já para o tipo 2 esse limite é de  $10^3$  UFC/g ou mL de produto (BRASIL, 1999).

Um produto pode ser considerado estável do ponto de vista microbiológico se mantém a esterilidade ou a resistência ao crescimento microbiano de acordo com os requisitos especificados. A estabilidade microbiológica do produto farmacêutico é uma medida da sua resistência ao crescimento microbiano, bactérias e fungos, proveniente dos insumos e do ambiente durante a obtenção, estocagem e uso.

Os estudos de estabilidade têm por objetivo gerar evidências sobre como varia a qualidade de um fármaco ou de um medicamento em função do tempo, diante de uma série de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz.

A contaminação microbiana tem sido um dos problemas mais importantes da indústria cosmética, pois estes produtos são reconhecidos por serem substratos para a sobrevivência e desenvolvimento de uma ampla variedade de microrganismos, já que possuem alguns nutrientes que facilitam o crescimento, tais como: lipídeos, polissacarídeos, álcool, proteínas, aminoácidos, glicosídeos, esteroides, peptídeos e vitaminas. (AMARAL, 2010)

Os produtos cosméticos estão sujeitos à contaminação com diversos microrganismos, potencialmente patogênicos à saúde humana, dentro deles, destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e as Enterobactérias, *Escherichia coli* e *Salmonella spp* e, entre os fungos e leveduras, a *Candida albicans*. (MULLER, 2008)

Em 1999, o Ministério da Saúde instituiu a Resolução nº 481 de 23/09/99, com intuito de estabelecer os limites máximos de carga microbiana em produtos cosméticos. Segundo a resolução, por grama ou mililitro é permitido até 100.000 microrganismos viáveis, 10.000 leveduras ou fungos filamentosos e 10.000 enterobactérias. Os produtos não devem conter *Salmonella sp.*, *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e fungos do gênero *Aspergillus*. (BRASIL, 1999)

## 2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria em formato de bacilo, Gram negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Por ser uma bactéria presente em alimentos e água contaminados

com fezes, a *E. coli* é utilizada para medir o nível de contaminação por fontes fecais, sendo utilizado como indicador de higiene. (ARAUJO, 2013)

A *Escherichia coli* é o microrganismo mais estudado em todo o mundo, sendo a bactéria mais isolada no laboratório clínico de microbiologia e a maior causa de infecções urinárias. Isolada de diversos outros sítios do corpo humano, causando patologias como pneumonias, meningites, infecções intestinais e muitas outras. Como parte da microbiota fecal normal humana, esta bactéria tem um papel crucial na área de contaminação fecal de alimentos. Algumas cepas patogênicas de *E. coli* podem causar diarreias graves em todos os grupos etários, produzindo uma potente endotoxina. O tratamento com antimicrobianos destes pacientes infectados é obrigatório, pois caso contrário, a infecção pode levar o indivíduo à morte. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008)

As cepas patogênicas extraintestinais podem ocasionar infecção urinária, pneumonias, osteomielite e meningite do recém-nascido.

## **2.2 *Candida albicans***

A *Candida sp* é um fungo diplóide e polimórfico responsável pelo desenvolvimento de várias patologias. Apresenta-se na forma de micélio e hifa, porém mantém a morfologia de hifa na maioria das vezes, exibindo a característica de pseudomicélio em certos ambientes nutricionais. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008)

Em condições normais, este fungo está presente nos humanos como um organismo comensal, sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais à sua saúde, sendo habitante normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização na mucosa vaginal, sendo *Candida albicans* a espécie prevalente. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008) Imunossupressão, debilidade orgânica, entre outros fatores, pode tornar o fungo patogênico, resultando em uma grave infecção sistêmica.

## **3. FORMAS DE CONTAMINAÇÃO PRODUTOS COSMÉTICOS**

A microbiologia dos cosméticos é complexa devido à ampla gama de fórmulas, processos de produção e hábitos de uso do consumidor. O conhecimento da flora microbiana contaminante do produto requer o constante monitoramento de matérias-primas e processos.

Para real conservação dos produtos cosméticos dentro de seus prazos de validade é necessário a existência de uma manipulação correta e também critérios adequados para armazená-los. Quando se utiliza as mãos para coletar cremes em potes e tubos, estas precisam ser bem lavadas. Espátulas que não forem higienizadas a cada uso são também fontes potenciais de contaminação. Todos os cosméticos sempre devem ser bem guardados, ao abrigo da luz solar e calor e de preferência em suas embalagens originais, para que se garanta estabilidade e proteção ao produto manipulado. (ANVISA, 2004)

Essa contaminação pode ocorrer durante o processo de fabricação ou durante o uso, visto que, o usuário pode representar uma fonte de propagação, inoculando microrganismos durante o uso do produto farmacêutico e cosmético. Quando há o uso inadequado dos produtos, perde-se a garantia do prazo de fabricação concedida, obrigatoriamente, pelas empresas. Desta maneira, é de vital importância a leitura das instruções de conservação e uso nos rótulos dos cosméticos.

Durante o processo de produção, as principais fontes de contaminação incluem água, ar, matérias-primas, equipamentos, utensílios, substâncias e/ou produtos para limpeza e sanitização, bem como os responsáveis pelo processo de produção e o ambiente de produção.

Uma fonte indireta de contaminação é a falta de treinamento adequado ao pessoal de produção e de apoio em relação às práticas de higiene e limpeza requeridas na fabricação de produtos cosméticos e afins. (MULLER, 2008)

Esta contaminação é significativa, pois estes podem transportar *Staphylococcus aureus* como parte da microbiota normal. Ou ainda (*Salmonella* e *Escherichia coli*), microrganismos relacionados à dependência dos hábitos de higiene desses funcionários. (FIRMINO et al, 2011)

#### **4. CONSERVANTES**

Conservantes são substâncias adicionadas a produtos cosméticos, farmacêuticos, de limpeza e alimentícios com o objetivo de inibir o desenvolvimento de microrganismos, durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto. (BRASIL, 1997)

Os conservantes têm como alvo bactérias, bolores e leveduras. Eles são normalmente utilizados em concentrações muito baixas, ou seja, menos de 1% da formulação, e são dirigidos a espécies como *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp, *Serratia* spp. e *Aspergillus niger*. (ARAÚJO, 2013)

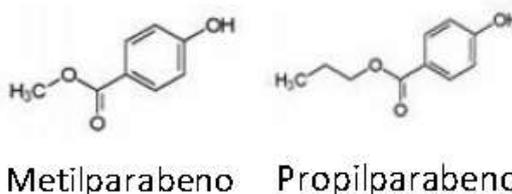
Os conservantes por definição são considerados substâncias intrinsecamente tóxicas e, no caso de creme corporal, onde a pele é o órgão de maior exposição há uma preocupação relacionada diretamente com a possibilidade de absorção.

A exposição a um agente conservante pode ocorrer por meio da ingestão, inalação ou permeação cutânea, porém sendo este uma molécula biologicamente ativa, o simples contato com a pele pode desencadear uma irritação ou sensibilização de contato. Em relação aos produtos cosméticos, estima-se que aproximadamente 12% da população apresenta efeitos adversos a produtos cosméticos, especialmente reações alérgicas, sendo que os conservantes estão em segundo lugar neste ranking, atrás apenas das fragrâncias. (AMARAL, 2010)

Um estudo realizado entre os anos de 2001 a 2006 com 1.927 pacientes com eczema crônico foi demonstrado que 1,1% dos pacientes apresentaram sensibilização por parabenos, 1,7% pela associação de metildibromoglutaronitrila com fenoxietanol e 0,7% por imidazolidinil ureia. O que demonstra a importância do estudo desses conservantes e o cuidado que se deve ter no uso desses compostos em produtos farmacêuticos e cosméticos. (ARAUJO, 2013)

Entre muitos produtos potencialmente indicados para este emprego, apenas uma parte tem sido efetivamente usada na indústria, e dentre estes, estão os parabenos (Figura 1), propilparabeno e o metilparabeno, conhecidos respectivamente como Nipazol® e Nipagin®, utilizados como conservantes antimicrobianos em produtos de higiene, farmacêuticos e cosméticos, na forma pura ou combinados, para exercer efeito antimicrobiano.

**Figura 1– Estrutura química do metilparabeno e do propilparabeno.**



Fonte: Amaral, 2010

Considerando que os conservantes disponíveis no mercado apresentam, sem exceção, algum risco de hipersensibilidade, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de compostos naturais com atividade antimicrobiana com o propósito de reduzir ou até mesmo substituir o conservante tradicional.

## 5. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais derivados vegetais são muito utilizados devido as suas propriedades antimicrobianas e por isso têm sido propostos como alternativa conservante aos agentes sintéticos.

Esses compostos, apesar de apresentarem um potencial antimicrobiano, também devem ser utilizados com cautela, pois produzem reações de hipersensibilidade, especialmente foto-alergias, quando aplicados topicamente (sobre a pele). Os óleos essenciais mais documentados pelo potencial alergênico são: óleo de melaleuca, lavanda, jasmim, limão, laranja, citronela, cássia, ylang-ylang, pau-rosa e cravo-da-índia, se utilizados fora dos padrões recomendados.

O alecrim é encontrado em terrenos rochosos e arenosos do litoral de países em volta do Mar Mediterrâneo (Espanha, Itália, Grécia, Norte da África e na Dalmácia, uma região comum à Hungria e à Áustria). No Brasil, é chamada de alecrim-de-cheiro, alecrim comum, alecrim-de-jardim e alecrim-da-horta. Pertencente à família das Labiadas (*Labiatae*), caracterizada pela presença de dois lábios nas suas flores, além de serem as folhas e o caule cobertos por pelos glandulares que produzem o óleo essencial, cuja qualidade do alecrim está diretamente relacionada com a localização (latitude), condições locais de solo, clima, altitude, boa exposição à luz solar, e época de colheita. (MARCHIORI, 2004)

**Figura 2: Flores de *Rosmarinus officinalis***



Fonte: Cpt, 2018

Na planta são encontradas as seguintes substâncias: ácidos (cítico, glicólico, glicérico, etc.), 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, heterosídeos, princípios amargos, nicotinamida, vitamina C, saponósido, colina, um diterpenóide tricíclico, o ácido carnosólico, de propriedades antioxidantes para os ácidos gordos insaturados, diversos triterpenóides ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas, epi- $\alpha$ -

amirina, betulina,  $\beta$ -sistosterina e derivados dos ácidos ursólicos e oleanólico), um alcalóide rosmaricina e o ácido rosmarínico, pineno, confeno, 1,8-cineol, monoterpênos (borneol e limoneno), acetato de bornila, cânfora, diterpênos (carnosol, rosmanol), lineol, flavonóides e saponina. (BOTSARIS, 1995)

O óleo essencial de alecrim é tônico e estimulante que atua sobre o sistema circulatório, estimulando a oxigenação do organismo. Fortalece a musculatura e a pele, apresentando também características mucolíticas, lipolíticas, antissépticas e cicatrizante. Age positivamente sobre o esgotamento físico e mental, atuando como um revigorante.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é adicionado aos alimentos com a finalidade de se acrescentar sabor e aumentar a validade dos alimentos, além do uso medicinal em prevenção e curas de afecções diversas, como falta de apetite, asma, tonsilite, obstrução nasal e constipação. (BAI et al, 2010)

Constituído essencialmente por monoterpênos, o óleo essencial de alecrim é obtido através de destilação por arraste de vapor das partes aéreas floridas. Fisicamente pode apresentar-se como líquido branco, amarelo claro, verde claro, de odor característico. Pela presença de acetato de bornila, borneol e linalol em sua composição, pode apresentar ação moderadamente irritante e tônica geral para circulação sanguínea. (BATISTUZZO et al, 2002)

Em formulações cosméticas e dermocosméticas é incorporado em concentrações entre 0,5 e 2%, a primeira para produtos faciais e, a segunda para produtos corporais e higiene pessoal. Seus componentes são responsáveis pelas ações terapêuticas como os óxidos, sendo mucolíticos, bactericidas, antissépticos; os monoterpênos, sendo fungicidas e lipolíticos; os sesquiterpênos, sendo sedativos, anti-inflamatórios, hipotérmicos; e os álcoois monoterpênos, sendo bactericidas, viricidas, fungicidas, imunoestimulantes, hipertérmicos, hipertensivos, e neurotônicos. (OLIVEIRA e AKISUE, 2005)

## **6. METODOLOGIA**

### **6.1 PREPARAÇÃO DAS BASES COSMÉTICAS**

Para a preparação das bases adotaram-se os critérios da Farmacopeia Brasileira (1988), e do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2003), e os parâmetros das Resoluções ANVISA nº 481/99, RDC nº 162/97 e RDC nº 29/2012.

O óleo puro de Alecrim foi adquirido comercialmente. As amostras de creme foram preparadas na Farmácia Essência Vital e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da FATEC Praia Grande, onde foram testadas.

As bases foram manipuladas em duas etapas, pela técnica universal de preparação de emulsões nas condições recomendadas de temperatura e velocidade de agitação, sendo estocadas em temperatura ambiente, em condições ideais de armazenagem e preparadas em diferentes concentrações, segundo sequência abaixo:

- a) amostra 1: base cosmética contendo parabenos – propilparabeno (0,05%) e metilparabeno (0,1%);
- b) amostra 2: base cosmética contendo parabenos – propilparabeno (0,15%) e metilparabeno (0,2%);
- c) amostra 3: base cosmética contendo com óleo essencial de alecrim (0,5%);
- d) amostra 4: base cosmética contendo com óleo essencial de alecrim (2%);
- e) amostra 5: sem conservante;
- f) óleo de alecrim puro.

As amostras da série A, preparadas em junho de 2014, e da série B, manipuladas em outubro de 2014, foram armazenadas em embalagens estéreis, para posteriores avaliações.

Os parâmetros avaliados foram monitorados em 14, 30, 60, 90 e 120 dias para amostras da série A e, em 7 e 14 dias para amostras da série B. A aparência e a cor dos cremes foram verificadas visualmente, o odor foi verificado por meio do método organoléptico e o pH por meio de phmetro.

## 6.2 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A escolha do melhor meio de cultura a ser utilizado nas análises foi baseada nas propriedades inibitórias de cada agente microbiano, ágar MacConkey para *E. coli* (ANVISA, 2003), e meio Ágar Potato Dextrose, para *Candida albicans*.

Foi realizado o Teste de Difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, que é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (AMARAL, 2010), como pode ser observado na figura 3.

**Figura 3: Modelo de halo de inibição formado durante o teste de eficácia do sistema conservante**



Fonte: VETLAB, 2012

A interpretação dos resultados é comparativa frente a um padrão biológico de referência e, a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco até a margem onde há crescimento de microrganismos. De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior, ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. (CORDEIRO, 2003)

As cepas de *E. coli* (cepa ATCC 25922; beta-lactamase negativa) e *Candida albicans* (cepa CCCD 002) liofilizadas foram hidratadas com aproximadamente 2,5 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Já as cepas de *Candida albicans* com 0,5 mL de NaCl 0,9%. A turbidez das culturas em crescimento com solução salina estéril foi ajustada, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland entre 0,5 e 1,0. Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a  $3 \times 10^8$  UFC/mL (ANVISA, 2003).

As suspensões foram inoculadas em placas contendo os respectivos meios de cultura apropriados para cada tipo de micro-organismo, com o auxílio de um swab estéril, deslizando-o por toda superfície do meio (ANVISA, 2003). As placas foram incubadas, a 36,5°C por 24 a 72 horas.

A eficiência antimicrobiana do óleo essencial e parabenos foram avaliadas mediante teste do halo. Em cada placa foram colocados discos de papel filtro esterilizados, contendo as amostras testadas. Identificados, no fundo da placa, o número da amostra que corresponde ao disco colocado na superfície do meio.

Os halos são medidos em milímetros usando um paquímetro ou uma régua, que é encostado na parte de trás da placa de Petri invertida.

Como halo de inibição, será considerado a área sem crescimento bacteriano detectável a olho nu. (ANVISA, 2003).

No ensaio proposto foram utilizados seis discos por placa, um de controle negativo, contendo amostra sem conservante, um disco de controle positivo, contendo Clorafenicol e, quatro contendo amostras testes. O Clorafenicol, escolhido como controle positivo, é o antibiótico utilizado em testes de difusão em ágar contendo *E. coli*. Nos testes realizados com *Candida albicans* não foi utilizado nenhum controle positivo. As análises foram feitas em duplicata para todas as amostras de cada série, e calculada a média das medidas.

## **7. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.1 BASES COSMÉTICAS**

Em todas as condições de estudo analisadas, as formulações mantiveram-se estáveis ao longo do tempo avaliado, sem qualquer oscilação significativa nos resultados, durante o período de armazenamento. As formulações avaliadas apresentaram coloração branca inicialmente, variando entre branco brilhante a branco opaco. Por não conter nenhuma essência/fragrância, o odor da formulação é classificado inicialmente como característico, em função das matérias primas utilizadas, bem como a permanência do odor característico do óleo essencial, que permaneceram inalteradas durante todo o período de avaliação. Em relação à aparência, as formulações mantiveram sua característica cremosa levemente viscosa ao longo de todas as etapas do estudo.

Durante a incorporação do óleo essencial às formulações, as características macroscópicas, como aparência, cor e odor, não foram alteradas, confirmando o êxito da pesquisa; caso contrário, sua utilização como conservante, seria inviabilizada.

### **7.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Os halos de inibição do crescimento das cepas, obtidos a partir da ação dos produtos testados, indicaram a atividade antimicrobiana das substâncias empregadas e os resultados foram avaliados a partir da média aritmética das medidas, em duplicata, dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento em milímetros (mm), onde os valores encontrados estão expostos na tabela 1 e discutidos na ordem apresentada.

**Tabela 1: Média das medidas dos halos de inibição formados frente aos micro-organismos testados**

| SÉRIE A: PREPARADAS EM JUNHO/ 2014 |                         |                         | SÉRIE B: PREPARADAS EM OUTUBRO/ 2014 |                         |                         |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| AMOSTRAS                           | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> | AMOSTRAS                             | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> |
| 1 parabeno: 0,15%                  | 16 mm (I)               | -                       | 1 parabeno: 0,15%                    | 14 mm (I)               | -                       |
| 2 parabeno: 0,35%                  | 18 mm (S)               | -                       | 2 parabeno: 0,35%                    | 17 mm (S)               | -                       |
| 3 alecrim: 0,5%                    | 11 mm (R)               | -                       | 3 alecrim: 0,5%                      | 12 mm (R)               | -                       |
| 4 alecrim: 2%                      | 13 mm (R)               | -                       | 4 alecrim: 2%                        | 15 mm (I)               | -                       |
| 5 sem conservante                  | 8 mm (R)                | -                       | 5 sem conservante                    | 13 mm (R)               | -                       |
| Óleo de alecrim puro               | 14 mm (I)               | 30 mm (S)               | Óleo de alecrim puro                 | 14 mm (I)               | 30 mm (S)               |

Legenda: S(sensível), I(intermediário), R(resistente) e - (sem formação de halo), frente ao padrão de controle positivo.

Nas análises realizadas com *E. coli*, as amostras 1 e 2, contendo parabeno como conservantes, tanto da série A quanto da série B, o halo de inibição formado caracterizou este conservante como sensível para amostra 2 e intermediário para amostra 1, frente ao microrganismo testado, confirmando que as concentrações máximas de parabeno preconizadas pela literatura fornecem melhor nível de proteção bacteriostática. (BRASIL, 2012)

O óleo essencial de alecrim promoveu inibição mais significativa do crescimento bacteriano na concentração de 2%, na amostra 4 da série B do que na série A, provavelmente pela eficácia na incorporação do óleo aos demais componentes da formulação, bem como, pelo menor tempo de ação na formulação.

Constata-se que as amostras conservadas com óleo essencial de alecrim (halos entre 11 a 15 mm) apresentaram menor halo de inibição que as amostras 1 e 2, conservadas com parabeno (halos entre 14 a 18 mm). A baixa efetividade dos óleos essenciais de alecrim pode ser atribuída às baixas concentrações utilizadas.

Estudos realizados por Packer e Luz (2007) que tiveram por finalidade avaliar produtos de origem natural, utilizando óleos de alecrim, alho, andiroba, melaleuca e própolis, quanto à sua ação frente aos microrganismos *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, utilizando a metodologia de ágar com orifício modificado, concluíram que, dentre os óleos testados o de melaleuca apresentou os melhores resultados de atividade antifúngica e bacteriostática, havendo formação de halo de inibição variando entre 10 e 60 mm quando testados com *E. coli*. Porém, atestou também que o óleo de alecrim tem um importante papel como antimicrobiano e antifúngico, devido a sua composição química, frente a *C. albicans*. A alíquota aplicada foi capaz de provocar inibição total da levedura caracterizando assim, um efeito fungistático.

Nas amostras 5, preparadas sem adição de conservantes verificou-se a formação de halos entre 8 e 13 mm, o que demonstra que os componentes utilizados na formulação cosmética também fornecem pequena proteção microbiológica, mas insuficiente para garantir a qualidade do produto até o seu prazo de validade final.

Já, quando testado puro, o óleo de alecrim, frente à *Escherichia coli* apresentou um melhor halo de inibição, se comparado as amostras com incorporação do óleo ao creme teste. Este resultado atesta a interferência do agente emulsificador, da fórmula cosmética, na susceptibilidade da bactéria ao óleo essencial podendo explicar a possível influência que este exerce sobre o crescimento bacteriano e/ou sobre a permeabilidade da membrana celular, visto que, os emulsificadores podem agir antagonicamente ou sinergicamente aos componentes ativos do óleo. Altas concentrações, por exemplo, podem aumentar a atividade antibacteriana produzindo resultados falso-positivos ou reduzir a bioatividade do óleo, esse último efeito é, possivelmente, causado pela formação de micelas que dificultariam o contato direto do óleo com os microrganismos. (NASCIMENTO et al, 2007)

A figura 4 ilustra os halos formados nas análises feitas com o óleo puro, produzindo diâmetro de 14 mm para o óleo de alecrim (A), sinalizando o óleo essencial de alecrim com atividade antibacteriana intermediária, se comparado ao halo formado no controle positivo com clorafenicol (+), de 35 mm.

**Figura 4: Halo de inibição para *Escherichia coli*, em meio contendo óleo de alecrim (esquerda - A).**



Fonte: autoria própria

Em todas as amostras testadas, o experimento confirmou uma melhor atividade e efetividade antimicrobiana naquelas preparadas com concentrações máximas dos agentes conservantes.

Já no caso dos testes com o fungo *Candida albicans*, foi verificado que não houve formação de halo de inibição, evidenciado na figura 5, onde observa-se o crescimento de fungos bem próximos aos discos. Na mesma figura à esquerda, apesar de não ser visível a formação de halo, nota-se que, em volta do disco contendo óleo de alecrim puro (A), houve um menor

crescimento de colônias de fungos, comparado ao controle negativo (-) (disco sem conservante), demonstrando que o óleo tem potencial de ação fungicida.

**Figura 5: Amostras testadas em meio contendo *Candida albicans***



Fonte: autoria própria

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as formulações cosméticas não necessitem de esterilidade, devem cumprir as exigências da legislação quanto à ausência de microrganismos específicos, a fim de se obter produtos de excelente qualidade, estabilidade e confiança, por isso, o controle da qualidade microbiológica durante as etapas do processo de fabricação é importante para avaliação dos pontos críticos de contaminação.

Diante disto, a escolha do conservante ideal deve ser cautelosa, pois o mesmo precisa ser estável, compatível com outros ingredientes da formulação, sem interferir com a cor ou odor do produto, ter amplo espectro de ação em baixa concentração, permanecer ativo em diferentes valores de pH, distribuir-se de forma apropriada em sistemas emulsionados, inativar contaminantes rapidamente, prevenindo a adaptação microbiana, além de não provocar efeitos tóxicos, irritantes e hipersensibilizantes.

Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam aplicabilidade e efetividade dos conservantes utilizados, tanto os parabeno quanto o óleo essencial, uma vez que, mantiveram a estabilidade das amostras de creme, promovendo também, a formação de halos de inibição nas amostras testadas frente à *Escherichia coli*, mesmo 120 dias após o preparo.

O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) atende aos requisitos de uma substância dotada de atividade bacteriostática, porém com eficácia menor, se comparado aos conservantes químicos a base de parabeno.

A pesquisa apresentou resultados importantes, porém, demanda estudos mais detalhados sobre rendimento e custo de produção, para elucidar sua verdadeira bioatividade,

seu potencial terapêutico e sua utilidade clínica, para se consagrar, o uso de óleos essenciais como alternativas seguras e economicamente viáveis para o mercado cosmético-farmacêutico.

Desta forma, são necessários estudos complementares relativos ao desempenho de novas faixas de concentração dos óleos essenciais testados, bem como, sobre uma melhor padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, específica para óleos essenciais, uma vez, que os testes de avaliação antimicrobiana empregados nestas pesquisas são padronizados pela NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos, que são substâncias de natureza hidrófila, sendo padronizados para esta condição.

## REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Estudo de Mercado no setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. maio, 2013. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/>> Acesso em: 27.set.2013.
- AMARAL, L.F.B. **Avaliação da eficácia antimicrobiana do monoéster de C-8 xilitol como alternativa conservante para produtos cosméticos**. 2010. 180 f. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas, SP, 2010. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000781046>. Acesso em: 27 set. 2013
- AMARAL, M.P.H.; VILELA, M.A.P. **Controle de Qualidade na Farmácia de Manipulação**. 2.ed. Juiz de Fora: UFJF, 2003.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2003. Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia\\_cosmeticos\\_final\\_2.pdf](https://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2013.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. Módulo IV. Brasília: ANVISA, 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod\\_4\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_4_2004.pdf)>. Acesso em: 02.nov.2014.
- ARAUJO, A.C.R. **Avaliação da qualidade microbiana de sabonetes comercializados em feiras de artesanato de Brasília**. 2013. 86 f. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, DF, 2013. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13018/1/2013\\_AnaCarolinaFernandesAraujo.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13018/1/2013_AnaCarolinaFernandesAraujo.pdf)>. Acesso em: 27.set.2013.

ARTUS, G. et al. Dermatite de contato alérgica: prevalência dos agentes sensibilizantes em amostra de Porto Alegre, Brasil. **Revista da AMRIGS, Porto Alegre**, n55 p. 155-159, abr.-jun. 2011. Disponível em: <[http://vidasolidaria.org.br/revista/55-02/015-PG\\_155\\_159\\_787\\_dermatite%20de%20contato....pdf](http://vidasolidaria.org.br/revista/55-02/015-PG_155_159_787_dermatite%20de%20contato....pdf)>. Acesso em: 26.ago.2013.

BAI N.; HE K.; ROLLER M.; LAI C.; SHAO X.; PAN M.; HO C. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 9, p. 5363-5367, 2010.

BATISTUZZO, J.A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário médico farmacêutico**. 2 ed. São Paulo: Tecnopress, 2002.

BOTSARIS, A.S. **Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 162 de 18 de agosto de 1997**. Aprova a lista de conservantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial da república federativa do Brasil, poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 481, de 23 de setembro de 1999**. Parâmetros para Controle Microbiológico de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=259>>. Acesso em: 30.set. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 33, de 19 de abril de 2000**. Aprova o regulamento técnico que institui as boas práticas de manipulação em farmácias. Diário Oficial da república federativa do Brasil, poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância sanitária. **RDC nº 67 de 8 de outubro de 2007**. Aprova o regulamento técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de medicamentos em farmácias e seus anexos. Diário Oficial da república federativa do Brasil, poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância sanitária. **RDC nº 17 de abril de 2010**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da república federativa do Brasil, poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 29, de 1º de junho de 2012** Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. Disponível em: <[www.portal.anvisa.gov.br/.../Resolucao+RDC+Nº+29,+de+1º+de+junho+de++2...](http://www.portal.anvisa.gov.br/.../Resolucao+RDC+Nº+29,+de+1º+de+junho+de++2...)>. Acesso em: 02.set.2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira**. 4. ed., parte 1. Brasília, 1988. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/4\\_edicao/parte1/4\\_edicao\\_part1.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/4_edicao/parte1/4_edicao_part1.pdf)>. Acesso em: 30.set.2013.

BRAZILIENSE, Correio. **Mercado de cosméticos brasileiro é o segundo no ranking global**, maio 2013. Disponível em: <<http://www.correiobraziliense.com.br/>>

app/noticia/economia/2013/05/26/internas\_economia,367965/mercado-de-cosmeticos-brasileiro-e-o-segundo-no-ranking-global.shtml>. Acesso em: 19.out.2013.

CPT. Centro de Produções Técnicas. **Medicina natural – Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)** março, 2018. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/cursos-plantasmedicinais/artigos/medicina-natural-alecrim-rosmarinus-officinalis>>. Acesso em: 10.mar.2018.

CFF. Conselho Federal de Farmácia. **Manipulação de remédios vem registrando expansão**, setembro, 2013. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/noticia.php?id=1280>>. Acesso em: 11.mar.2014.

CORDEIRO, C.F. **Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos e cosméticos**. Disponível em: <<http://propeq.ufjf.br/seminario/CDSEMINARIO2003/grad/resumos/proj130.htm>>. Acesso em: 25.ago.2013.

FIRMINO, C.R. et al. Avaliação da qualidade de bases farmacêuticas manipuladas no município de Jundiá – SP. **Revista Multidisciplinar da Saúde**. ano III, n. 05. 2011. Disponível em: <[http://www.anchieta.br/Unianchieta/revistas/saudeemfoco/pdf/RevistaMultidisciplinardaSaude\\_05.pdf#page=2](http://www.anchieta.br/Unianchieta/revistas/saudeemfoco/pdf/RevistaMultidisciplinardaSaude_05.pdf#page=2)>. Acesso em: 14.out.2013.

MARCHIORI, V. F. **Rosmarinus officinalis**. Monografia de conclusão de curso on-line da Associação Argentina de Fitomedicina. Fundação Herbarium. Julho / 2004. Disponível em: <[http://fitomedicina.org/old/archivos/rosmarinus\\_officinalis\\_romero\\_\\_\\_monografia.pdf](http://fitomedicina.org/old/archivos/rosmarinus_officinalis_romero___monografia.pdf)>. Acesso em: 10.out.2013.

MULLER, J. J. **Análise bacteriológica de cosméticos produzidos em farmácias de manipulação e provadores cosméticos de uma farmácia de dispensação da cidade de Blumenau**. 2008. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para Avaliação no Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau. Disponível em: <[http://www.bc.furb.br/docs/MO/2008/330149\\_1\\_1.pdf](http://www.bc.furb.br/docs/MO/2008/330149_1_1.pdf)>. Acesso em: 27.set.2013.

NASCIMENTO, P.F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy**, p. 108-113, Jan./Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a20v17n1.pdf>>. Acesso em: 30.ago.2013.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2.ed, São Paulo: Atheneu, 2005.

PACKER, Janaina F.; LUZ, Marisa M.S. da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy**. p. 102-107, Jan./Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a19v17n1.pdf>>. Acesso em: 27.ago.2013.

SEBRAE. Estudos de mercado /ESPM. **Cosméticos à base de produtos naturais** Relatório Completo 2008. Disponível em: <[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/F52BEDF31ED68D4A83257553006FC5A3/\\$File/NT0003DCE6.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/F52BEDF31ED68D4A83257553006FC5A3/$File/NT0003DCE6.pdf)>. Acesso em: 02.out.2013.

SILVA, A.V.A. et al. Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 44, n. 3, July/Sept. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322008000300009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322008000300009&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27.ago.2013.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VETLAB. VetLab **Medicina Laboratorial Veterinária**. Disponível em: <<http://vetlaboratorio.blogspot.com.br/2012/11/nos-ultimos-anos-diversos-autores-tem.html>>. Acesso em: 27 set. 2013.