



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021023851-8 A2

(22) Data do Depósito: 26/11/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
13/06/2023

(54) Título: FORMULAÇÃO DE SHAMPOO ANTIFÚNGICO COM EXTRATO LIPOSSOLÚVEL DO RESÍDUO DA PLANTA AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) E USO DA FORMULAÇÃO DO SHAMPOO

(51) Int. Cl.: A61K 8/9794; A61Q 5/00; A61Q 17/00.

(52) CPC: A61K 8/9794; A61Q 5/00; A61Q 17/005.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): LUCINÉIA DOS SANTOS; EDISLANE BARREIROS DE SOUZA; ISABEL CRISTINA CHERICI CAMARGO; LUISA TAYNARA SILVÉRIO DA COSTA; PEDRO DE OLIVA NETO.

(57) Resumo: FORMULAÇÃO DE SHAMPOO ANTIFÚNGICO COM EXTRATO LIPOSSOLÚVEL DO RESÍDUO DA PLANTA AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) E USO DA FORMULAÇÃO DO SHAMPOO. O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma formulação de shampoo antifúngico com extrato lipossolúvel do resíduo da planta Agave sisalana Perrine, mais conhecida como sisal, assim como o uso da dita formulação do shampoo. As tecnologias empregadas foram necessárias para: Obtenção do suco do sisal, a partir da prensagem da mucilagem, resíduo do desfibramento de suas folhas e que até o momento está sendo desprezada; desenvolvimento do extrato lipossolúvel do suco do sisal (ELSS); avaliação da toxicidade aguda do ELSS; avaliação da atividade antifúngica do ELSS contra as leveduras *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophyton*, agentes causadores de doenças do couro cabeludo e da pele; desenvolvimento de uma formulação base composta pelo tensoativo, um estabilizante de espuma e um emulsificante, que será adicionado com a finalidade de conferir estabilidade à formulação, tornando a razoavelmente estável e homogênea; desenvolvimento de um shampoo antifúngico a partir da adição à formulação do ELSS; avaliação da atividade antifúngica do shampoo com ELSS contra *Trichophyton rubrum* e avaliação da estabilidade do shampoo com ELSS.



FORMULAÇÃO DE SHAMPOO ANTIFÚNGICO COM EXTRATO LIPOSSOLÚVEL DO RESÍDUO DA PLANTA *AGAVE SISALANA PERRINE* (SISAL) E USO DA FORMULAÇÃO DO SHAMPOO

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma formulação de shampoo antifúngico com extrato lipossolúvel do resíduo da planta *Agave sisalana* Perrine, mais conhecida como sisal, assim como o uso da dita formulação do shampoo.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção demonstra a inovação no campo técnico relacionado à Indústria de fitoterápicos, sobretudo no tratamento de Dermatomicoses, doenças da pele de grande ocorrência em países de clima tropical, principalmente no Brasil.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] O Brasil é o maior produtor e exportador mundial do sisal, cujo estado com maior produção de sisal é a Bahia, que concentra 95,2% da produção nacional. Embora o sisal represente uma das poucas opções econômicas viáveis no clima semiárido do nordeste brasileiro, com a introdução no mercado da fibra sintética, sua cultura tem sofrido grandes perdas de mercado nos últimos anos por possuir baixo aproveitamento e, conseqüentemente, elevado custo. Após o desfibramento das folhas do sisal, apenas 5% de seu peso converte-se em produto rentável, ou seja, a fibra dura, usada na indústria automobilística, na produção de cordas, artesanato, entre outros produtos. O restante é descartado em forma de mucilagem – resíduos sólidos e líquidos. Além disso, a raiz do sisal é, em geral, totalmente desprezada pelos agricultores no momento de renovação de suas mudas. Diante de situações como essa, existe uma preocupação mundial quanto à busca de estratégias inovadoras para o reaproveitamento de grande perda de resíduos agrícolas. Entende-se a necessidade de reaproveitar esses resíduos para promover a sustentabilidade ambiental e o incremento social e econômico de famílias de baixa renda. Desta forma, ao agregar valor aos resíduos do sisal, mucilagem e raiz, por meio do comércio de produtos desenvolvidos a partir dos mesmos, provavelmente ocorrerá uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região sisaleira do Brasil, uma das mais

pobres do país, onde os pequenos produtores rurais dificilmente alcançam uma renda mensal de um salário mínimo.

[004] O documento BR 102016015708-0 A2, intitulado “SABONETE LÍQUIDO ANTIMICROBIANO A BASE DE ÓLEO DE PEQUI”, refere-se a um processo para a produção de um sabonete líquido antimicrobiano, no qual o óleo vegetal utilizado foi o óleo de Pequi. O sabonete líquido é obtido por reação direta entre óleo de Pequi e um álcali. Este sabonete apresenta uma textura inigualável, mantém a umidade da pele sem causar ressecamento, apresenta uma viscosidade intensa e adequada ao uso sem a necessidade de se acrescentar sais e o custo de produção é mais baixo que o do sabonete líquido sintético. Além de o óleo de Pequi ser um antimicrobiano natural ele possui atividade antifúngica. Ao avaliar-se a Concentração Inibitória Mínima dos sabonetes líquidos com Óleo de Baru, Buriti e Pequi, o microrganismo que apresentou maior resistência, independentemente da formulação, foi a *P. aeruginosa*, apresentando sensibilidade na concentração de 1290,1 µg/mL para o sabonete líquido de óleo de Baru, 1250,0 µg/mL para o sabonete líquido de óleo de Buriti e 1350,3 µg/mL para o sabonete líquido de óleo de pequi. Comparando com o sabonete líquido padrão (3000,0 µg/mL), o *P. aeruginosa* demonstrou ser a bactéria mais resistente à atividade dos Óleos de Baru, Buriti e Pequi, presente no sabonete líquido. Em relação as análises físicas e químicas, no parâmetro densidade, os três sabonetes foram iguais estatisticamente, com média de 1,028. Para a análise de pH, o sabonete de óleo de Buriti diferiu-se dos demais, obtendo o menor valor (5,87). Por fim, em relação a viscosidade, os sabonetes de Buriti (60,35) e Pequi (60,73), foram iguais estatisticamente. Logo, a inclusão dos óleos extraídos dos frutos do cerrado, na produção de sabonetes líquidos, é uma alternativa viável para ser utilizado como antisséptico na higienização de mãos de manipuladores de alimentos.

[005] O documento BR102016015731-5, intitulado “SABONETE LÍQUIDO ANTIMICROBIANO A BASE DE ÓLEO DE BARU” refere-se a um processo para a produção de um sabonete líquido antimicrobiano, no qual o óleo vegetal utilizado foi o de Baru. O sabonete líquido é obtido por reação direta entre óleo de Baru e um álcali. Este sabonete apresenta uma textura inigualável, mantém a umidade da pele sem

causar ressecamento, apresenta uma viscosidade intensa e adequada ao uso sem a necessidade de se acrescentar sais e o custo de produção é mais baixo que o do sabonete líquido sintético. Além de o óleo de Baru ser um antimicrobiano natural ele possui atividade antioxidante e anti-inflamatória.

[006] O documento BR102016015728, intitulado “SABONETE LÍQUIDO ANTIMICROBIANO A BASE DE ÓLEO DE BURITI”, descreve um processo para a produção de um sabonete líquido antimicrobiano, no qual o óleo vegetal utilizado foi o óleo de Buriti. O sabonete líquido é obtido por reação direta entre óleo de Buriti e um álcali. Este sabonete apresenta uma textura inigualável, mantém a umidade da pele sem causar ressecamento, apresenta uma viscosidade intensa e adequada ao uso sem a necessidade de se acrescentar sais e o custo de produção é mais baixo que o do sabonete líquido sintético. Além de o óleo de Buriti ser um antimicrobiano natural ele possui um alto teor de carotenóides. Após analisar os resultados, estatisticamente, percebe-se que, em todas as concentrações, tanto na inibitória mínima, como na bactericida mínima e na fungicida mínima, o óleo que foi mais resistente ao crescimento de microrganismos foi o de buriti, sendo ele o que obteve os menores resultados, com maior atividade antimicrobiana, frente aos estudados.

[007] O documento BRPI0804288-8 A2, intitulado “EXTRATOS DE *LIPPIA SALVIAEFOLIA CHAM.*, FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÕES E SEU USO”, refere-se aos extratos de folhas de *Lippia salvia efolia Cham.*, suas frações ativas, composições farmacêuticas e/ou cosméticas e seu uso como antimicrobiano natural (conservante). Em uma segunda realização, o pedido de patente apresenta formulações cosméticas e/ou farmacêuticas contendo os ditos extratos e/ou suas frações ativas. De forma geral, 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, omonoestearato de glicerila, dispersão de hidroxietilcelulose 2% p/v; como emoliente, o óleo mineral, acetato de cetila e/ou álcool de lanolinaacetilado, silicone volátil, 2-oetil-dodecanol; como umectante, propilenoglicol e/ou glicerina; e

conservantes, tais como os parabenos. As composições géis podem apresentar em sua composição agente de consistência poliméricos e/ou gelificantes, por exemplo, polímeros carbonílicos, hidroxixelulose; agentes acidificantes e/ou alcalinizantes, como a solução de hidróxido de sódio a 20% (p/v), trietanolamina; tensoativos, tais como, álcool cetoestearílico, álcoolcetílico etoxilado e/ou propoxilado, poliál de éster de ácido graxo, como umectante, tais como, propilenoglicol, sorbitol 70% e/ou glicerina; econservantes, tais como, os parabenos. 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 propilbetaína, fosfato 3-oleílico; agente neutralizante como a solução ácido 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. Em uma terceira realização a presente invenção refere-se ao uso desses extratos no preparo 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).

[008] O documento BRPI0718326A2 intitulado “FORMULAÇÕES DE CURA DE FERIDAS TÓPICAS E PROCESSO DE PREPARO DE FORMULAÇÃO DE CURA DE FERIDAS TÓPICAS”, descreve uma composição herbal que possui potentes propriedades antimicrobianas e de cura de feridas. A formulação herbal consiste de extratos aquosos de casca de neem, em uma mistura de óleos naturais junto com diversas ervas, preparados utilizando solventes aquosos e orgânicos em mistura com veículos, excipientes e adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis. Enfatiza-se o uso da casca das plantas correspondentes.

[009] O documento BR102012010743-0A2, intitulado “Composição a base de extratos vegetais e nanopartículas de sílica de alta absorção, sua formulação e uso”, consiste no emprego de nanopartículas de sílica mesoporosa capaz de carrear de forma eficiente e controlada as substâncias ativas dos extratos oleosos e aquosos de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) e Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*),

com atividades antibacteriana e antifúngica, aliado a ação hidratante e regeneradora celular, sem apresentar toxicidade.

[010] Foi verificado que os documentos apresentados no estado da técnica apresentam similaridade quanto ao propósito do presente pedido de patente de invenção, ou seja, uma formulação fitoterápica enriquecida com extrato vegetal e que apresenta propriedade antimicrobiana. Contudo, todas as formulações apresentadas utilizam extratos vegetais oriundos de outras plantas, e nenhum dos extratos foi obtido a partir de um resíduo vegetal. Ou seja, nosso produto, além de apresentar efetiva atividade antifúngica, poderá contribuir para o bem estar ambiental, econômico e social. Desta forma, não foi constatada nenhuma patente similar ao produto proposto, ou seja, um shampoo cujo material vegetal empregado trata-se de um resíduo, no caso, o resíduo do sisal. Em comparação aos outros trabalhos, os resultados obtidos em nosso estudo revelaram que na análise da toxicidade aguda, após tratamento por via oral, em dose única, o extrato lipossolúvel do sisal, nas concentrações de 2000 mg/kg, não promoveu a morte dos animais. Assim, de acordo com a Comunidade Comum Europeia este extrato não é considerado nocivo. Na avaliação da atividade antifúngica, o extrato lipossolúvel do resíduo do sisal se mostrou efetivo contra os agentes causadores de dermatomicoses. Contra *Malassezia pachydermatis* apresentou uma concentração mínima inibitória (CMI) de 125µg/mL. Para o fungo filamentoso *Tricophyton mentagrophytes* apresentou uma CMI de 250µg/mL. Para o *Tricophyton rubrum* apresentou uma CMI de 750 µg/mL. Na avaliação da atividade antifúngica do shampoo com o extrato do sisal o *Tricophyton rubrum* foi o microrganismo escolhido, por se tratar do agente causador mais frequente de dermatomicoses superficiais no Brasil e no mundo. Para o preparo do shampoo foi considerada a concentração de 1,65 g do extrato em 100 mL do shampoo base. O shampoo contendo o extrato do resíduo do sisal teve sua atividade antifúngica confirmada. Os testes de qualidade revelaram estabilidade da formulação quanto aos aspectos avaliados: cor, odor, homogeneidade, pH e viscosidade.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[011] A necessidade de se introduzir na terapêutica um novo shampoo fitoterápico, com potente ação antifúngica contra os agentes que causam as dermatomicoses, mas desprovido dos inúmeros efeitos colaterais promovidos pelos antifúngicos atualmente disponíveis no mercado. Além disso, a necessidade de agregar valor aos resíduos do sisal, por meio do comércio de produtos desenvolvidos a partir dos mesmos, para promover uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região sisaleira do Brasil, uma das mais pobres do país.

[012] Como diferencial, além de ser uma formulação que contém unicamente compostos ativos vegetais, a importância social do desenvolvimento de produtos à base do sisal poderá ser fortemente valorizada. Além disso, o Brasil é o maior produtor de sisal do mundo, e da folha do sisal atualmente só é aproveitada a fibra que corresponde a aproximadamente 5% de seu peso. Assim, como todo o resíduo restante é descartado, a fonte de matéria-prima para a fabricação do shampoo antifúngico é enorme e extremamente barata. Não existe no mercado nenhum produto similar.

[013] O shampoo desenvolvido com o sisal poderá ser utilizado no tratamento de Dermatomicoses, de grande ocorrência em países de clima tropical, principalmente no Brasil

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[014] Assim, o objetivo do presente pedido de patente de invenção é desenvolver novo shampoo fitoterápico, com potente ação antifúngica contra os agentes que causam as Dermatomicoses, mas desprovido dos inúmeros efeitos colaterais promovidos pelos antifúngicos atualmente disponíveis no mercado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[015] O presente pedido de patente de invenção será descrito de acordo com a metodologia, tabelas e figuras apresentadas. Para a preparação do shampoo antifúngico foram utilizadas as seguintes etapas:

1. Obtenção do Material de Origem Vegetal

[016] A mucilagem do sisal foi obtida com os produtores rurais do município de Valente – BA, definidos pela Secretaria da Ciência, Tecnologia e Inovação da Bahia. A mucilagem resultou do processo de desfibramento das folhas do sisal. A mucilagem

não processada foi congelada e transportada para a Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

2. Preparo do suco do sisal

[017] O suco bruto de sisal foi obtido por meio da prensagem e filtração da mucilagem resultante do desfibramento de suas folhas.

3. Preparação do extrato lipossolúvel do suco do sisal (ELSS)

[018] Nesta etapa, o ELSS resultou dos seguintes processos:

- 1) Filtração do suco do sisal em carvão ativado;
- 2) Centrifugação do suco por 20 minutos, a 18°C em 3800rpm para obtenção do precipitado;
- 3) Retirada do precipitado e secagem do mesmo em estufa a 50°C, por 5 dias, até obtenção do peso constante;
- 4) Obtenção extrato seco e posterior fracionamento por hexano. Sendo que para cada 10 gramas do extrato foram adicionados 3% de Tween 80 e 1% de DMSO e, posteriormente, a dissolução foi realizada com uma solução de água destilada e hexano na mesma proporção, a de 50% (v/v);
- 5) Agitação da solução por 90 minutos no shaker;
- 6) Após esse período a solução foi deixada em repouso por 5 dias, sendo agitada 1 vez ao dia;
- 7) A mistura então foi colocada em um funil de separação e este foi mantido à temperatura de 8°C, na geladeira;
- 8) Após separação das fases, foi obtida a fase lipossolúvel e esta foi retirada e transferida para outro frasco;
- 9) A fase lipossolúvel resultante do processo de separação foi acondicionada em um único recipiente e levada ao rotaevaporador até que a completa evaporação do hexano;
- 10) Por fim, esta foi mantida em estufa para secar a 45°C, por 15 dias.

4. Animais

[019] Na determinação da toxicidade aguda do ELSS foram empregados ratos, fêmeas, da linhagem Wistar, com 70 dias de idade. Os animais permaneceram alojados no

Biotério da UNESP - Campus de Assis, sendo mantidos em condições padrões de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (12h ciclo claro/escuro). Os recursos alimentar e hídrico foram fornecidos *ad libitum*. O manejo dos animais obedeceu aos “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, definidos pelo SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório), bem como de quaisquer leis vigentes aplicáveis à prática da experimentação animal. Os procedimentos experimentais somente ocorreram após apreciação e aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da FCL – UNESP/Campus de Assis. Registro 004/2014.

5. Determinação da toxicidade aguda do ELSS

[020] Este procedimento foi realizado de acordo com o protocolo da OECD 420, com modificações. Foram utilizados somente ratos fêmeas, sempre com o número máximo de 5 animais por grupo ($n=5$). O ELSS foi administrado por gavagem, em dose única, em um animal de cada vez, a partir de uma concentração inicial de 2000mg/kg de peso corpóreo. Esta dose foi determinada em consideração a classificação da Comunidade Comum Europeia, a qual estabelece como nociva uma substância capaz de promover a morte de 50% de uma população em teste (DL50) após uma administração aguda na dose de 200 a 2000 mg/kg. A partir desta concentração doses sequenciais menores foram administradas para possibilitar a estimativa de uma faixa de DL50, sendo esta expressa pela quantidade administrada (mg) do extrato pelo kg de peso corporal do animal. Como controle negativo foi utilizado o veículo de dissolução da amostra. Além da análise do peso corporal, a fim de se constatar a manifestação de alguns sinais tóxicos nos animais, referentes ao seu controle motor e da sua consciência foram avaliados continuamente por período de 4 horas, contados após a administração da ELSS e então diariamente, por período de 14 dias os seguintes parâmetros: agitação, atividade exploratória reduzida, sonolência, alteração na respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade. No 14º dia de teste, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento da anestesia e alguns órgãos foram observados macroscopicamente, retirados e pesados.

6. Avaliação da atividade antifúngica do ELSS

6.1. Microrganismos utilizados

[021] Nos experimentos foi determinada a avaliação da atividade antifúngica dos microrganismos *Trichophyton rubrum*, *Malassezia pachydermatis* (ATCC 1452) e *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533). Todas as linhagens a serem utilizadas foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropicais.

6.2. Isolamento e preservação dos microrganismos

[022] Para o isolamento dos microrganismos foi utilizado o meio MM composto por: extrato de malte (1,8%), peptona (1,8%), tween 40 ou 80 (0,5%), glicerol (0,25%) e cloranfenicol (0,009%), dissolvidos em água e com pH 6,5. Antes da inoculação dos fungos todos os meios de cultivo foram previamente esterilizados em autoclave (Fabbe-Primar, modelo 103) por 20 minutos à pressão de 1atm e temperatura de 121°C. Após a inoculação, para o crescimento dos microrganismos, a cultura foi incubada à 32°C por 72 horas (Estufa de cultura FANEM LTDA). As culturas foram preservadas em tubos de Eppendorf contendo cerca de 1mL de gliceraldeído a 10% previamente esterilizados (autoclavado por 40 minutos à 121°C – Autoclave FABBE-PRIMAR). Posteriormente os tubos foram armazenados em botijões de nitrogênio líquido (NITROPEC, mod. Volta20) e freezer (Bosch mod. Ecoplus 430) à -20°C.

6.3. Ativação dos microrganismos

[023] Os microrganismos foram ativados assepticamente com alça de platina, pela transferência do mesmo (criopreservado) para Erlenmeyers contendo 100mL de meio líquido esterilizado durante 15 minutos, à 121°C. O meio a ser utilizado possuía a seguinte formulação: sacarose 2%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5% e água destilada, pH = 6,5. Os Erlenmeyers contendo os fungos foram incubados por 32°C, sob agitação de 180rpm (FANEM LTDA, modelo 002CB – São Paulo-SP). Após o crescimento da cultura, foram realizadas mais duas repicagens, nas mesmas condições descritas anteriormente com a finalidade de promover a ativação completa dos microrganismos.

6.4. Padronização dos microrganismos

[024] A padronização do inóculo, nesta etapa do trabalho, foi realizada para garantir a confiabilidade do teste. Para isso, inicialmente foi feito um esgotamento do microrganismo pelo método de estriamento, e de três a cinco colônias, bem isoladas,

do mesmo tipo morfológico foram selecionadas, garantindo que o microrganismo inoculado em meio de cultura fosse proveniente de um único organismo e a utilização de isolado mutante fosse evitada. Para a *Malassezia pachydermatis* o meio de cultura utilizado foi o *Ágar Sabouraud* dextrose acrescido de óleo de oliva a 1%. Este foi incubado por uma semana a 37°C. Para os fungos *Tricophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* o meio de cultura utilizado foi *Ágar Sabouraud* dextrose e a temperatura de incubação de 35°C por 5 dias. Após esse período de incubação, com o propósito de garantir que parcelas iguais do microrganismo fossem introduzidas nos diferentes tubos de ensaio utilizados na etapa seguinte, a concentração do microrganismo presente no meio de cultura foi definida, por meio de uma contagem em câmara de Neubauer, e então o meio foi diluído em água estéril até a obtenção da concentração desejada, de 10⁶ células/mL.

6.5. Concentração Mínima Inibitória (CMI)

[025] A determinação da Concentração Mínima Inibitória - CMI foi avaliada a partir da porcentagem de inibição do ELSS para os microrganismos *Malassezia pachydermatis*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. Para esta determinação foi utilizada a metodologia descrita por Jones et al (1981) com algumas modificações. Este método consiste na obtenção de diferentes concentrações do extrato em medições de absorbância ao comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Pharmacia mod. Ultrapec). Para a obtenção das diferentes concentrações de ELSS, foram adicionados 4mL da maior concentração de ELSS (1000 µg/mL) num primeiro tubo de ensaio, que continha 4 mL de meio de cultura específico. Após a homogeneização deste primeiro tubo, 4mL foram passados para um segundo tubo, que continha 4 mL do mesmo meio específico e, após homogeneização, o procedimento foi repetido para mais 3 tubos, todos com 4 mL, sendo os últimos 4 mL do quinto tubo descartados. Após a diluição do ELSS em cada tubo de ensaio foram adicionados 4mL de uma concentração definida de *Malassezia pachydermatis*, *Tricophyton mentagrophytes* ou *Trichophyton rubrum* padronizado. Como controle, um tubo contendo 4mL de meio e 4 mL do inóculo padronizado foi utilizado. As medições de absorbância foram feitas imediatamente após a inoculação, tempo zero, e diariamente, a partir das 72 horas de

incubação, até o tempo final determinado para cada microrganismo. Desta forma, a *Malassezia pachydermatis* foi deixada em estufa a 37°C, nas diferentes concentrações da diluição, e após 7 dias foi feita a última medição. Para o *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* o mesmo procedimento foi adotado, mas com temperatura de 35°C e a última medição realizada após 5 dias. Os valores de absorvância de cada concentração foram então comparados com o grupo controle. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico cetoconazol, comumente empregados na clínica médica. Desta forma, o potencial antimicrobiano do ELSS sobre os microrganismos testados foi feito por meio da análise da inibição de seus respectivos crescimentos. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração que apresentou maior percentual de inibição

7. Desenvolvimento de uma formulação base tensoativa

[026] Para a formulação do shampoo base, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Lauril Éter Sulfato de Sódio – 23% em massa;
- Dietanolamina de ácido graxo de coco – 4% em massa;
- Metilparabeno (nipagin) – 0,2% em massa;
- EDTA Na₂ – 0,1% em massa;
- Essência – q.s.;
- Extrato – 1,65 % em massa;
- Solução de Cloreto de Sódio 20% - q.s.;
- Ácido Cítrico (sol. 10%) q.s. – pH=6.0-6.5;
- Água purificada q.s.p. – 100,0 mL.

8. Desenvolvimento de shampoo antifúngico

[027] As concentrações do ELSS que foram adicionadas à formulação foram definidas de acordo com os resultados obtidos com esse extrato no estudo da Concentração Mínima Inibitória – CMI para o fungo filamentoso *Trichophyton rubrum*, por se tratar do agente causador mais frequente de Dermatomicoses superficiais no Brasil e no mundo. Como para este fungo o CMI do cetoconazol foi de 900µg/mL temos que 0,9mg de cetoconazol inibe 1g do microrganismo patogênico pela técnica da CMI. O shampoo comercial usado como padrão continha 20mg de cetoconazol por mL de shampoo.

Assim, dividindo 20mg por 0,9mg é possível constatar que no shampoo a concentração de cetoconazol é 22 vezes maior que o valor da CMI. Assim, em um shampoo de 100mL existem 2g de cetoconazol (100mL x 20mg).

[028] A CMI do ELSS para o *Trichopyton rubrum* foi de 750µg/mL. Portanto, temos que $0,750\text{mg/mL} \times 22 = 16,5\text{mg}$ por mL de shampoo. Ou seja, em um frasco de 100 mL de shampoo seriam necessários 1650mg ou 1,65g do ELSS por embalagem de 100mL. Assim, 1,65 g do ELSS foi adicionado em 100 mL do shampoo base.

9. Avaliação da atividade antifúngica do shampoo com ELSS

[029] No início dos experimentos o microrganismo *Trichopyton rubrum* foi inoculado em meios de cultura líquida, por um período necessário para obtenção de uma concentração inicial de aproximadamente $3,7 \times 10^8$ células/mL, para o microrganismo, contadas em câmara de Neubauer.

[030] A partir dessa concentração inicial, ou seja, $3,7 \times 10^8$ células/mL, 1mL da cultura líquida de *Trichopyton rubrum*, foi introduzido a 9mL de cada shampoo (base, cetoconazol, ELSS), obtendo 4 tubos, cada um com uma concentração de $3,7 \times 10^7$ células/mL. Os tubos foram deixados em estufa a 35°C por meia hora.

[031] Passados meia hora, 1mL de cada um dos 4 tubos foi introduzido em 4 diferentes tubos, cada um contendo 9mL de água peptonada a 0,1%, resultando agora em soluções contendo uma concentração aproximada de *Trichopyton rubrum* de $3,7 \times 10^6$ células/mL.

[032] Posteriormente 1mL de cada um dos 4 tubos foi introduzido em 4 novos tubos, cada um contendo 9mL de água peptonada a 0,1%, resultando agora em soluções contendo uma concentração aproximada de *Trichopyton rubrum* de $3,7 \times 10^5$ células/mL. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de 20 diferentes diluições fracionadas de soluções peptonadas, acrescidas com shampoos (base, cetoconazol, ELSS), de $3,7 \times 10^6$ a $3,7 \times 10^2$ células/mL de *Trichopyton rubrum*.

[033] Posteriormente, foram realizadas as inoculações de 100µL de cada uma das soluções em meio de cultura sólido acrescido de cloranfenicol a 0,018%. O procedimento de inoculação foi realizado em duplicata. Todos os meios de cultura sólidos, imediatamente após a inoculação das soluções, foram incubados em estufa

bacteriológica a 35°C por um período máximo de 24 horas. Após esse período foi contado o número de colônias (microrganismos) presentes nas placas de cultura.

[034] Após 60 e 120 minutos da inoculação *Trichopyton rubrum* no shampoo todas as etapas acima descritas também foram repetidas a fim de avaliar a atividade antifúngica do extrato em função do tempo.

10. Análise da estabilidade do shampoo antifúngico

10.1. Análise Organoléptica

[035] A formulação foi observada visualmente quanto às alterações de cor, odor e homogeneidade semanalmente por 30 dias (CHORILLI et al., 2006; LEONARDI, 1997). As amostras foram mantidas a 4°C na geladeira, a 25°C (temperatura ambiente) e 40°C (estufa).

10.2. Análise do pH

[036] A formulação foi diluída 1:10 em água destilada, para obter-se uma solução suficientemente aquosa. Então, o pH da solução foi medido nos 4 primeiros dias e após este período, semanalmente até o 30º dia, sendo este teste realizado em triplicata (LEONARDI, 1997). Esta medição se deu por meio do medidor de pH digital (TECNAL), para analisar a variação de pH sob as temperaturas 4°C, 25°C e 40°C ao longo dos 30 dias.

10.3. Análise da Viscosidade

[037] A viscosidade foi determinada por meio da utilização do viscosímetro universal rotativo e as amostras foram analisadas nos 4 primeiros dias e após este período, semanalmente até o 30º dia. Esta medição foi feita para ser analisada a variação da viscosidade sob a temperatura de 25°C.

RESULTADOS DA INVENÇÃO

Estudo da toxicidade aguda do ELSS

[038] No estudo da toxicidade aguda do ELSS a administração da dose de 2000mg/kg por via oral, em dose única, mostrou-se inócua do ponto de incidência de óbitos, impossibilitando a realização do cálculo de DL50. Em complemento, na avaliação da manifestação de alguns sinais tóxicos do ELSS, referentes ao controle motor e da consciência, constatamos que nas primeiras 12 horas após a sua administração alguns

animais manifestaram alterações nos parâmetros relacionados à: diminuição da locomoção, diminuição do tônus muscular e hipnose. A partir das 24 horas da administração, bem como durante os 14 dias de observação a manifestação desses sinais não foi mais observada. Os demais parâmetros analisados não se mostraram alterados durante os 14 dias de observação. A tabela 1 mostra os parâmetros que se mostraram alterados durante as primeiras doze horas após a administração do ELSS na dose de 2000 mg/kg em dose única.

Tabela 1 - Parâmetro numérico usado para avaliar a manifestação de alguns aspectos toxicológicos, motores e da consciência decorrentes da administração do ELSS, por via oral, em dose única de 2000 mg/kg: escala variando de 0 a 4, onde 0 significou a ausência de observação do parâmetro analisado e 4 a observação total deste. O n foi de 5 animais por grupo, todos fêmeas, portanto o paramétrico numérico apresentado corresponde ao da média do grupo para machos ou fêmeas.

Aspectos Gerais	Tempo de avaliação após a administração do ELSS					
	15 min	30 min	1 hora	4 horas	8 horas	12 horas
Redução da Locomoção	0,33	0,66	1	1,66	0,33	0,33
Diminuição do tônus muscular	0	0,66	0,33	0,33	0,33	0,33
Hipnose	0,66	1,33	0,66	0,66	0,33	0,33

[039] Após 14 dias da sua administração em dose única, os animais foram sacrificados e exames anatomopatológicos macroscópicos das adrenais, fígado, estômago, rins e coração foram realizados (Tabela 2). Não existiram diferenças significativas nos pesos das estruturas analisadas, configurando ausência da toxicidade aguda do ELSS.

Tabela 2 – Peso dos órgãos de ratos Wistar tratados com dose única do ELSS.

Grupo	Fígado	Rim	Adrenais	Estômago	Coração
Controle	11,35±0,37	2,82±0,05	0,08±0,01	1,62±0,09	1,31±0,07
EHA 2000mg/kg	11,15±0,14	2,59±0,12	0,09±0,00	1,58±0,08	1,28±0,037

Avaliação da atividade antifúngica do ELSS

[040] Na avaliação da atividade antifúngica do ELSS, contra os fungos *Malassezia pachydermatis* e *Tricophyton mentagrophytes*, a partir de uma concentração inicial de 1000 µg/mL do extrato, várias diluições fracionadas foram realizadas resultando nas concentrações de 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL e 31µg/mL. Na avaliação da atividade antifúngica do ELSS contra o fungo *Tricophyton rubrum* a partir de uma concentração inicial de 3000 µg/mL do extrato várias diluições fracionadas foram realizadas resultando nas concentrações de 1500µg/mL, 750µg/mL, 375µg/mL, 187µg/mL, 5µg/mL e 93,75µg/mL.

[041] As diferentes diluições foram avaliadas por meio da metodologia descrita por Jones et al (1981), sendo a avaliação do potencial antifúngico do ELSS determinada por meio da análise de inibição do crescimento dos fungos.

[042] Os resultados obtidos para as cinco concentrações da diluição fracionada do ELSS contra os microrganismos *Malassezia pachydermatis*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum* estão descritos nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente. Sendo a concentração mínima inibitória (CMI) do extrato definida como a menor concentração capaz de promover a inibição do crescimento da *Malassezia pachydermatis*.

[043] Os resultados evidenciaram a ação antifúngica do ELSS contra a *Malassezia pachydermatis*, pois este apresentou uma CMI de 125µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração inibitória do ELSS para a levedura *Malassezia pachydermatis*

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Crescimento
ELSS	500	Negativo
	250	Negativo
	125	Negativo*
	62,5	Positivo
	31	Positivo

[044] Para o fungo filamentoso *Tricophyton mentagrophytes* o ELSS apresentou uma CMI de 250µg/mL. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para as cinco concentrações da diluição fracionada do ELSS contra esse fungo.

Tabela 4 – Concentração inibitória do ELSS para o *Tricophyton mentagrophytes*.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Crescimento
ELSS	500	Negativo
	250	Negativo*
	125	Positivo
	62,5	Positivo
	31	Positivo

[045] Para o *Tricophyton rubrum* o ELSS apresentou uma CMI de 750 µg/mL. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para as cinco concentrações da diluição fracionada do ELSS contra esse fungo.

Tabela 5 – Concentração inibitória do ELSS para o fungo filamentoso *Tricophyton rubrum*.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Crescimento
ELSS	1500	Negativo
	750	Negativo*
	375	Positivo
	187,50	Positivo
	93,75	Positivo

Avaliação da atividade antifúngica do Cetoconazol

[046] A atividade antifúngica do controle positivo cetoconazol, antifúngico amplamente utilizado na clínica médica, foi avaliada contra a levedura *Malassezia pachydermatis* e para o fungo filamentoso, *Tricophyton rubrum*. A partir de uma concentração inicial de 3600 µg/mL várias diluições fracionadas foram realizadas resultando nas concentrações de 1800 µg/mL, 900 µg/mL, 450 µg/mL, 225µg/mL, 112,5 µg/mL e 56,2µg/mL. O cetoconazol apresentou uma CMI de 112,5 µg/mL foi definida contra a levedura *Malassezia pachydermatis*. Esta levedura se mostrou mais sensível à ação do cetoconazol do que ao ELSS, Tabela 6.

Tabela 6 - Concentrações inibitórias do cetoconazol (controle positivo) para a levedura *Malassezia pachydermatis*.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Crescimento
Cetoconazol	1800	Negativo
	900	Negativo
	450	Negativo
	225	Negativo
	112,5	Negativo*
	56,2	Positivo

[047] Também para o cetoconazol foi definida a CMI de 900µg/mL contra o *Tricophyton rubrum*, sendo que este fungo se mostrou mais sensível à ação do ELSS, Tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações inibitórias do cetoconazol (controle positivo) para o *Tricophyton rubrum*.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Crescimento
Cetoconazol	1800	Negativo
	900	Negativo*
	450	Positivo
	225	Positivo
	112,5	Positivo
	56,2	Positivo

Avaliação da atividade antifúngica do shampoo com ELSS

[048] O *Tricophyton rubrum* foi escolhido nesta etapa por se tratar do agente causador mais frequente de Dermatomicoses superficiais no Brasil e no mundo.

[049] A Tabela 8 mostra a média do número de colônias de *Tricophyton rubrum* que proliferaram no meio de cultura sólido após a inoculação das soluções peptonadas enriquecidas com os diferentes shampoos e com o *Tricophyton rubrum*, na concentração de $3,7 \times 10^2$ células/mL. Nas demais diluições não foi possível a contagem das células em decorrência do excessivo crescimento de colônias.

[050] Pode-se notar que em todos os tempos houve diferença entre o número de células do fungo *Trichopyton rubrum* presente no shampoo base com as observadas no shampoo com ELSS, assim como no shampoo com cetoconazol. Também, é possível analisar que a ação antifúngica do ELSS e do cetoconazol se mantem com o passar do tempo.

Tabela 8 – Média do número de colônias presentes $\times 10^2$ presentes nas placas de cultura nas quais foram introduzidas as soluções contendo shampoo base, com cetoconazol e com ELSS, contaminados com *Trichopyton rubrum* na concentração de $3,7 \times 10^2$ células/mL, nos tempos de 30, 60 e 120 minutos após a inoculação do microrganismo aos shampoos.

Tempos	Shampoo Base	Shampoo Cetoconazol	Shampoo ELSS
30 minutos	2×10^2	1×10^2	1×10^2
60 minutos	$2,5 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$	1×10^2
90 minutos	3×10^2	1×10^2	1×10^2

Avaliação da qualidade e estabilidade do Shampoo com o ELSS

[051] No shampoo desenvolvido com o ELSS a presença das saponinas foi notada por meio da presença de muita espuma, conforme é possível observar na Figura 1.

[052] Os resultados obtidos na análise do shampoo associado ao extrato do resíduo do sisal foram extremamente satisfatórios. No período de 30 dias o shampoo apresentou excelente estabilidade quanto aos seguintes aspectos:

- A aparência não se alterou em todas as temperaturas analisadas (4°C, 25°C e 40°C);
- O pH permaneceu em torno de 6,0 em todas as temperaturas analisadas (4°C, 25°C e 40°C);
- A cor, odor e homogeneidade permaneceram estáveis em todas as temperaturas analisadas (4°C, 25°C e 40°C);
- A viscosidade foi avaliada somente na temperatura de 25°C e apresentou um valor estável de 3000 centipoise (cps).

[053] Em complemento, a fim de avaliar o poder de limpeza do shampoo foi realizada uma comparação de outros parâmetros entre esse shampoo com o shampoo comercial. Foi constatada no shampoo a mesma eficiência na limpeza que os demais produtos, uma espuma de quantidade e qualidade satisfatória e uma excelente sensação de limpeza. A Figura 2A mostra a quantidade de espuma formada para o shampoo do sisal (2.2) (nível de espuma de 60mL), em relação ao shampoo comercial (2.3) (Figura 2B) (nível de espuma de 50 mL).

[054] Os resultados obtidos em nosso estudo revelaram que na análise da toxicidade aguda, após tratamento por via oral, em dose única, o extrato lipossolúvel do sisal, nas concentrações de 2000 mg/kg, não promoveu a morte dos animais. Assim, de acordo com a Comunidade Comum Europeia este extrato não é considerado nocivo.

[055] Na avaliação da atividade antifúngica, o extrato lipossolúvel do resíduo do sisal se mostrou efetivo contra os agentes causadores de Dermatomicoses. Contra *Malassezia pachydermatis* apresentou uma concentração mínima inibitória (CMI) de 125µg/mL. Para o fungo filamentoso *Tricophyton mentagrophytes* apresentou uma CMI de 250µg/mL. Para o *Tricophyton rubrum* apresentou uma CMI de 750 µg/mL. Na avaliação da atividade antifúngica do shampoo com o extrato do sisal o *Tricophyton rubrum* foi o microrganismo escolhido, por se tratar do agente causador mais frequente de Dermatomicoses superficiais no Brasil e no mundo. Para o preparo do shampoo foi considerada a concentração de 1,65 g do extrato em 100 mL do shampoo base. O

shampoo contendo o extrato do resíduo do sisal teve sua atividade antifúngica confirmada. Os testes de qualidade revelaram estabilidade da formulação quanto aos aspectos avaliados: cor, odor, homogeneidade, pH e viscosidade.

[056] Além de ser uma formulação que contém unicamente compostos ativos vegetais, a importância social do desenvolvimento de produtos à base do sisal poderá ser fortemente valorizada. Além disso, o Brasil é o maior produtor de sisal do mundo, e da folha do sisal atualmente só é aproveitada a fibra que corresponde a aproximadamente 5% de seu peso. Assim, como todo o resíduo restante é descartado, a fonte de matéria-prima para a fabricação do shampoo antifúngico é enorme e extremamente barata. Não existe no mercado nenhum produto similar ao proposto nesse pedido de patente de invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO DE SHAMPOO ANTIFÚNGICO COM EXTRATO LIPOSSOLÚVEL DO RESÍDUO DA PLANTA AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL), a dita formulação **caracterizada por** ser obtida pelas seguintes etapas:

- 1) Obtenção do Material de Origem Vegetal: em que a mucilagem do sisal resultou do processo de desfibramento das folhas do sisal;
- 2) Preparo do suco do sisal: em que este suco foi obtido por meio da prensagem e filtração da mucilagem, resultante do desfibramento de suas folhas;
- 3) Preparação do extrato lipossolúvel do suco do sisal (ELSS): em que, nesta etapa, o ELSS resultou dos seguintes processos:
 - a) Filtração do suco do sisal em carvão ativado;
 - b) Centrifugação do suco por 20 minutos, a 18°C em 3800rpm para obtenção do precipitado;
 - c) Retirada do precipitado e secagem do mesmo em estufa a 50°C, por 5 dias, até obtenção do peso constante;
 - d) Obtenção extrato seco e posterior fracionamento por hexano; Sendo que para cada 10 gramas do extrato foram adicionados 3% de Tween 80 e 1% de DMSO e, posteriormente, a dissolução foi realizada com uma solução de água destilada e hexano na mesma proporção, a de 50% (v/v);
 - e) Agitação da solução por 90 minutos no shaker;
 - f) Após esse período a solução foi deixada em repouso por 5 dias, sendo agitada 1 vez ao dia;
 - g) A mistura então foi colocada em um funil de separação e este foi mantido à temperatura de 8°C, na geladeira;
 - h) Após separação das fases, foi obtida a fase lipossolúvel e esta foi retirada e transferida para outro frasco;
 - i) A fase lipossolúvel resultante do processo de separação foi acondicionada em um único recipiente e levada ao rotaevaporador até que a completa evaporação do hexano;
 - j) Por fim, esta foi mantida em estufa para secar a 45°C, por 15 dias;

4) Animais: em que na determinação da toxicidade aguda do ELSS foram empregados ratos, fêmeas, da linhagem Wistar, com 70 dias de idade; Os animais permaneceram alojados no Biotério da UNESP - Campus de Assis, sendo mantidos em condições padrões de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (12h ciclo claro/escuro);

5) Determinação da toxicidade aguda do ELSS: em que o procedimento foi realizado de acordo com o protocolo da OECD 420, com modificações; Foram utilizados somente ratos fêmeas, sempre com o número máximo de 5 animais por grupo ($n=5$); O ELSS foi administrado por gavagem, em dose única, em um animal de cada vez, a partir de uma concentração inicial de 2000mg/kg de peso corpóreo; Esta dose foi determinada em consideração a classificação da Comunidade Comum Europeia, a qual estabelece como nociva uma substância capaz de promover a morte de 50% de uma população em teste (DL50) após uma administração aguda na dose de 200 a 2000 mg/kg; A partir desta concentração doses sequenciais menores foram administradas para possibilitar a estimativa de uma faixa de DL50, sendo esta expressa pela quantidade administrada (mg) do extrato pelo kg de peso corporal do animal; Como controle negativo foi utilizado o veículo de dissolução da amostra; Além da análise do peso corporal, a fim de se constatar a manifestação de alguns sinais tóxicos nos animais, referentes ao seu controle motor e da sua consciência foram avaliados continuamente por período de 4 horas, contados após a administração da ELSS e então diariamente, por período de 14 dias os seguintes parâmetros: agitação, atividade exploratória reduzida, sonolência, alteração na respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade; No 14º dia de teste, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento da anestesia e alguns órgãos foram observados macroscopicamente, retirados e pesados;

6) Avaliação da atividade antifúngica do ELSS:

a) Microrganismos utilizados: em que nos experimentos foi determinada a avaliação da atividade antifúngica dos microrganismos *Trichophyton rubrum*, *Malassezia pachydermatis* (ATCC 1452) e *Tricophyton mentagrophytes* (ATCC 9533);

b) Isolamento e preservação dos microrganismos: em que, para o isolamento dos microrganismos foi utilizado o meio MM composto por: extrato de malte (1,8%),

peptona (1,8%), *tween* 40 ou 80 (0,5%), glicerol (0,25%) e cloranfenicol (0,009%), dissolvidos em água e com pH 6,5; Antes da inoculação dos fungos todos os meios de cultivo foram previamente esterilizados em autoclave (Fabbe-Primar, modelo 103) por 20 minutos à pressão de 1atm e temperatura de 121°C; Após a inoculação, para o crescimento dos microrganismos, a cultura foi incubada à 32°C por 72 horas (Estufa de cultura FANEM LTDA); As culturas foram preservadas em tubos de Eppendorf contendo cerca de 1mL de gliceraldeído a 10% previamente esterilizados (autoclavado por 40 minutos à 121°C); em que posteriormente os tubos foram armazenados em botijões de nitrogênio líquido e freezer à -20°C;

c) Ativação dos microrganismos: em que os microrganismos foram ativados assepticamente com alça de platina, pela transferência do mesmo (criopreservado) para Erlenmeyers contendo 100mL de meio líquido esterilizado durante 15 minutos, à 121°C; O meio a ser utilizado possuía a seguinte formulação: sacarose 2%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5% e água destilada, pH = 6,5; em que os Erlenmeyers contendo os fungos foram incubados por 32°C, sob agitação de 180rpm; em que após o crescimento da cultura, foram realizadas mais duas repicagens, nas mesmas condições descritas anteriormente com a finalidade de promover a ativação completa dos microrganismos;

d) Padronização dos microrganismos: em que a padronização do inóculo, foi realizada para garantir a confiabilidade do teste; Para isso, inicialmente foi feito um esgotamento do microrganismo pelo método de estriamento, e de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico foram selecionadas, garantindo que o microrganismo inoculado em meio de cultura fosse proveniente de um único organismo e a utilização de isolado mutante fosse evitada; Para a *Malassezia pachydermatis* o meio de cultura utilizado foi o *Ágar Sabouraud* dextrose acrescido de óleo de oliva a 1%; Este foi incubado por uma semana a 37°C; Para os fungos *Tricophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* o meio de cultura utilizado foi *Ágar Sabouraud* dextrose e a temperatura de incubação de 35°C por 5 dias; Após esse período de incubação, com o propósito de garantir que parcelas iguais do microrganismo fossem introduzidas nos diferentes tubos de ensaio utilizados na etapa seguinte, a

concentração do microrganismo presente no meio de cultura foi definida, por meio de uma contagem em câmara de Neubauer, e então o meio foi diluído em água estéril até a obtenção da concentração desejada, de 10⁶ células/mL;

e) Concentração Mínima Inibitória (CMI): em que a determinação da Concentração Mínima Inibitória - CMI foi avaliada a partir da porcentagem de inibição do ELSS para os microrganismos *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*; Para esta determinação foi utilizada a metodologia descrita por Jones et al (1981) com algumas modificações; Este método consiste na obtenção de diferentes concentrações do extrato em medições de absorbância ao comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Pharmacia mod Ultrapec); Para a obtenção das diferentes concentrações de ELSS, foram adicionados 4mL da maior concentração de ELSS (1000 µg/mL) num primeiro tubo de ensaio, que continha 4 mL de meio de cultura específico; Após a homogeneização deste primeiro tubo, 4mL foram passados para um segundo tubo, que continha 4 mL do mesmo meio específico e, após homogeneização, o procedimento foi repetido para mais 3 tubos, todos com 4 mL, sendo os últimos 4 mL do quinto tubo descartados; Após a diluição do ELSS em cada tubo de ensaio foram adicionados 4mL de uma concentração definida de *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton mentagrophytes* ou *Trichophyton rubrum* padronizado; Como controle, um tubo contendo 4mL de meio e 4 mL do inóculo padronizado foi utilizado; As medições de absorbância foram feitas imediatamente após a inoculação, tempo zero, e diariamente, a partir das 72 horas de incubação, até o tempo final determinado para cada microrganismo; Desta forma, a *Malassezia pachydermatis* foi deixada em estufa a 37°C, nas diferentes concentrações da diluição, e após 7 dias foi feita a última medição; Para o *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* o mesmo procedimento foi adotado, mas com temperatura de 35°C e a última medição realizada após 5 dias; Os valores de absorbância de cada concentração foram então comparados com o grupo controle; Como controle positivo foi utilizado o antifúngico cetoconazol, comumente empregados na clínica médica; Desta forma, o potencial antimicrobiano do ELSS sobre os microrganismos testados foi feito por meio da análise

da inibição de seus respectivos crescimentos; A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração que apresentou maior percentual de inibição;

7) Desenvolvimento de uma formulação base tensoativa: em que, para a formulação do shampoo base foram utilizados os seguintes reagentes:

- Lauril Éter Sulfato de Sódio – 23% em massa;
- Dietanolamina de ácido graxo de coco – 4% em massa;
- Metilparabeno (nipagin) – 0,2% em massa;
- EDTA Na₂ – 0,1% em massa;
- Essência – q.s.;
- Extrato – 1,65% em massa;
- Solução de Cloreto de Sódio 20% - q.s.;
- Ácido Cítrico (sol. 10%) q.s. – pH=6.0-6.5;
- Água purificada q.s.p. – 100,0 mL;

8) Desenvolvimento de shampoo antifúngico: em que as concentrações do ELSS que foram adicionadas à formulação foram definidas de acordo com os resultados obtidos com esse extrato no estudo da Concentração Mínima Inibitória – CMI para o fungo filamentoso *Trichopyton rubrum*, por se tratar do agente causador mais frequente de Dermatomicoses superficiais no Brasil e no mundo; em que como para este fungo o CMI do cetoconazol foi de 900µg/mL temos que 0,9mg de cetoconazol inibe 1g do microrganismo patogênico pela técnica da CMI; em que o shampoo comercial usado como padrão continha 20mg de cetoconazol por mL de shampoo e assim, dividindo 20mg por 0,9mg é possível constatar que no shampoo a concentração de cetoconazol é 22 vezes maior que o valor da CMI; Assim, em um shampoo de 100mL existem 2g de cetoconazol (100mL x 20mg); em que a CMI do ELSS para o *Trichopyton rubrum* foi de 750µg/mL; Portanto, temos que 0,750mg/mL x 22 = 16,5mg por mL de shampoo; Ou seja, em um frasco de 100 mL de shampoo seriam necessários 1650mg ou 1,65g do ELSS por embalagem de 100 mL; e, assim, 1,65 g do ELSS foi adicionado em 100 mL do shampoo base.

2. FORMULAÇÃO DE SHAMPOO ANTIFÚNGICO COM EXTRATO LIPOSSOLÚVEL DO RESÍDUO DA PLANTA AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** ser obtida ainda pelas seguintes etapas:

1- Avaliação da atividade antifúngica do shampoo com ELSS: em que o microrganismo *Trichopyton rubrum* foi inoculado em meios de cultura líquida, por um período necessário para obtenção de uma concentração inicial de aproximadamente $3,7 \times 10^8$ células/mL, para o microrganismo, contadas em câmara de Neubauer; em que, a partir dessa concentração inicial, ou seja, $3,7 \times 10^8$ células/mL, 1mL da cultura líquida de *Trichopyton rubrum*, foi introduzido a 9mL de cada shampoo (base, cetoconazol, ELSS), obtendo 4 tubos, cada um com uma concentração de $3,7 \times 10^7$ células/mL; Os tubos foram deixados em estufa a 35°C por meia hora; em que, passados meia hora, 1mL de cada um dos 4 tubos foi introduzido em 4 diferentes tubos, cada um contendo 9mL de água peptonada a 0,1%, resultando agora em soluções contendo uma concentração aproximada de *Trichopyton rubrum* de $3,7 \times 10^6$ células/mL; em que, posteriormente, 1mL de cada um dos 4 tubos foi introduzido em 4 novos tubos, cada um contendo 9mL de água peptonada a 0,1%, resultando agora em soluções contendo uma concentração aproximada de *Trichopyton rubrum* de $3,7 \times 10^5$ células/mL; em que o procedimento foi repetido até a obtenção de 20 diferentes diluições fracionadas de soluções peptonadas, acrescidas com shampoos (base, cetoconazol, ELSS), de $3,7 \times 10^6$ a $3,7 \times 10^2$ células/mL de *Trichopyton rubrum*; em que, posteriormente, foram realizadas as inoculações de 100µL de cada uma das soluções em meio de cultura sólido acrescido de cloranfenicol a 0,018%; em que o procedimento de inoculação foi realizado em duplicata; em que todos os meios de cultura sólidos, imediatamente após a inoculação das soluções, foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por um período máximo de 24 horas; em que, após esse período foi contado o número de colônias (microrganismos) presentes nas placas de cultura; em que após 60 e 120 minutos da inoculação *Trichopyton rubrum* no shampoo todas as etapas acima descritas também foram repetidas a fim de avaliar a atividade antifúngica do extrato em função do tempo;

2- Análise da estabilidade do shampoo antifúngico:

- a) Análise Organoléptica: em que a formulação foi observada visualmente quanto às alterações de cor, odor e homogeneidade semanalmente por 30 dias e as amostras foram mantidas a 4°C na geladeira, a 25°C (temperatura ambiente) e 40°C (estufa);
- b) Análise do pH: em que a formulação foi diluída 1:10 em água destilada, para obter-se uma solução suficientemente aquosa; em que o pH da solução foi medido nos 4 primeiros dias e após este período, semanalmente até o 30º dia, sendo este teste realizado em triplicata; em que esta medição se deu por meio do medidor de pH digital para analisar a variação de pH sob as temperaturas 4°C, 25°C e 40°C ao longo dos 30 dias;
- c) Análise da Viscosidade: em que a viscosidade foi determinada por meio da utilização do viscosímetro universal rotativo e as amostras foram analisadas nos 4 primeiros dias e após este período, semanalmente até o 30º dia; em que esta medição foi feita para ser analisada a variação da viscosidade sob a temperatura de 25°C.

3. USO DA FORMULAÇÃO DE SHAMPOO ANTIFÚNGICO COM EXTRATO LIPOSSOLÚVEL DO RESÍDUO DA PLANTA AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL), de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizada por** ser utilizado na Indústria de fitoterápicos, sobretudo no tratamento de Dermatomicoses.



FIGURA 1

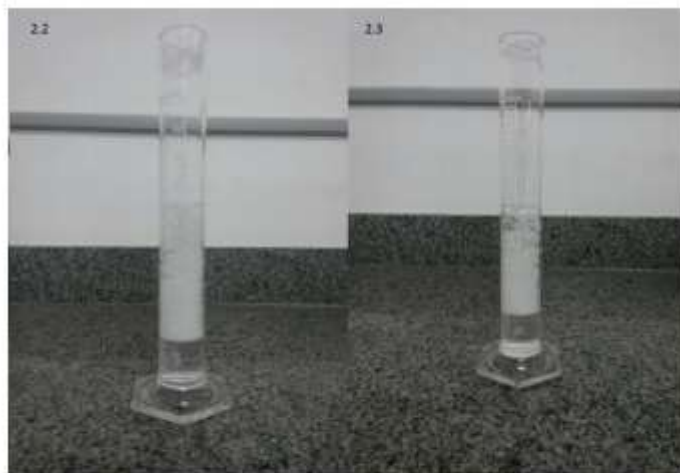


FIGURA 2A

FIGURA 2B

RESUMO

FORMULAÇÃO DE SHAMPOO ANTIFÚNGICO COM EXTRATO LIPOSSOLÚVEL DO RESÍDUO DA PLANTA AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) E USO DA FORMULAÇÃO DO SHAMPOO.

O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma formulação de shampoo antifúngico com extrato lipossolúvel do resíduo da planta *Agave sisalana* Perrine, mais conhecida como sisal, assim como o uso da dita formulação do shampoo. As tecnologias empregadas foram necessárias para: Obtenção do suco do sisal, a partir da prensagem da mucilagem, resíduo do desfibramento de suas folhas e que até o momento está sendo desprezada; desenvolvimento do extrato lipossolúvel do suco do sisal (ELSS); avaliação da toxicidade aguda do ELSS; avaliação da atividade antifúngica do ELSS contra as leveduras *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichopyton mentagropyton*, agentes causadores de doenças do couro cabeludo e da pele; desenvolvimento de uma formulação base composta pelo tensoativo, um estabilizante de espuma e um emulsificante, que será adicionado com a finalidade de conferir estabilidade à formulação, tornando a razoavelmente estável e homogênea; desenvolvimento de um shampoo antifúngico a partir da adição à formulação do ELSS; avaliação da atividade antifúngica do shampoo com ELSS contra *Trichopyton rubrum* e avaliação da estabilidade do shampoo com ELSS.