

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

THAÍS ALMEIDA PEREIRA

**BRASÍLIA-DF
2011**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

THAÍS ALMEIDA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM SISTEMA CONSERVANTE EM
FORMULAÇÕES ADICIONADAS DE BIOMOLÉCULAS
FARMACÊUTICAS E ESTUDOS DE ADAPTAÇÃO MICROBIANA**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA DE FÁTIMA
BORIN.**

BRASÍLIA-DF

2011

THAÍS ALMEIDA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UM SISTEMA CONSERVANTE EM
FORMULAÇÕES ADICIONADAS DE BIOMOLÉCULAS
FARMACÊUTICAS E ESTUDOS DE ADAPTAÇÃO MICROBIANA**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Borin (presidente)
Universidade de Brasília

Prof^ª. Dr^a Maria José Vieira Fonseca
Universidade de São Paulo

Prof^ª. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Universidade de Brasília

Prof^º. Dr. Luiz Alberto Simeoni (membro suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a meus pais queridos, Rosita e Assis, que me forneceram subsídios para a realização deste trabalho e para tudo que tenho conseguido em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me conceder força, paz, saúde, capacidade mental e física para realização desse trabalho e por me iluminar em todos os momentos de minha vida.

À minha família amada (Rosita, Assis, César e Lucas) por terem aguentado meus muitos momentos de agitação e preocupações. Pelo amor e incentivo em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Fátima Borin, por ter fornecido a oportunidade de realizar este trabalho me orientando e fornecendo os subsídios necessários à sua concretização.

Aos estagiários - Vanessa Cristina de O. Soares, Julia Dantas, Aline de Souza Said, Ênio Mangabeira Chaves, Anna Luiza Zago, Jaqueline Shwartz, Pedro Pereira, Ana Cristina Franco, Laíza Magalhães - que me forneceram uma ajuda preciosa durante as diferentes fases do projeto de tal forma que o mesmo pudesse ser concluído.

Aos colegas de laboratório, Paloma Sales, Paula Monteiro, Pedro Mesquita, Ana Carolina Araújo, Ângela Landin, Ádria Barros, que me incentivaram e auxiliaram nos diferentes momentos da pesquisa.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 474896/2010-2), ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade de Brasília e à FINATEC, Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos, pelo auxílio financeiro.

À Profa. Dra. Dâmaris Silveira por nos ter emprestado espaço físico de seu laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, subsidiando, assim, nossas atividades. Agradecemos também pelo empréstimo de vidrarias que foram essenciais ao cumprimento do previsto.

Ao pessoal do laboratório de Patologia Molecular pela permissão para utilização de autoclave.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni, responsável pelo Laboratório de Farmacologia Molecular, pela permissão da utilização de instalações e de equipamentos do laboratório.

Aos meus amigos e familiares por terem me apoiado, cada um a sua maneira, durante o período de realização da pesquisa e estudos.

Aos meus colegas de trabalho na CAPES pelo incentivo, paciência e apoio cedido durante todo o período de realização desse mestrado.

À CAPES, por ter me concedido horário especial sem o qual não teria sido possível a realização desse trabalho.

Aos que não mencionei aqui, mas que me ajudaram durante as diferentes fases desse projeto, meu muito obrigada.

*“A felicidade não se resume na ausência de problemas,
mas sim na sua capacidade de lidar com eles”
(Albert Einstein).*

RESUMO

Biomoléculas são cada vez mais utilizadas em medicamentos e cosméticos e, principalmente aquelas destinadas a tratamentos dermatológicos, são, com freqüência, preparadas em farmácias magistrais. A capacidade de neutralização de conservantes por parte de proteínas e tensoativos não iônicos é bem conhecida, e a utilização desses dois componentes numa mesma formulação gera uma preocupação com relação à conservação desse tipo de produto farmacêutico, que, uma vez mal conservado, poderia gerar riscos à saúde de seus consumidores. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um sistema conservante composto por metilparabeno, propilparabeno e imidazolidinil uréia, de uma formulação base que continha um tensoativo não iônico e desta mesma formulação adicionada de diferentes biomoléculas farmacêuticas, além de realizar estudos de adaptação microbiana frente ao sistema conservante utilizado nas formulações que continham estas biomoléculas. Os resultados obtidos mostraram que a qualidade microbiológica, tanto das matérias-primas quanto das formulações testadas, está de acordo com os limites aceitos em compêndios oficiais. Os testes de avaliação da eficácia do sistema conservante mostraram que a formulação base está adequadamente conservada, mas que a presença das biomoléculas farmacêuticas estudadas na formulação, numa concentração de 3% (p/p) pode provocar modificações no comportamento do sistema conservante frente a alguns dos microrganismos testados. O ensaio de adaptação microbiana revelou que há uma tendência à adaptação ao sistema conservante por parte da maioria dos microrganismos testados quando estão presentes no meio de cultura o tensoativo não iônico e um dos ativos cosméticos estudados. A avaliação da concentração inibitória mínima sugere que as concentrações de sistema conservante utilizadas nas formulações testadas são eficazes, pois a concentração necessária à inibição de crescimento para os diferentes microrganismos padrões foi inferior ou igual à concentração utilizada nas formulações testadas. No entanto, a exposição dos microrganismos às biomoléculas farmacêuticas e ao tensoativo não iônico em concentrações crescentes, no teste de adaptação microbiana, produziu cepas de microrganismos cuja inibição necessitou de maiores concentrações dos conservantes, em alguns casos acima da concentração normalmente utilizada nas formulações.

Palavras-chave: biomoléculas farmacêuticas, conservação, parabenos, imidazolidinil uréia, avaliação microbiológica, cosméticos.

ABSTRACT

Biomolecules have been progressively more used in medicines and cosmetics, and especially those aimed at dermatological treatments are often prepared in magistral pharmacies. The neutralizing ability of preservatives by nonionic surfactants and proteins is well known, and use of both these ingredients into the same formulation raises a concern regarding the conservation of this kind of pharmaceutical product which, once poorly preserved, could generate health risks for the consumers. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effectiveness of a preservative system consisting of methylparaben, propylparaben and imidazolidinyl urea, in a basic formulation containing a nonionic surfactant and in this same formulation added with different pharmaceutical biomolecules. Furthermore, it had the intention to study the possibility of microbial adaptation to the preservative system when in presence of the studied biomolecules and nonionic surfactant. The results showed that the microbiological quality of both raw materials and the formulations tested complies with the limits accepted in literature. Evaluation of the preservative system effectiveness showed that the basic formulation is properly preserved, but the presence of studied biomolecules in the pharmaceutical formulation at a concentration of 3% (w/w) can promote changes in the behavior of the preservative system against some of the microorganisms tested. The microbial adaptation assay revealed that the majority of the microorganisms had a tendency to adapt to the preservative system when the nonionic surfactant and one of the tested cosmetic ingredients were present in the culture medium. Evaluation of minimum inhibitory concentration suggests that concentrations of the preservative system used in the formulations tested are effective, since the concentration needed to inhibit the different standard-microorganisms growth was lower than or equal to the preservative system concentration used in the formulations tested. However, exposure of microorganisms to pharmaceutical biomolecules and nonionic surfactant in increasing concentrations, situation acquired in microbial adaptation assay, produced strains of microorganisms whose inhibition required higher concentrations of the preservative system, in some cases above the concentration normally used in used formulations.

Keywords: biopharmaceutical, preservation, parabens, imidazolidinyl urea, microbiological evaluation, cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da realização de teste desafio	28
Figura 2 -	Curva de sobreviventes de <i>Escherichia coli</i> em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a); na formulação adicionada de Immucell® (b); na formulação adicionada de Colhibin® (c) e na formulação adicionada de Revitalin® (d) (n = 3).	34-35
Figura 3 -	Curva de sobreviventes de <i>Staphylococcus aureus</i> em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a); na formulação adicionada de Immucell® (b); na formulação adicionada de Colhibin® (c) e na formulação adicionada de Revitalin® (d) (n = 3).	36-38
Figura 4 -	Curva de sobreviventes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a); na formulação adicionada de Immucell® (b); na formulação adicionada de Colhibin® (c) e na formulação adicionada de Revitalin® (d) (n =3)	39-40
Figura 5 -	Curva de sobreviventes de <i>Candida albicans</i> em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a); na formulação adicionada de Immucell® (b); na formulação adicionada de Colhibin® (c) e na formulação adicionada de Revitalin® (d) (n = 3)	41-43
Figura 6 -	Curva de sobreviventes de <i>Aspergillus niger</i> em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a); na formulação adicionada de Immucell® (b); na formulação adicionada de Colhibin® (c) e na formulação adicionada de Revitalin® (d) (n = 3)	43-45
Figura 7 -	Comparação em porcentagem dos valores D para as diferentes formulações desafiadas por <i>E. coli</i> .	46
Figura 8 -	Comparação em porcentagem dos valores D para as diferentes formulações desafiadas por <i>Staphylococcus</i>	47

aureus.

- Figura 9** - Comparação em porcentagem dos valores D para as 49 diferentes formulações desafiadas por *Pseudomonas aeruginosa*.
- Figura 10** - Comparação em porcentagem dos valores D para as 50 diferentes formulações desafiadas por *C. albicans*.
- Figura 11** - Comparação em porcentagem dos valores D para as 51 diferentes formulações desafiadas por *Aspergillus niger*.
- Figura 12** - Comparação das concentrações inibitórias mínimas do 58 sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *E. coli* testadas.
- Figura 13** - Comparação das concentrações inibitórias mínimas do 58 sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *S. aureus* testadas.
- Figura 14** - Comparação das concentrações inibitórias mínimas do 59 sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *P. aeruginosa* testadas.
- Figura 15** - Comparação das concentrações inibitórias mínimas do 59 sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *C. albicans* testadas.
- Figura 16** - Comparação das concentrações inibitórias mínimas do 60 sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *A. niger* testadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das preparações de uso tópico testadas	23
Tabela 2 -	Contagem de microrganismos viáveis nas matérias-primas	30
Tabela 3 -	Contagem de microrganismos viáveis nas formulações	31
Tabela 4 -	pH das preparações de uso tópico desenvolvidas	32
Tabela 5 -	Valor D obtido para as formulações com e sem macromoléculas submetidas ao teste desafio.	45
Tabela 6 -	Tempo de eliminação total do inóculo nos produtos.	46
Tabela 7 -	Teste de Adaptação realizado com a cepa padrão de <i>E. coli</i> submetida a caldo de crescimento bacteriológico adicionado de diferentes componentes presentes em formulações.	51
Tabela 8 -	Teste de Adaptação realizado com a cepa padrão de <i>S. aureus</i> submetida a caldo de crescimento bacteriológico adicionado de diferentes componentes presentes em formulações.	52
Tabela 9 -	Teste de Adaptação realizado com a cepa padrão de <i>P. aeruginosa</i> submetida a caldo de crescimento bacteriológico adicionado de diferentes componentes presentes em formulações.	53
Tabela 10 -	Teste de Adaptação realizado com a cepa padrão de <i>C. albicans</i> submetida a caldo de crescimento bacteriológico adicionado de diferentes componentes presentes em formulações.	54
Tabela 11 -	Teste de Adaptação realizado com a cepa padrão de <i>A. niger</i> submetida a caldo de crescimento bacteriológico adicionado de diferentes componentes presentes em formulações	55
Tabela 12 -	Valores de Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) por	56

cepas de organismos testadas.

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO	1
2 -	REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 -	BIOMOLÉCULAS FARMACÊUTICAS	2
2.1.1 -	Biomoléculas Farmacêuticos x Fármacos Tradicionais	4
2.1.2 -	Estabilidade de Biomoléculas Farmacêuticas	6
2.2 -	CONSERVANTES	8
2.2.1 -	Objetivos da Conservação	10
2.2.1.1-	Adaptação Microbiana	13
2.2.2 -	Reconhecimento do conceito de sistema conservante	14
2.2.3 -	Resistência cruzada de conservante a outros agentes antimicrobianos	15
2.3 -	DETERIORAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS	17
3 -	OBJETIVOS	21
3.1 -	OBJETIVO GERAL	21
3.2 -	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 -	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 -	MATERIAL	22
4.1.1 -	Equipamentos	22
4.2 -	MÉTODOS	23
4.2.1 -	Preparo das formulações de uso tópico adicionadas das biomoléculas em estudo.	23
4.2.2 -	Avaliação do pH das formulações de uso tópico	24
4.2.3 -	Avaliação da qualidade microbiana das formulações	24
4.2.3.1-	Meios de cultura	24
4.2.3.2-	Preparo das suspensões de microrganismos padrões	25
4.2.3.2.1 -	Microrganismos	25
4.2.3.2.2-	Manutenção e cultivo das cepas e preparo das suspensões de microrganismos	25
4.2.3.2.3-	Contagem de microrganismos	25

4.2.4 -	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO PREPARO DA FORMULAÇÃO.	26
4.2.4.1 -	DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE LACTOSE	26
4.2.4.2 -	DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE PRESENÇA DE <i>Pseudomonas</i> sp.	27
4.2.5 -	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NA FORMULAÇÃO	27
4.2.6 -	TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE	27
4.2.7 -	TESTE DE ADAPTAÇÃO MICROBIANA AO SISTEMA CONSERVANTE	28
4.2.8 -	TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	29
4.2.9 -	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.	29
5 -	RESULTADOS	30
5.1 -	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NAS FORMULAÇÕES.	30
5.1.1 -	Contagem de microrganismos viáveis nas matérias-primas	30
5.1.2 -	Determinação qualitativa de presença de bactérias fermentadoras de lactose na água destilada	31
5.1.3 -	Determinação qualitativa de presença de <i>Pseudomonas</i> sp.	31
5.2 -	CONTAGEM DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NAS FORMULAÇÕES	31
5.3 -	AVALIAÇÃO DO PH DAS FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO	32
5.4 -	TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE – TESTE DESAFIO	33
5.5 -	TESTES DE ADAPTAÇÃO MICROBIANA	52
5.6 -	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)	57
6 -	DISCUSSÃO	62
7 -	CONCLUSÃO	78
8 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

Fármacos e ativos cosméticos macromoleculares, derivados da biotecnologia ou extraídos de fontes naturais, são cada vez mais utilizados nas práticas clínicas. Os produtos destinados a tratamentos dermatológicos são, com freqüência, preparados em farmácias magistrais. Até há pouco tempo, uma característica comum de preparações magistrais era o uso de altas concentrações de conservantes para garantir sua qualidade microbiana. Porém, a consciência atual da toxicidade e irritabilidade causada pelos conservantes tem alterado este comportamento.

O sucesso da formulação de produtos contendo proteínas e peptídeos é dependente de manutenção de várias das características físico-químicas peculiares dessas macromoléculas, além de sua efetiva conservação. A capacidade de neutralização dos conservantes por parte das proteínas pode provocar a má conservação desse tipo de produto farmacêutico. Isso possibilita o processo de adaptação de microrganismos ao sistema conservante do produto, desenvolvendo microrganismos resistentes que poderiam ocasionar problemas futuros de contaminação e infecções, principalmente a pacientes imunodeprimidos.

Os mecanismos de resistência de microrganismos a antibióticos já foram exaustivamente estudados. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de adaptação microbiana a conservantes e os danos que esses microrganismos adaptados podem causar à saúde humana.

A idealização deste trabalho teve como base os estudos que relatam a fragilização dos sistemas conservantes presentes em produtos cosméticos que continham em sua composição macromoléculas farmacêuticas oriundas da biotecnologia e tensoativos não iônicos.

Os resultados obtidos neste estudo poderão ser projetados para entender o comportamento dos conservantes frente a diferentes tipos de macromoléculas farmacêuticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOMOLÉCULAS FARMACÊUTICAS

Fármacos macromoleculares, derivados de biotecnologia ou extraídos de fontes naturais, são cada vez mais utilizados nas práticas clínicas e representam uma importante parcela do orçamento de pesquisa e desenvolvimento das empresas biofarmacêuticas (1-3). Os produtos biofarmacêuticos, denominação dada às substâncias farmacêuticas derivadas de fontes biológicas, compõem um terço dos fármacos em desenvolvimento atualmente (4).

Qualquer fármaco cuja produção envolva microrganismos, organismos geneticamente modificados, substâncias produzidas por organismos vivos, como enzimas, ou bioprocessamento é definido como produto biofarmacêutico. Enquanto o desenvolvimento de fármacos tradicionais envolve a intersecção das áreas de química e tecnologia farmacêutica, o desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos envolve a intersecção das áreas de biotecnologia e tecnologia farmacêutica (4,5).

A tecnologia do DNA recombinante gerou um aumento no interesse de se produzir proteínas farmacêuticas nas últimas décadas (1,2,6,7). Houve um grande avanço no campo da engenharia de proteínas e peptídeos nos últimos anos e aumento da compreensão da via pela qual os modificadores de resposta biológica atuam no organismo. Assim, por meio do uso de técnicas de DNA recombinante ou por síntese de proteína em fase sólida, tornou-se possível produzir em escala comercial uma grande variedade de agentes reguladores que são terapêuticamente aplicáveis (8-10). Hoje, graças ao desenvolvimento da biotecnologia farmacêutica, proteínas e peptídeos estão sendo aplicados como agentes terapêuticos específicos e potentes, úteis como terapia substitutiva, como inibidores ou reguladores do sistema imune no tratamento de importantes doenças multifatoriais (11). Há fármacos produzidos por biotecnologia, especialmente engenharia genética ou tecnologia de hibridoma (4).

Produtos biofarmacêuticos são, portanto, grandes moléculas de proteínas complexas derivadas de células vivas. Os sistemas de produção disponíveis incluem, entre outros, células mamárias, leveduras, células de insetos e bactérias, e

a escolha do sistema de produção depende da natureza das proteínas a serem produzidas (4,5,12).

O desenvolvimento de novos fármacos e vacinas via pesquisa de biomoléculas farmacêuticas requer esforços concentrados em muitos níveis, assim como múltiplas ferramentas e habilidades específicas. Ainda assim, a indústria de produtos biofarmacêuticos é a mais importante do setor da indústria biotecnológica, e é uma das que mais cresce em termos de indústrias de alta tecnologia (4). Além disso, o uso de proteínas terapêuticas tem criado uma demanda crescente por métodos viáveis e econômicos em todas as etapas de produção (13).

De acordo com Redman e Rashdy, desde o trabalho pioneiro de Edward Jenner com o vírus cowpox no século 18, que fundamentou o caminho para os programas modernos de vacinação, milhões de pessoas já foram beneficiadas por produtos biológicos e vacinas diretamente derivados de animais, por seus análogos, ou por produtos produzidos pelas tecnologias de recombinação em vários tipos de linhagens de células microbianas e animais, e muitos mais ainda vão se beneficiar no futuro (14).

Biomoléculas têm sido produzidas e utilizadas terapêuticamente desde o século XVIII. Em 1895, von Behring estabeleceu um instituto para a produção de antitoxina da difteria e, desde que Behring e Kitassato descreveram o uso terapêutico de anticorpos animais, tem havido muito interesse no desenvolvimento destas moléculas, inclusive para o tratamento de câncer (14).

Excluindo-se o anticorpo monoclonal murino, anti-soros terapêuticos com anticorpos animais é a segunda maior categoria de produtos farmacêuticos derivados de animais, produzidos e consumidos no mundo inteiro. Há mais de 60 laboratórios em diferentes países produzindo estes produtos em diferentes animais (cavalo, carneiro, coelho, cabra e coelho ou, mais recentemente, o camelo). Mais de 10 toneladas de anticorpos terapêuticos de origem animal em diferentes formatos (Fab, F(ab)₂ ou imunoglobulina total) são produzidos anualmente contra toxinas animais, bacterianas, viróticas ou fármacos (14).

A primeira substância biofarmacêutica produzida por engenharia genética aprovada para uso terapêutico foi a insulina humana sintética, feita por tecnologia do DNA recombinante em 1982, comercializada com o nome de Humulin (4,15). No final dos anos 90, novos avanços tecnológicos na área da biotecnologia revolucionaram a fabricação e processamento de biofármacos e, em 2005, cerca de 160 produtos

biofarmacêuticos (insulina humana, interferons, hormônios de crescimento humano, anticorpos monoclonais, entre outros) já tinham aprovação médica e, mais recentemente, estão sendo comercializados pelo mundo. A grande maioria destes produtos é à base de proteínas, embora dois produtos constituídos principalmente por ácidos nucleicos estejam no mercado americano e europeu há cerca de cinco anos. Uma proporção crescente de biofármacos aprovados é derivada da engenharia genética de alguma forma e os avanços em sistemas de produção alternativos e sistemas de liberação desses fármacos também irão, provavelmente, promover um impacto sobre o perfil de aprovações durante os próximos anos (4,16).

Nos últimos anos, muitas proteínas que têm sido desenvolvidas para uso terapêutico são consumidas em doses relativamente altas, até mil vezes maior do que a dose de alguns dos biofármacos mais antigos. As demandas chegam a centenas de quilogramas por ano, o que tem levado a uma rápida expansão da capacidade de produção de biofármacos pelas empresas farmacêuticas (14). O mercado de produtos biofarmacêuticos tem crescido a uma taxa anual 15% maior do que a dos produtos farmacêuticos tradicionais, que fica em torno de 6,7% ao ano (4).

2.1.1. Biomoléculas farmacêuticas *versus* fármacos tradicionais

Biomoléculas farmacêuticas são fundamentalmente diferentes dos fármacos químicos convencionais, e a diferença começa pelo tamanho médio das moléculas dos dois tipos de fármacos. Os produtos químicos sintéticos são normalmente fármacos de pequenas moléculas, como, por exemplo, a aspirina, cuja massa molecular é de 180 Da. Em geral, os produtos biofarmacêuticos são macromoléculas complexas que são, pelo menos, 100 vezes maiores que isso, como o interferon-beta, que tem uma massa molecular de 19.000 Da, além de uma estrutura complexa e requerimentos físico-químicos apropriados para exercer sua atividade biológica. Além disso, biomoléculas farmacêuticas geralmente têm uma maior heterogeneidade que os fármacos de pequenas moléculas. (4,5,17).

O processo de fabricação e o perfil de segurança e eficácia de produtos biofarmacêuticos também são diferentes. A maioria dos biofármacos de primeira geração são anticorpos não monoclonais, não manipulados geneticamente,

extraídos de tecidos animais ou produzidos por substituições simples em proteínas com sequências de aminoácidos idênticas a de uma proteína humana nativa (5,18). O advento da tecnologia do DNA recombinante (engenharia genética) e a tecnologia dos anticorpos monoclonais (tecnologia do hibridoma) transpuseram muitas dificuldades na produção de biofármacos e marcaram uma nova era das ciências farmacêuticas. A tecnologia do DNA recombinante trouxe quatro fatores de impacto positivos na produção de proteínas de importância farmacêutica: i) superou o problema de disponibilidade de fonte; ii) superou os problemas de segurança dos produtos; iii) forneceu uma alternativa para a extração direta de fontes inapropriadas que pudessem oferecer risco; iv) facilitou a geração de proteínas terapêuticas manipuladas (ou “engenheiradas”) que podem ter vantagens clínicas sobre os produtos protéicos nativos (15). Assim, os produtos biofarmacêuticos modernos, de segunda geração, são manipulados. A engenharia desses biofármacos pode implicar em alterações nas sequências de aminoácidos, na porção glicídica de proteínas glicosiladas ou na ligação covalente a moléculas químicas, tal como o polietilenoglicol (5,18).

Em comparação com drogas químicas tradicionais, proteínas farmacêuticas têm alta especificidade e atividade em concentrações relativamente baixas. Estes aspectos têm feito das proteínas farmacêuticas produtos indispensáveis no combate a doenças humanas (19). A administração de preparações contendo proteínas ou peptídeos é atualmente parte integrante do tratamento de uma grande variedade de doenças. Além disso, há muitas macromoléculas biológicas com potencial terapêutico sob avaliação clínica, além das já registradas como agentes terapêuticos (11,16, 20-22).

As proteínas podem ser usadas no tratamento de doenças humanas de três modos diferentes: por reposição direta de um fator cuja deficiência possa estar ligada à patogênese de uma doença, como vacinas ou para conseguir intervenções altamente seletivas, em curto prazo, para modificar o processo patogênico. Esta última categoria tem crescido muito como consequência do progresso dos métodos de expressão e clonagem gênica. Em todas as categorias, a exigência do uso de macromoléculas, ao invés de moléculas mais simples, é guiada pela necessidade de um alto grau de especificidade na interação com o sítio alvo. Essa interação é sempre reforçada pela atividade catalítica em nível que ainda não pode ser obtido com o uso de moléculas químicas sintéticas (23).

Os produtos biotecnológicos têm sido adicionados não só a produtos farmacêuticos. A utilização desses como princípios ativos em cosméticos tem crescido a cada dia. A realidade é que tanto os produtos cosméticos quanto os produtos farmacêuticos têm se tornado mais complexos e cada vez mais proteínas têm sido acrescentadas aos produtos de tratamento da pele, com o intuito de prevenir ou atenuar os danos causados à pele como consequência do envelhecimento (1,2,9).

Um dos maiores desafios remanescentes no desenvolvimento de proteínas farmacêuticas é lidar com as instabilidades, química e física, dessas moléculas (2,9). A instabilidade das proteínas é um dos maiores motivos pelo qual proteínas farmacêuticas são administradas, tradicionalmente, mais por via parenteral que por via oral, que é normalmente a via de administração para a maioria das drogas químicas tradicionais (24-25).

2.1.2 Estabilidade de biomoléculas farmacêuticas

É na estabilidade que reside a maior diferença entre os compostos químicos tradicionais usados como drogas e as novas drogas compostas de peptídeos e proteínas produzidas por engenharia genética. Peptídeos e proteínas são altamente susceptíveis a ambas as instabilidades, química e física, quando comparados com drogas tradicionais (8,26-28). Isto introduz dificuldades sem igual na separação, purificação, formulação, preservação, estocagem e liberação destes compostos. A instabilidade química resulta na geração de um novo composto químico, formado através de ligação ou clivagem da molécula. A instabilidade física envolve mudanças na estrutura secundária, terciária ou quaternária da molécula, que podem ser manifestadas como desnaturação (rearranjo estrutural dentro da molécula), adsorção, agregação e precipitação. Ambas as mudanças, física e química, nos peptídeos e proteínas podem resultar numa perda de atividade biológica (6,8, 9,28,29).

De fato, a natureza físico-química complexa das proteínas aumenta seu potencial como fármacos e, ao mesmo tempo, aumenta sua fragilidade. As instabilidades física e química de proteínas constituem uma barreira indiscutível à comercialização

dos biofármacos (6,9,30,31). A grande quantidade de grupamentos funcionais presentes nas proteínas amplifica o número de processos químicos que podem ocorrer. Conseqüentemente, proteínas podem sofrer uma variedade de reações intra e intermoleculares que podem levar ao declínio ou perda da efetividade como fármaco. Além da estabilidade química, as proteínas devem manter sua estrutura tridimensional para serem efetivas como agentes terapêuticos. A perda da conformação tridimensional leva não só à perda da atividade biológica, mas também aumenta a suscetibilidade a processos de degradação, tais como agregações, covalentes ou não (9,28,29,32).

Entre os processos físicos e químicos de deterioração, a agregação de proteína é, sem dúvida, a mais comum das manifestações de instabilidade de proteínas e pode ocorrer em quase em todas as fases do desenvolvimento de drogas protéicas. A presença de quaisquer agregados insolúveis em uma proteína farmacêutica é geralmente inaceitável para a liberação do produto (9). Geralmente são os agregados protéicos que causam citotoxicidade (33). Embora um progresso significativo tenha sido feito, a atual compreensão da agregação de proteínas é ainda insuficiente (33-35). Sua prevenção ou mesmo inibição moderada tem sido quase experimental. Portanto, uma melhor compreensão do processo de agregação de proteínas é crucial no desenvolvimento de vários produtos biofarmacêuticos (9).

Assim, o sucesso da formulação a base de proteínas depende da compreensão de suas características físico-químicas e biológicas, incluindo a estabilidade química e física, a imunogenicidade e propriedades farmacocinéticas (29,36).

Existem, porém, problemas relacionados à administração e biodisponibilidade de proteínas e peptídeos usados como agentes terapêuticos. A modificação química dessas moléculas bioativas com polietilenoglicol e seus derivados pode ser usada para ajustar as propriedades moleculares para aplicações particulares, para eliminação de propriedades desvantajosas ou para conferir novas funções moleculares. Além das vantagens que oferece com relação à farmacocinética das proteínas, a complexação com polietilenoglicol e seus derivados também é utilizada na estabilização química dessas e de outras moléculas bioativas, pois a complexação aumenta a estabilidade da proteína frente ao calor, desnaturantes químicos e proteólise, e aumenta também a solubilidade e a atividade de enzimas em solventes orgânicos hidrofóbicos (11,37,38,39). Entretanto, proteínas conjugadas com polietilenoglicol pertencem a uma nova classe de biomoléculas que não são

proteínas nem polímeros, mas um híbrido destes dois compostos, e as estratégias ou critérios para se produzir uma biomolécula conjugada com polietilenoglicol bem caracterizada ainda são um desafio (11,38,39,40).

Outro problema que resulta da estrutura química desses novos produtos é a conservação. Sabe-se que as proteínas são neutralizadores de conservantes, e tanto isso é conhecido que as proteínas são mesmo utilizadas em processos de controle de qualidade microbiológico para impedir a interferência dos conservantes nas análises para determinação do número de microrganismos viáveis nas formulações (27,32).

Além das proteínas, outros componentes comuns nas formulações de uso tópico e que agem como neutralizadores de conservantes são os tensoativos, sendo que o efeito de neutralização é maior para os compostos não iônicos do que para compostos aniônicos e catiônicos (27,42). A interferência dos tensoativos não iônicos na atividade dos parabenos, uma classe de conservantes utilizados em cosméticos, foi descrita pela primeira vez em 1950 por Bolle e Mirimanoff, e, desde então, vários trabalhos confirmaram essas observações (43).

2.2 CONSERVANTES

Conservantes são substâncias adicionadas a produtos farmacêuticos e cosméticos para prevenir ou retardar a deterioração microbiana. Eles são um importante meio de limitar o crescimento microbiano em vários tipos de produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos, como também em outras áreas especializadas (44). Conservantes antimicrobianos são usados para reduzir a probabilidade de crescimento microbiano em produtos aquosos e para reduzir a chance de sobrevivência microbiana em produtos anidros que podem ser contaminados ou umedecidos durante o seu uso (45). Agências reguladoras governamentais indicam o uso de conservantes em todas as formulações farmacêuticas multidosas (46).

Os conservantes têm como alvo bactérias, bolores e leveduras. A escolha do conservante é uma tarefa complexa, porque os compostos fungicidas são tidos como os que possuem maior probabilidade de causar reações tóxicas ou de

hipersensibilidade em humanos em relação àqueles que têm atividade bactericida (47,48). Os conservantes 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* (49).

Além disso, o número de compostos químicos permitidos para uso como conservantes em alimentos e produtos farmacêuticos é limitado. Isso ocorre, principalmente, devido aos problemas de toxicidade e potencial alergênico desses compostos. Assim, é claro o cuidado necessário no momento da escolha de um conservante a ser empregado para que o melhor desempenho possível seja conseguido com o menor potencial de toxicidade (50). Fármacos estéreis acondicionados em recipientes com múltiplas doses devem ter um sistema conservante que seja capaz de os auto-esterilizar, pois eles também estão sujeitos à contaminação. Produtos aquosos não estéreis precisam de sistemas conservantes que sejam capazes de reduzir sua carga microbiana a níveis aceitáveis em um período de tempo razoável e que garanta a ausência de patógenos (51-53).

Porém, de modo geral, todos os agentes conservantes são tóxicos. Para maximizar a proteção aos consumidores, a concentração de conservantes que se mostra efetiva no produto final deve estar bem abaixo dos níveis tóxicos para humanos. (46).

O objetivo da conservação de produtos farmacêuticos é assegurar que o produto esteja microbiologicamente seguro e estável. O teste de eficácia de conservante é realizado para determinar o tipo e a concentração mínima efetiva de conservantes requerida para conservar o produto durante a fabricação e durante o período de uso pelo consumidor. Esse teste é parte essencial da documentação da segurança e estabilidade desses produtos (45,54).

Geralmente, somente a fração não-dissociada da molécula de um conservante é ativa, pelo fato de sua porção ionizada ser incapaz de penetrar na célula do microrganismo. Deste modo, o conservante selecionado deverá estar na forma não dissociada no pH da formulação. Portanto, a conservação de medicamentos envolve formulação (incluindo agentes conservantes), controle de qualidade de matérias-primas e material de envase, aderência às boas práticas de fabricação e armazenamento sob condições apropriadas (45).

Incompatibilidades que resultam em inativação de conservantes envolvem macromoléculas como derivados de celulose, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol, Tween 80, Myrj 52, entre outros. A temperatura de armazenamento de produtos, assim como as interações com tensoativos ou outras substâncias, pode modificar a concentração de conservantes livres na fase aquosa (45).

Em quase todas as formulações farmacêuticas há fatores propiciadores ou inibidores do crescimento microbiano, como o pH, o efeito osmótico e a presença de substâncias tóxicas. O balanço entre esses fatores, incluindo a presença de conservantes, determina o crescimento microbiano ou taxa bactericida. Deteriorações químicas ou físico-químicas podem produzir formulações com uma significativa contaminação microbiana e vice-versa (45).

2.2.1 Objetivos da Conservação

Sabe-se, há muitos anos, que contaminantes microbianos podem causar a deterioração de produtos farmacêuticos por meio de mudanças químicas e físicas, tornando-os impróprios para uso. Alterações químicas são algumas vezes acompanhadas pela formação de gás, alteração de cor e odor ou produção de sabor indesejável. Reações químicas catalisadas por uma ampla variedade de enzimas produzidas por microrganismos incluem hidrólise, desidratação, oxidação, redução, descarboxilação, desaminação, fosforilação e desfosforilação (46,55).

Bactérias, bolores e leveduras têm requerimentos metabólicos diversos e são capazes de crescer em produtos farmacêuticos aquosos quando nutrientes estão disponíveis e quando as condições ambientais são suficientes. A regulação do crescimento microbiano por agentes físicos e químicos foi estudada por Moat e Foster (56). O entendimento do modo como esses fatores controlam o crescimento microbiano é necessário para determinar as características do sistema conservante em um produto.

Fármacos podem ser metabolizados e transformados, assim, em formas menos potentes ou quimicamente inativas. Além disso, agentes terapêuticos diversos podem ser metabolizados e utilizados como substrato para o crescimento de microrganismos (46).

Os riscos do uso de produtos contaminados são devidos às infecções e danos que os microrganismos podem causar à saúde humana. Várias investigações conduzidas entre 1969 e 1977 revelaram contaminações de cosméticos, produtos de higiene e medicamentos (57-59). McCarthy relatou que padrão similar de contaminação de produtos não estéreis foi observado em indústrias farmacêuticas e cosméticas. Apesar de que a maioria dos fabricantes tem identificado os pontos críticos de controle nos processos e implementado procedimentos validados para prevenir a contaminação microbiana, problemas ocasionais de contaminação ainda ocorrem (60-61).

Em 1968, Dunnigan classificou os gêneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Candida* como de risco à saúde (67). Bruch, em 1972, refinou esta classificação de microrganismos patogênicos de acordo com o tipo de produto. Os efeitos diretos dos microrganismos em infecções e doenças têm sido observados por muitos anos, mas o papel desses atuando na inflamação, imunomodulação e alterando a fisiologia humana somente estão começando a ser estudados (68,69).

Nas décadas de 60 e 70 do século passado, vários foram os relatos de infecções devido ao uso de produtos contaminados. Loções para mãos e cremes foram identificados como fontes de infecções hospitalares que resultaram em septicemia devido a bactérias Gram negativas, particularmente *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, e *Serratia spp* (61). Em 1966, Noble e Savin relataram contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* em um creme com esteróides conservado com clorocresol. A contaminação foi causada por um decréscimo no nível de conservante na fase aquosa do produto, devido à partição do conservante com a fase oleosa, e a contaminação do produto foi facilitada pela prática da reutilização de recipientes de embalagem (62,63).

Vários estudos demonstraram também a conservação inadequada de máscaras como a causa de lesões nos olhos. Bhadaurie e Ahea observaram, em 1980, que os sistemas conservantes de máscaras não usadas deterioram com o tempo (64). Similarmente, em 1987, Orth e colaboradores demonstraram a diminuição da eficácia do conservante em xampus contendo proteína durante o teste de estabilidade em diferentes temperaturas. Estudos têm relatado a adsorção de conservantes por materiais de acondicionamento e por determinadas matérias-

primas (talco, óxido de ferro e corantes), além de sua inativação por tensoativos (65,66).

Os problemas causados pela contaminação microbiana podem ser minimizados pelo uso de matérias-primas isentas de carga microbiana, pela aderência às boas práticas de fabricação para redução da contaminação microbiana ocorrida durante o processo, pela utilização de sistemas conservantes nas formulações e pela esterilização dos produtos, quando possível (45).

Porém, o uso de alguns produtos por consumidores, repetidamente, sujeita esses produtos à contaminação (54). Para prevenir a deterioração microbiana de produtos ao longo de seu consumo e pelo seu prazo de validade pretendido, fabricantes adicionam conservantes químicos em suas formulações (47). A água é uma matéria-prima comum em cosméticos e em medicamentos de formulações tópicas e há, muitas vezes, a entrada de água em produtos anidros durante o uso (70). A água expõe o produto à contaminação por bactérias e fungos.

Assim, a contaminação por microrganismos pode ocorrer em resíduos de produtos presentes nas beiradas dos frascos de acondicionamento se os resíduos forem diluídos com água ou fluidos corporais contaminados (sangue, urina, fluidos de tecidos). Esses microrganismos podem se tornar adaptados a produtos e podem ser introduzidos dentro do mesmo enquanto a tampa estiver removida, resultando numa contaminação microbiana que permanece no produto (49).

Cosméticos normalmente não são estéreis e são liberados para o mercado de acordo com os critérios de aceitabilidade da *Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association* (CTFA), que preconiza um limite de não mais que 500 UFC/g ou mL para produtos da área dos olhos e não mais que 1.000 UFC/g ou mL para os demais produtos. O CTFA recomenda um limite microbiano < 500 UFC/g ou mL para bactérias Gram positivas para lançamento do produto no mercado, e critérios mais rígidos para bactérias Gram negativas, que devem ser evitadas em qualquer nível. O CTFA não tem um limite microbiano em seus guias para produtos em uso (71).

2.2.1.1 Adaptação Microbiana

Os microrganismos possuem diversas capacidades metabólicas e utilizam inúmeros compostos orgânicos, e alguns inorgânicos, como substrato para crescer (72). A modulação do metabolismo de bactérias em resposta a substratos no ambiente e o problema da adaptação microbiana têm sido reconhecidos em vários trabalhos (72-74). Até mesmo conservantes podem ser utilizados como substratos. Em 1976, Close e Nielsen relataram o isolamento de uma cepa de *Burkholderia cepacia* em emulsões do tipo óleo-água conservadas com metilparabeno e propilparabeno. Esse microrganismo isolado era capaz de hidrolisar ésteres de parabenos e podia usar propilparabeno como fonte de carbono e energia em meio mínimo (75).

Yablonski, em 1978, observou a importância da limpeza e sanitização de equipamentos para prevenir a contaminação microbiana durante o processo de fabricação. Equipamentos inapropriadamente limpos e sanitizados permitem a presença de resíduos diluídos que possibilitam a adaptação dos microrganismos ao produto, que se tornam propícios à contaminação pelos mesmos (77-78).

Levy, em 1987, confirmou que o teste de eficácia do conservante deveria ser realizado para organismos que exibissem os mais altos níveis de resistência nos produtos conservados (73). As cepas selecionadas para cada teste deveriam ser, no mínimo, organismos difíceis de inativar quando contaminassem o produto, tanto durante a fabricação quanto durante o uso por consumidores. O uso especificamente de organismos adaptados não é, entretanto, recomendado para testes rotineiros porque os organismos de importância para as indústrias cosméticas e farmacêuticas podem se adaptar para sobreviver e crescer em produtos conservados. Então, o uso de organismos adaptados em teste de eficácia de sistemas conservantes pode fazer com que os testes sejam impossíveis de serem realizados, devido ao fato de que esses organismos podem não morrer quando introduzidos em produtos para os quais eles estão adaptados (73).

O problema da adaptação microbiana não pode ser resolvido com o aumento da potência do sistema conservante em todos os produtos, pois isso poderia requerer o uso de concentrações de conservantes acima das toxicologicamente aceitas. Assim,

embalagens alternativas ou reformulação dos produtos podem ser indicadas para a eliminação destas contaminações (79-81).

2.2.2 Reconhecimento do conceito de sistema conservante

Muitas vezes, a ação conservante de uma formulação é considerada sendo devida somente ao conservante usado. Entretanto, na prática, o sistema conservante de um produto envolve tanto a conservação química específica quanto a constituição físico-química do produto (82). Conservantes químicos não agem independentemente do produto. Então, fatores como pH, atividade da água, disponibilidade de nutrientes, concentração de tensoativos, agentes sequestrantes, componentes não-aquosos, ingredientes insolúveis e materiais interferentes (antibióticos, antioxidantes) podem influenciar a ação de conservantes em qualquer formulação (52).

Há muitos componentes das formulações que podem contribuir com o sistema conservante de um produto. Em algumas formulações, é possível usar esses componentes para reduzir ou eliminar o uso de conservantes (81-84). Um exemplo de um produto auto-conservado pode ser um condicionador de cabelo com compostos de amônio quartenário com pH menor que 4. De qualquer modo, o teste de eficácia do sistema conservante é necessário para demonstrar que a formulação se encontra adequadamente conservada (55).

A escolha do conservante depende da formulação. A presença de antibióticos em uma formulação pode fazer com que o uso de conservantes específicos seja desnecessário. O tipo e a concentração do antimicrobiano poderão determinar se agentes adicionais antimicrobianos serão requeridos (63).

Microrganismos podem ser metabolicamente prejudicados ou estressados por serem expostos a várias condições físicas e químicas, como o calor em temperaturas subletais, frio, secura, peróxido de hidrogênio, pH ácido e desinfetantes. Microrganismos estressados geralmente são mais suscetíveis a estresse secundário criado por condições físico-químicas adversas encontradas em sistemas conservantes (84-86).

O entendimento das características de um conservante ajuda a prover as bases para seleção racional dos agentes mais adequados para uma dada formulação. As características desejadas de um conservante ideal têm sido discutidas por muitos autores e incluem o seguinte: o conservante deve ter um largo espectro de atividade; deve ser efetivo e estável em faixa de valores de pH encontrados em produtos cosméticos e farmacêuticos; ser compatível com outros componentes em uma formulação e com materiais de embalagem; não deve afetar as propriedades físicas do produto (cor, odor, sabor, viscosidade, textura); deve ter um coeficiente de partição óleo/água adequado para garantir uma concentração efetiva de antimicrobiano na fase aquosa do produto; ser seguro para uso; obedecer regulamentações governamentais; deve ter um custo/benefício aceitável para uso; e deve inativar microrganismos rapidamente o suficiente para prevenir a adaptação microbiana ao sistema conservante (44).

Conservantes são usados em produtos aquosos para exercer ação bactericida e fungicida em curto espaço de tempo, para atingir critérios conhecidos de aceitabilidade, prevenir o crescimento e a adaptação microbiana (52,61) e para reduzir a probabilidade da persistência microbiana em produtos anidros que possam ser contaminados e misturados à água durante o uso. Acredita-se que quando há contaminação de um produto por microrganismos, estes podem desenvolver resistência ao sistema conservante do produto se este não os eliminar com velocidade suficiente para prevenir modificações biológicas ou genéticas (produção de enzimas, modificação de vias metabólicas, detoxificação mediada por hidroxidases e oxigenases) que capacitem os microrganismos a se adaptarem ao produto (52,61).

2.2.3 Resistência cruzada a conservantes a outros agentes antimicrobianos

Resistência e tolerância bacteriana a agentes antibióticos, e seus mecanismos, são muito estudados. Em contraste, os mecanismos de insuscetibilidade a agentes não-antibióticos, como conservantes e antissépticos, não são bem entendidos (86).

Para antibióticos, o alvo específico em células microbianas já é conhecido, já para biocidas, incluindo agentes conservantes, são consideradas múltiplas ações na

célula, incluindo alterações da permeabilidade de membrana, inativação de enzimas e interferência em ácidos nucleicos. Por muitos anos acreditou-se que bactérias não poderiam desenvolver resistência a biocidas. Nos últimos anos, esta crença tem sido desafiada por resultados que demonstram que as bactérias desenvolveram resistência a biocidas, como triclosana, clorexidina, compostos de amônio quaternário, entre outros. O progresso lento, mas contínuo, nessa área, entretanto, sugere que a resistência bacteriana a não-antibióticos pode envolver mecanismos tão sofisticados de resistência como os expressos para antibióticos (88). O aumento da resistência a antibióticos e a desinfetantes pode ser devido à mutação ou aquisição de material genético por transferências de gene horizontal ou por agentes antimicrobianos. Exposição a condições aeróbicas capacitam as células a desenvolverem tolerância ao estresse oxidativo. Foi demonstrado que a exposição de células a doses subletais de peróxido de hidrogênio aumenta a resistência de *E. coli* e *Salmonella* ssp ao agente. Falta de nutrientes ou baixos níveis de atividade da água resultaram em taxas menores de morte para *P. aeruginosa* durante o teste de eficácia do sistema conservante em outros estudos (89). Entretanto, esses trabalhos não demonstraram a presença de diferentes níveis de proteínas de choque; seus achados mostraram que a exposição ao estresse ajuda a preparar a população para sobreviver a outro tipo de estresse.

Desinfetantes com óleo de pinho, salicilatos e outros ácidos fracos podem induzir resistência a múltiplos antibióticos em uma série de organismos. McDonnel e Russell (88) relataram aumento da resistência cruzada ao calor, etanol e ácido hipocloroso. Esses relatos sugerem que a exposição a concentrações subletais de biocidas pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos com aumento da tolerância aos biocidas e outros agentes antimicrobianos (89). Não há dados suficientes para relacionar o desenvolvimento de resistência a antibióticos causada por antimicrobianos ou biocidas em estudos de laboratório que ocorrem sob condições de uso do produto. Entretanto, fabricantes de cosméticos e produtos farmacêuticos devem desenvolver programas que garantam que os seus produtos não irão promover o desenvolvimento de resistência dos microrganismos (89).

Considerando a sensibilidade relativa de vários tipos de bactérias a conservantes de produtos farmacêuticos, é pertinente discutir os mecanismos envolvidos em suas respostas a agentes químicos. A resistência bacteriana a conservantes é essencialmente de dois tipos: resistência intrínseca ou resistência adquirida. Esta

última é resultado de mudanças genéticas na célula bacteriana e pode ser decorrente tanto de mutação quanto da aquisição de material genético de outra célula (44).

2.3 DETERIORAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

A capacidade dos microrganismos de produzir deteriorações por degradação em produtos farmacêuticos ou cosméticos depende de suas habilidades em sintetizar enzimas adequadas. Produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos e outros produtos estão em risco pelo fato dos microrganismos serem extremamente versáteis e adaptáveis em suas capacidades de sintetizar enzimas de degradação. Assim, uma das características desejáveis num conservante seria a de incapacitar a adaptação de microrganismos; isto reduziria a probabilidade da contaminação do produto que poderia ocorrer como resultado de mau uso. Porém, parece razoável esperar que a adaptação microbiana possa ocorrer na presença de concentrações subletais de um conservante, que são aquelas que estão abaixo da concentração inibitória mínima e podem ocorrer como resultado da incompatibilidade do conservante com outro componente da formulação ou com o recipiente. Na realidade, os microrganismos têm diversas aptidões metabólicas e são realmente hábeis para utilizar inúmeros compostos orgânicos como substrato. Isso mostra a importância de se utilizar um conservante, ou sistema conservante, adequado, e de se conhecer a concentração mínima necessária para a sua eficácia (77,90).

A presença de microrganismos nos produtos farmacêuticos e cosméticos, como mencionado anteriormente, pode levar a infecções ou degradação do produto, com possível mudança de coloração da forma farmacêutica, produção de gás e formação de odores. Essas mudanças ocorrem, principalmente, quando o microrganismo contaminante é um organismo que causa deterioração do produto. Entretanto, a maior ameaça em termos de contaminação é a presença de patógenos que possam potencialmente causar problemas de saúde. Microrganismos patogênicos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, são freqüentemente encontrados em cosméticos contaminados (91). Até mesmo as

deteriorações causadas por microrganismos não patogênicos podem causar doenças sob condições específicas (48).

Uma variedade de conservantes pode ser utilizada na formulação de cosméticos para prevenir a contaminação por patógenos ou microrganismos deteriorantes. Esse uso estende o tempo de validade dos produtos. Deste modo, é importante que a fórmula do produto se constitua como um ambiente hostil, onde os microrganismos não possam crescer ou sobreviver, ou seja, que confira características microbiocidas e microbiostáticas. Além disso, espera-se que a atividade do conservante seja suficientemente rápida para garantir que qualquer contaminação introduzida pelo consumidor seja eliminada no período entre usos. Dentre alguns dos conservantes que podem ser citados e que são comumente utilizados nesses tipos de formulações estão o benzil álcool, ácido bórico, ácido sórbico, clorexidina, formaldeído, parabenos, compostos derivados de amônio quartenário, fenol, compostos com imidazolidinil, entre outros (48).

Apesar de sua importância, a ciência da conservação de produtos farmacêuticos e cosméticos somente vem sendo tratada como alvo científico nos últimos anos. Anteriormente a conservação era obtida pela utilização de agentes germicidas, ainda que com estes houvesse maiores possibilidades de riscos. Atualmente, uma maior importância é dada ao assunto conservação não apenas devido à preocupação com o aspecto microbiológico, mas também pelo potencial de toxicidade e de irritabilidade dos conservantes (92). Assim, um fator que deve ser analisado é o fato de que conservantes são moléculas que podem ser tóxicas para os consumidores e que podem causar alergias e outros problemas de pele. Isso pode ser explicado, em parte, pelo fato dos conservantes usados em cosméticos serem efetivos tanto contra células eucarióticas como contra procarióticas, diferentemente dos antibióticos que agem especificamente contra um determinado tipo de células (93).

Cosméticos, Produtos de Higiene e Perfumes, definidos pela legislação vigente como *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, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e protegê-los ou mantê-los em bom estado* (94), não têm a necessidade de serem estéreis, mas precisam ser adequadamente conservados ou mesmo protegidos de contaminações microbiológicas e deteriorações. Quando os

consumidores utilizam produtos cosméticos, eles repetidamente estão desafiando a capacidade dos sistemas conservantes desses cosméticos em eliminar microrganismos presentes, por exemplo, em suas mãos. O crescimento microbiológico pode ocorrer, ainda, em artigos cosméticos e de higiene armazenados em locais onde estejam sujeitos a altas temperaturas ambiente e umidade (48,95).

Além disso, a conservação também pode ser comprometida pela estrutura química de produtos biofarmacêuticos. Sabe-se que as proteínas são neutralizadores de conservantes. Elas são utilizadas em processos de controle de qualidade microbiológico para impedir a interferência dos conservantes nas análises que determinam o número de microrganismos viáveis nas formulações (27,32).

Além das proteínas, os tensoativos, outros componentes comuns nas formulações de uso tópico, agem como neutralizadores de conservantes. Está comprovado que o efeito de neutralização é maior para os compostos não iônicos do que para compostos aniônicos e catiônicos (27,41). Bolle e Mirimanoff descreveram pela primeira vez, em 1950, a interferência dos tensoativos não iônicos na atividade dos parabenos, uma classe de conservantes utilizados em cosméticos, e, a partir disso, vários trabalhos confirmaram essas observações (43). A presença desses dois componentes, proteínas e tensoativos não iônicos, numa mesma formulação, poderia acarretar em alguns problemas de conservação. Portanto, o uso concomitante dos tensoativos e das proteínas ou peptídeos em formulações cosméticas ou em sistemas farmacêuticos, principalmente o uso de tensoativos não iônicos, mais comumente utilizados, pode ser questionado. Talvez isso possa proporcionar a inativação do conservante ou, ainda que o tensoativo e a proteína não eliminem a atividade do conservante, talvez eles possam reduzir essa ação a ponto de proporcionar a adaptação dos microrganismos a certos conservantes.

Os conservantes metilparabeno, propilparabeno e imidazolidinil uréia são os mais utilizados em produtos cosméticos de uso tópico segundo o *Food and Drug Administration* (FDA), O'Brien e Steinbergh, e quando utilizados em conjunto mostram uma das melhores atividades sinérgicas em termos de conservação se comparados a outros sistemas conservantes utilizados concomitantemente em formulações tópicas (96-98). Porém, estudos recentes demonstraram que a adição de 0,1% de superóxido dismutase, comumente utilizada em preparações cosméticas em concentrações de 0,1 a 0,5%, foi capaz de modificar o comportamento de

eficácia de uma associação desses conservantes em uma formulação de uso tópico do tipo gel creme (99).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um sistema conservante, composto de metilparabeno, propilparabeno e imidazolidinil uréia, de uma formulação base e desta mesma formulação adicionada de diferentes biomoléculas farmacêuticas, além de realizar estudos de adaptação microbiana frente ao sistema conservante das formulações que contêm estas biomoléculas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de formulações do tipo gel creme contendo um tensoativo não iônico, o sistema conservante composto por metilparabeno, propilparabeno e imidazolidinil uréia, e uma das biomoléculas em estudo, Colhibin[®], Immucel[®] ou Revitalin[®].
- Avaliação da qualidade microbiana das matérias-primas utilizadas na preparação das formas farmacêuticas.
- Contagem de microrganismos viáveis das formulações base e adicionada das diferentes biomoléculas.
- Avaliação da eficácia do sistema conservante na formulação base e na mesma formulação adicionada das diferentes biomoléculas.
- Estudos de adaptação microbiana frente ao sistema conservante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Neste estudo foram utilizados reagentes de grau analítico nos ensaios e matérias-primas de grau analítico ou farmacêutico para o preparo das formulações.

As biomoléculas utilizadas foram:

- Immucell[®] - (glicoproteínas - *INCI*; *CTFA*) - mistura composta, prioritariamente, de oligopeptídeos glicosilados, além de proteínas e aminoácidos;
- Colhibin[®] - (hidrolisado de proteínas – *INCI*; *CTFA*) - fração isolada de peptídeos de arroz.
- Revitalin[®]-BT - (glicoproteínas – *INCI*; *CTFA*) - é uma combinação de constituintes citoplasmáticos e mitocondriais naturais, específicos, selecionados de cepas de espécies de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todas as biomoléculas foram adquiridas da Penthapharm (Basel, Suíça) e são conservadas com 0,5% de Phenonip[®] (constituído de parabenos - metil, etil, butil, propil e isobutil parabenos - e fenoxietanol).

Os meios de cultura usados foram das marcas Acumedia[®] ou Himedia[®].

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Placa aquecedora Fisaton;
- Estufa MA033 – Marconi.
- Estufa FANEM Ltda – São Paulo.
- Geladeira Cônsul biplex frost free 420.
- Destilador de água - GFL 2008.
- Fluxo Laminar Labculture - ESCO Class II type A2.
- Balança eletrônica Marte[®] - modelo As 500C.
- Balança Analítica Chyo[®].
- Autoclave Vertical Línea AV plus.

- Agitador de tubos vórtex Super Mixer, Lab-line instruments Inc.
- Potenciômetro - Accumet[®] Research – AR15 pH Meter - Fisher-Scientific.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das formulações de uso tópico adicionadas das biomoléculas em estudo.

A composição das formulações de uso tópico que foram utilizadas nos ensaios está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das preparações de uso tópico testadas.

	Formulação base (g %)	Formulação com Immucell[®] (g %)	Formulação com Colhibin[®] (g %)	Formulação com Revitalin[®] (g %)
Carbômero (Carbopol[®] 940)	0,30	0,30	0,30	0,30
Metilparabeno (Metilparabeno[®])	0,15	0,15	0,15	0,15
Propilparabeno (Propilparabeno[®])	0,05	0,05	0,05	0,05
Imidazolidinil uréia	0,15	0,15	0,15	0,15
Base auto-emulsificante não-inônica (Cosmowax[®] J)	2,00	2,00	2,00	2,00
Glicerina	5,00	5,00	5,00	5,00
Trietanolamina	0,30	0,30	0,30	0,30
Immucell[®]	-	3,00	-	-
Colhibin[®]	-	-	3,00	-

Revitalin®	-	-	-	3,00
Água destilada	q.s.p. 100,00	q.s.p. 100,00	q.s.p 100,00	q.s.p 100,00

As matérias-primas hidrossolúveis, com exceção da trietanolamina e da imidazolidinil uréia, e as lipossolúveis foram aquecidas separadamente a 75°C. A porção aquosa foi vertida sobre a oleosa e a esta mistura foi adicionada a trietanolamina. A mistura foi agitada até completa homogeneização e resfriamento e só então foram adicionadas a imidazolidinil uréia e as biomoléculas em estudo.

4.2.2 AVALIAÇÃO DO pH DAS FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO.

Uma alíquota de cada uma das preparações cosméticas foi diluída em água destilada, numa concentração final de 10% (p/v), e teve seu pH determinado após 24 h de preparo.

4.2.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIANA DAS FORMULAÇÕES.

4.2.3.1 Meios de cultura.

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram o caldo e o ágar de caseína-soja, para bactérias, e o caldo e o ágar de Sabouraud-dextrose, para bolores e leveduras. Todos os meios de cultura foram preparados a partir do meio de cultura desidratado e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.2.3.2 Preparo das suspensões de microrganismos padrões.

4.2.3.2.1 Microrganismos.

Os seguintes microrganismos padrões foram utilizados para os ensaios de controle de qualidade microbiológico: *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923 (Gram positiva), *Escherichia coli* - ATCC 25922 (Gram negativa – coliforme), *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 (Gram negativa), *Candida albicans* - ATCC 10231 (levedura) e *Aspergillus niger* - ATCC 16404 (bolor).

4.2.3.2.2 Manutenção e cultivo das cepas e preparo das suspensões de microrganismos.

As cepas originais foram mantidas congeladas na forma de culturas em meio sólido inclinado (*slants*), cobertas por óleo mineral. Quando necessárias para os estudos, essas cepas foram adequadamente descongeladas, semeadas em meios de cultura frescos e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Essas culturas foram utilizadas para repiques e formação de novas culturas, e utilizadas nos ensaios.

4.2.3.2.3 Contagem de microrganismos.

A contagem de microrganismos das suspensões de bactérias e leveduras utilizadas para preparo dos inóculos foi feita pelo método de turbidimetria. As suspensões de microrganismos foram obtidas por adição de massa celular a 9 mL de solução fisiológica, com o auxílio da alça de platina, até que a suspensão obteve a mesma turbidez do tubo número 1 da escala de MacFarland (100). Essas suspensões ou suas diluições foram utilizadas nos ensaios de controle de qualidade

microbiológico. A escala de MacFarland foi preparada de acordo com método descrito por Bier (100). A contagem das suspensões de esporos de *A. niger* foi feita com auxílio da câmara de Neubauer.

4.2.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO PREPARO DA FORMULAÇÃO.

As matérias-primas utilizadas no preparo das formulações foram submetidas à análise microbiológica. A contagem de bactérias mesófilas e fungos totais foi efetuada pelo método convencional de semeadura em superfície, usando solução salina para as matérias-primas que não continham conservantes ou um diluente apropriado para inativar o sistema conservante no caso da presença de conservantes. No caso das bactérias mesófilas, as placas de ágar caseína-soja foram incubadas a 37°C e examinadas diariamente. A contagem de fungos foi executada por semeadura das amostras em placa de ágar Sabouraud-dextrose e incubadas a 30°C por 7 dias.

4.2.4.1 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS FERMENTADORAS DE LACTOSE.

A água destilada utilizada no preparo das formulações foi inoculada em 3 séries de 5 tubos com meio de cultura lactosado, contendo lauril sulfato de sódio e tubos de Duhran, para determinação da presença de bactérias fermentadores de lactose. Na primeira série foram inoculados 10 mL de água, na segunda série 1 mL e na terceira 0,1 mL. Os meios foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C e a presença de bactérias fermentadoras foi avaliada pela produção de gás nos meios.

4.2.4.2 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE PRESENÇA DE *Pseudomonas* sp.

Uma alíquota de 50 mL da água destilada utilizada no preparo das formulações foi filtrada em membrana estéril com poros de 0,22 µm de diâmetro, a qual foi inoculada em caldo de caseína e soja. Após incubação em estufa bacteriológica a 37°C, uma alíquota deste meio foi inoculada por esgotamento em meio ágar cetrimida, seletivo para *Pseudomonas* sp.

4.2.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NA FORMULAÇÃO.

A contagem de bactérias mesófilas e fungos totais foi efetuada pelo método convencional de semeadura em superfície, usando um diluente apropriado para inativar o sistema conservante. No caso das bactérias mesófilas, as amostras foram inoculadas em placas de ágar caseína-soja que foram incubadas a 37°C e examinadas diariamente. A contagem de fungos foi executada por semeadura das amostras em placa de ágar Sabouraud-dextrose, incubadas a 30°C por 7 dias.

4.2.6 TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE.

A eficácia do sistema conservante foi avaliada pelo teste desafio. Para executar o teste foram adicionados 10^6 microrganismos por g de produto, quando o teste foi realizado para bactérias, ou 10^5 microrganismos por grama de produto para bolores e leveduras. Logo após a adição da carga microbiana, a formulação foi agitada para uma distribuição homogênea dos microrganismos e uma amostra desta formulação contaminada foi diluída em um neutralizador adequado, semeada em meio sólido, incubada e o número de UFC/g de formulação foi determinado. Esse processo foi

repetido em tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas e 56 dias após o inóculo, conforme ilustrado em figura 1. Para verificação da eficácia do sistema conservante, uma curva de decréscimo de carga microbiana foi traçada e o valor D foi calculado sempre que possível, ou seja, sempre que a linearidade da curva descendente de crescimento microbiano foi maior que 0,9. Para o cálculo do valor D, o inverso negativo do coeficiente angular foi determinado, segundo metodologia descrita por Orth (74). O valor D, ou tempo de redução decimal (TRD), representa o tempo necessário para reduzir o número inicial de microrganismos viáveis em 90%, ou em um ciclo logarítmico (54).

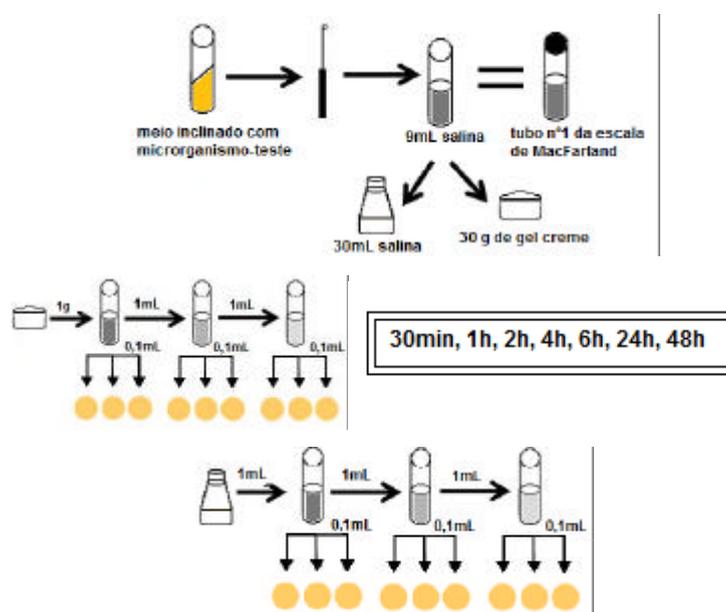


Figura 1 – Esquema da realização de teste desafio

4.2.7 TESTE DE ADAPTAÇÃO MICROBIANA AO SISTEMA CONSERVANTE.

Os microrganismos testes foram semeados para crescimento em meio líquido contendo o sistema conservante em diferentes concentrações e na presença das diferentes biomoléculas e do tensoativo em estudo, começando da menor concentração de conservante e passando para uma maior sucessivamente, como descrito por Favet e colaboradores (90), até que se encontrasse a maior concentração do sistema conservante em que cada microrganismo fosse capaz de

sobreviver. Para cada microrganismo crescido em uma concentração máxima, foi feita uma semeadura em meio sólido e as culturas foram mantidas congeladas e cobertas com óleo mineral como as cepas padrões. Estes microrganismos foram submetidos a um teste de concentração inibitória mínima, juntamente com os microrganismos padrões, para avaliação da adaptação dos mesmos.

4.2.8 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.

Os microrganismos padrões e as cepas obtidas após o ensaio de adaptação microbiana foram submetidos a um teste de concentração inibitória mínima (ensaio da diluição seriada), como descrito por Kavanagh (101), para comparação da menor concentração de conservantes capaz de eliminar os microrganismos submetidos ao teste de adaptação e as cepas padrões. Cada microrganismo foi semeado em meio líquido com diferentes concentrações do sistema conservante, mantendo-se a proporção dos conservantes usados na formulação

4.2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

Sempre que pertinente, os resultados obtidos nos ensaios foram analisados estatisticamente. Para verificar se testes paramétricos ou não-paramétricos deviam ser empregados, foram realizados testes preliminares de normalidade da distribuição amostral. Quando adequado, os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o teste *two-way* ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NAS FORMULAÇÕES.

5.1.1 Contagem de microrganismos viáveis nas matérias-primas

As matérias-primas utilizadas no preparo das formulações foram submetidas à análise microbiológica. Os resultados das contagens de microrganismos viáveis nas mesmas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Contagem de microrganismos viáveis nas matérias-primas.

Matéria-prima	Carga microbiana (UFC/g)	
	Bactérias	Fungos
Colhibin [®]	0	10
Immucell [®]	0	0
Revitalin [®]	100	0
Carbopol [®] 940	0	0
Cosmowax [®] J	0	0
Glicerina	0	0
Trietanolamina	0	0
Água recém destilada	0	0

Legenda: os resultados representam média \pm desvio padrão; n = 3.

5.1.2 Determinação qualitativa de presença de bactérias fermentadoras de lactose na água destilada.

Não foi observada produção de gás nas culturas com caldo lactosado, o que demonstra ausência de bactérias fermentadoras de lactose na água destilada.

5.1.3 Determinação qualitativa de presença de *Pseudomonas* sp.

Não houve crescimento de *Pseudomonas* sp. nas placas com meio ágar cetrimida indicando, portanto, ausência de bactérias este gênero na água destilada.

5.2 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS NAS FORMULAÇÕES.

As formulações, contendo ou não as biomoléculas em estudo, foram testadas com relação à presença de microrganismos viáveis, utilizando-se um neutralizador para inativação dos conservantes nas diluições decimais seriadas preparadas com as formulações. Os resultados estão na tabela 3.

Tabela 3 – Contagem de microrganismos viáveis nas formulações.

	Carga microbiana (UFC/g)	
	Bactérias	Fungos
Formulação Base	0	0
Formulação com 3% de Immucell®	0,3 ± 0,5	0,2 ± 0,4
Formulação com 3 % de Colhibin®	3,3 ± 4,6	0
Formulação com 3% de Revitalin®	1 ± 2	1,2 ± 2

Legenda: os resultados representam média ± desvio padrão; n = 6.

5.3 AVALIAÇÃO DO pH DAS FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO.

As preparações de uso tópico desenvolvidas para o estudo tiveram seus pH determinados e os mesmos estão apresentados na Tabela 4. Os resultados apresentados representam média ± desvio padrão de 6 determinações distintas.

Tabela 4 – pH das preparações de uso tópico desenvolvidas.

	pH
Formulação Base	7,47 ± 0,20 #
Formulação com 3% de Immucell®	7,37 ± 0,09
Formulação com 3 % de Colhibin®	7,15 ± 0,10 #,*
Formulação com 3% de Revitalin®	7,63 ± 0,22 *
Água destilada	6,22 ± 0,28

Legenda: os resultados representam média ± desvio padrão; n = 6; #,* , significativamente diferentes para p < 0,05.

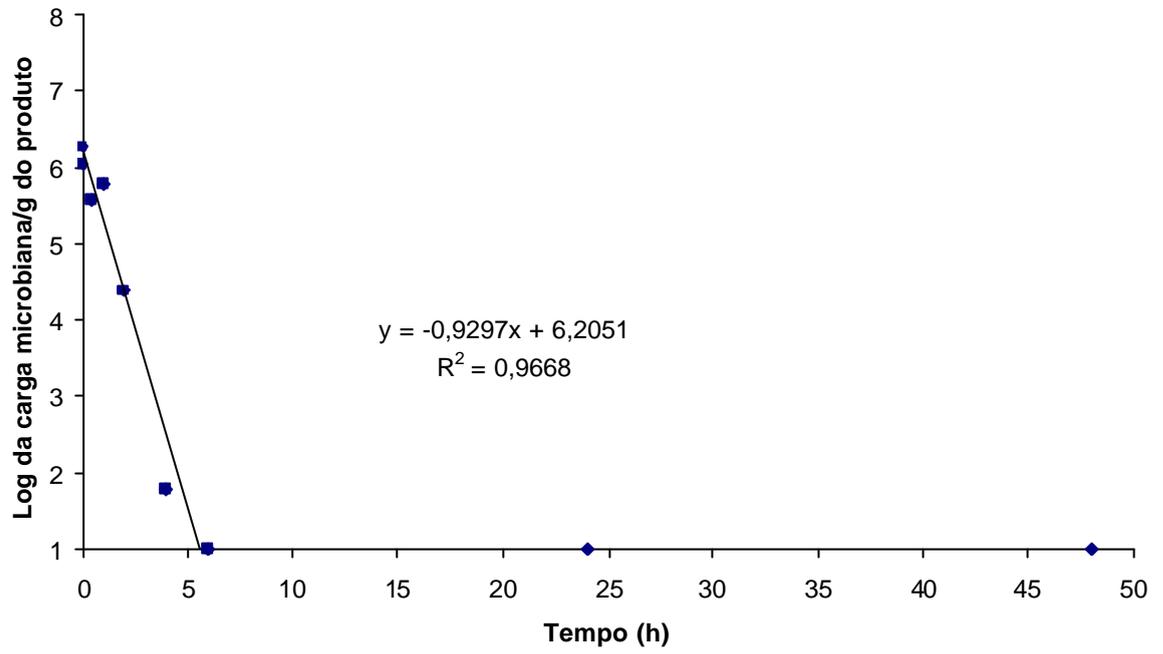
Os valores de pH obtidos para a formulação base foram significativamente diferentes dos obtidos para a formulação adicionada de Colhibin[®], mas não para as demais formulações. Entre as formulações adicionadas de biomoléculas, somente as que continham Colhibin[®] e Revitalin[®] apresentaram valores de pH com diferenças significativas entre eles.

5.4 TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE – TESTE DESAFIO

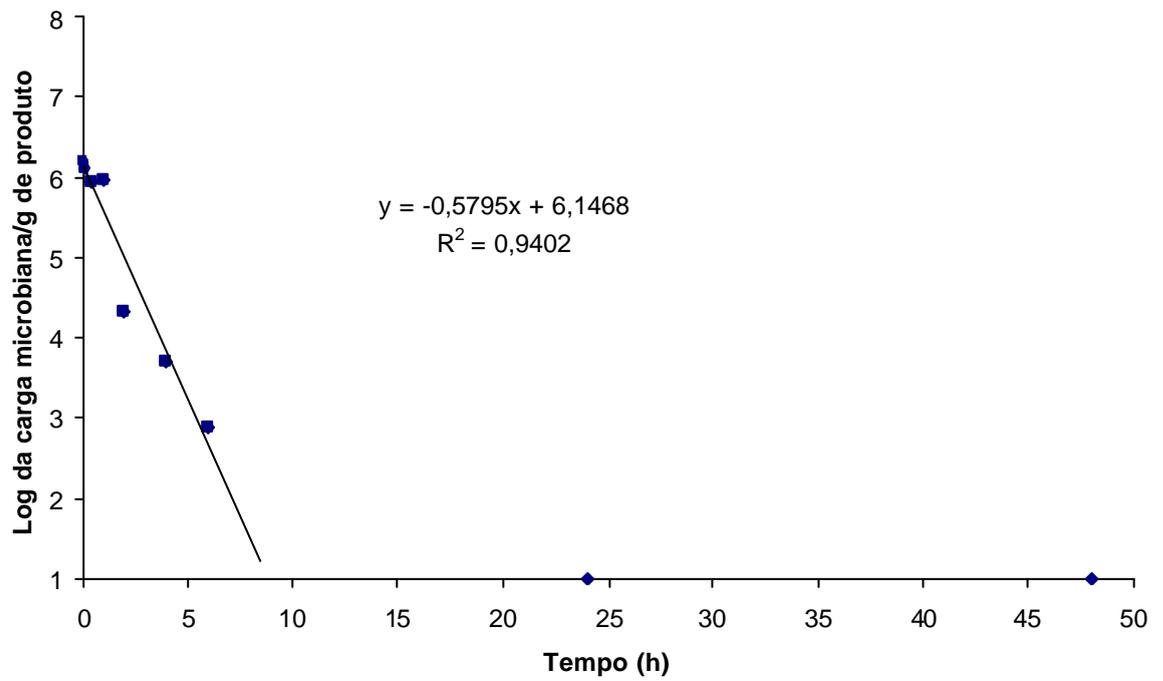
As formulações, gel creme base e gel creme adicionado de 3% de cada umas das biomoléculas em estudo (Immucell[®], Colhibin[®] e Revitalin[®]) foram inoculadas com diferentes tipos de microrganismos e, em períodos de tempo pré-determinados, amostras destas formulações foram diluídas e inoculadas em meio sólido para a contagem de microrganismos viáveis presentes nas formulações. Todos os tipos de formulações foram desafiados com cada um dos cinco microrganismos por, no mínimo, três vezes. A média dos resultados foi representada graficamente em uma curva logarítmica de decréscimo de carga microbiana em função do tempo, e a regressão linear dos pontos iniciais foi calculada para a determinação do valor D. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 2 a 6 e tabelas 5 e 6.

A figura 2 mostra a curva de decréscimo de carga microbiana das formulações de gel creme base em comparação às formulações de gel creme adicionadas de Immucell[®], de Colhibin[®] ou de Revitalin[®] que foram desafiadas com *Escherichia coli*.

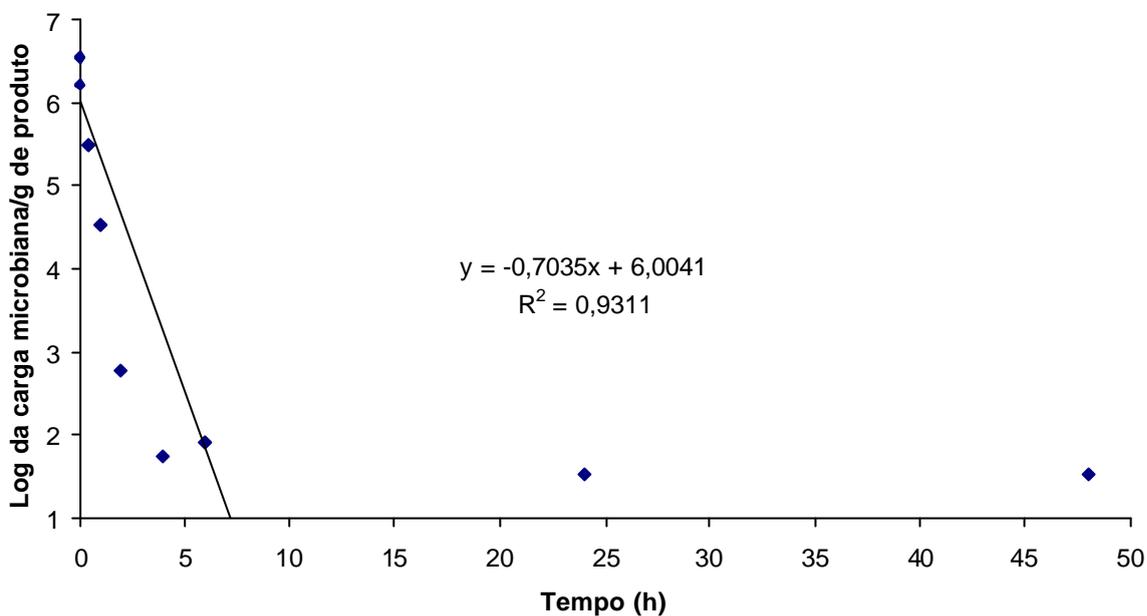
(a)



(b)



(c)



(d)

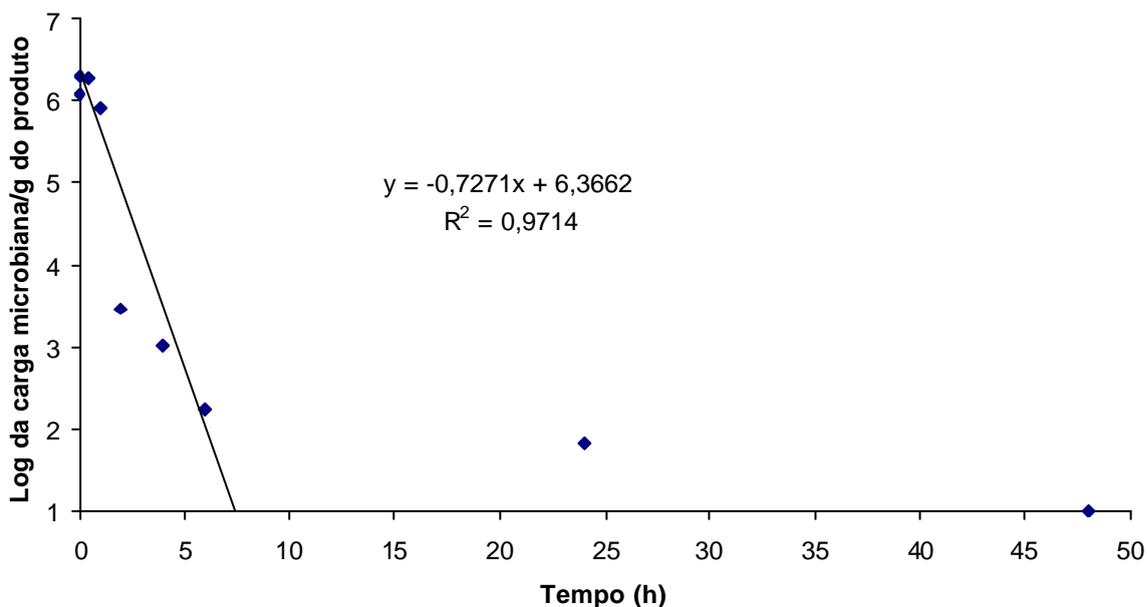
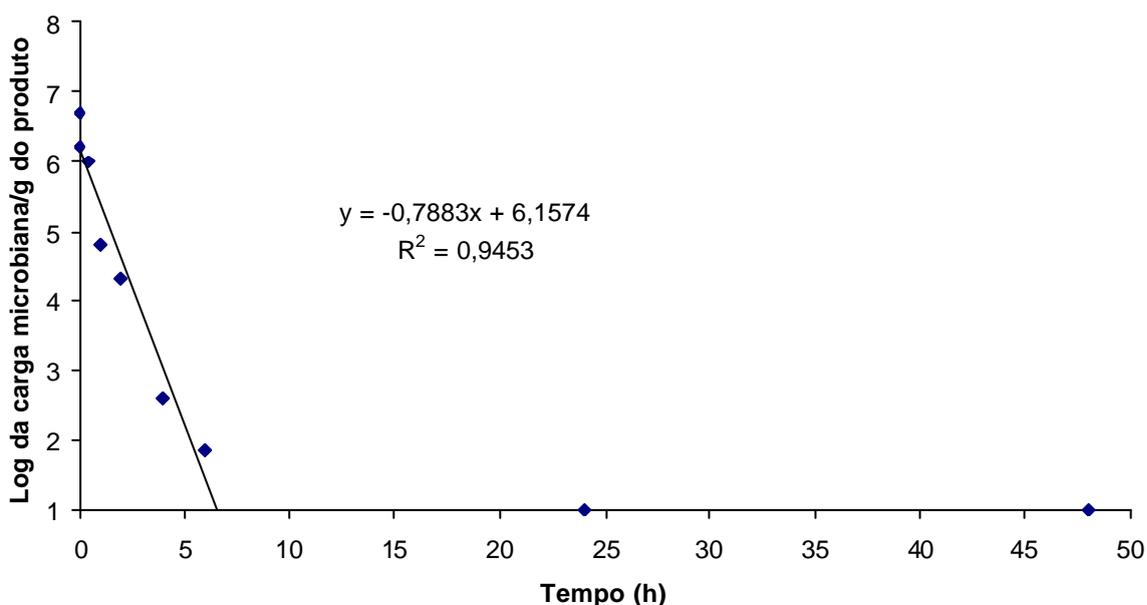


Figura 2. Curva de sobreviventes de *Escherichia coli* em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a); na formulação adicionada de Immucel® (b); na formulação adicionada de Colhibin® (c) e na formulação adicionada de Revitalin® (d) (n = 3).

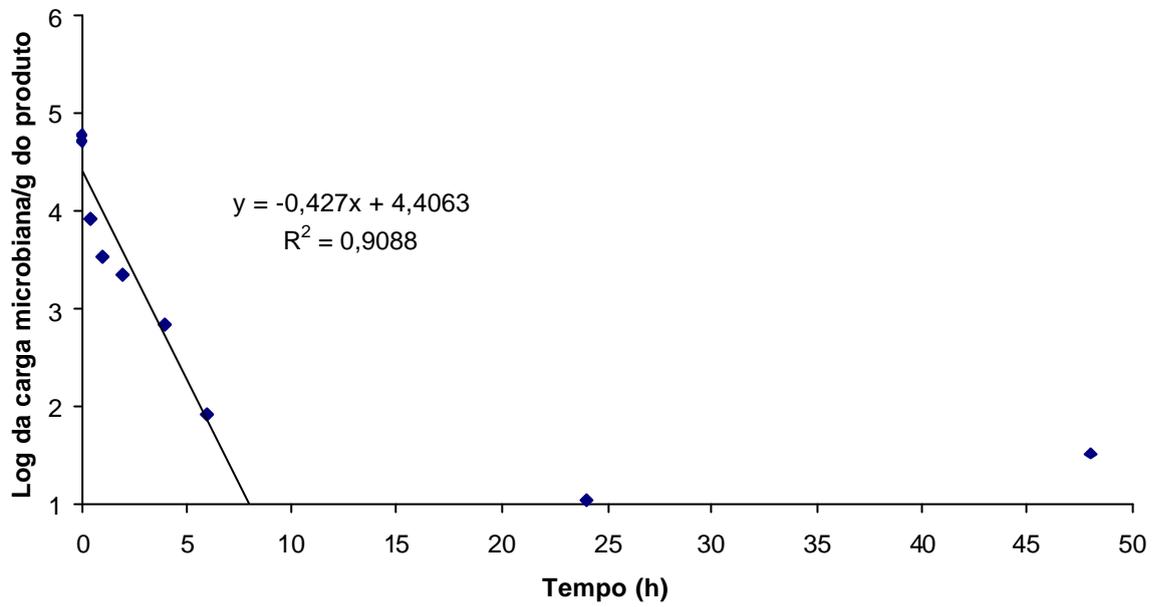
Observando os valores D obtidos para as diferentes formulações, é possível notar que a formulação acrescida de Immucell[®] mostrou o maior tempo para eliminação da carga microbiana dentre as formulações desafiadas com *E. coli*.

Quando o microrganismo desafiador foi o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram positiva comumente encontrada na pele, a curva de decréscimo da carga microbiana obtida teve o comportamento representado pela figura 3. As formulações adicionadas de Immucell[®] desafiadas com *Staphylococcus aureus* apresentaram o maior aumento no tempo de redução decimal da carga microbiana, ou seja, a maior variação do valor D, dentre as bactérias testadas para essa formulação (tabelas 5 e 6). Entretanto, se uma comparação desse parâmetro for feita em relação às demais formulações adicionadas de biomoléculas, é possível perceber que a formulação acrescida de Colhibin[®] apresentou um maior valor D quando o organismo desafiador era o *S. aureus*.

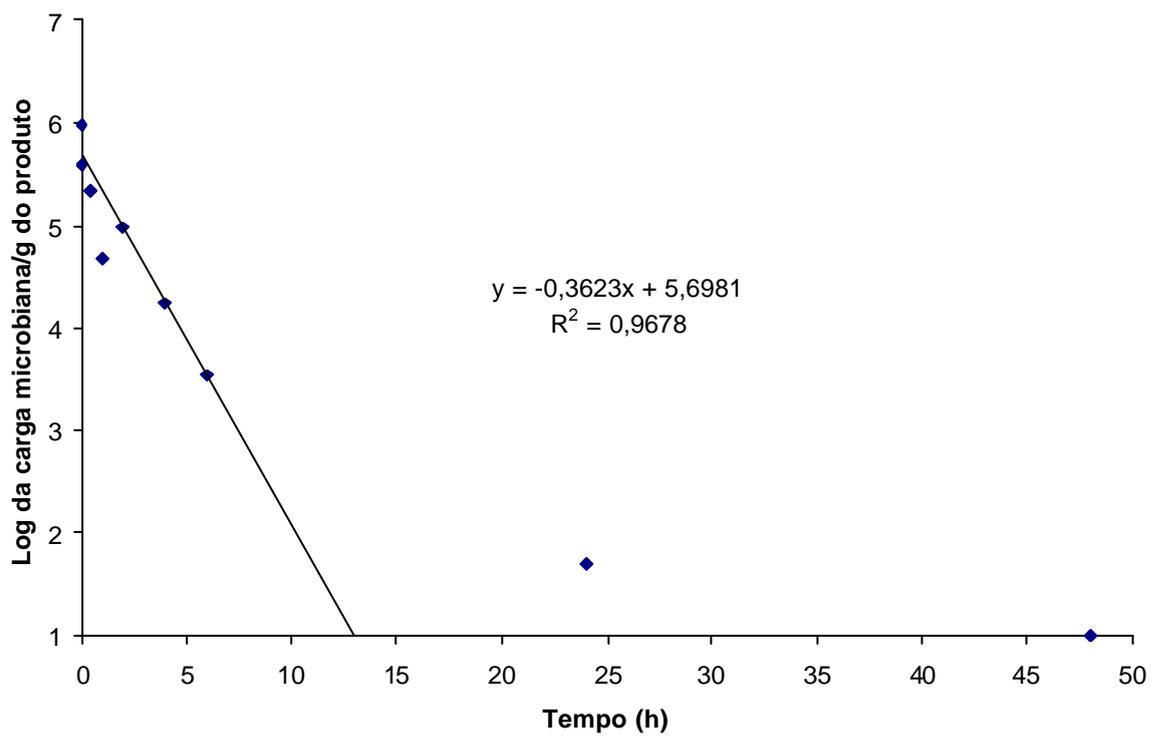
(a)



(b)



(c)



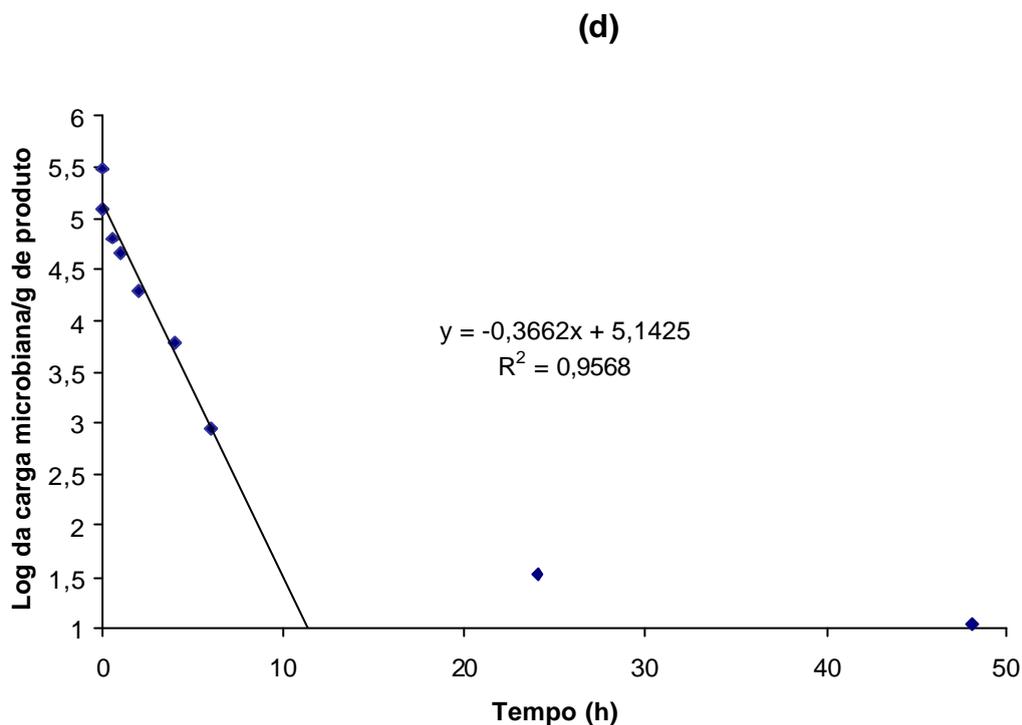
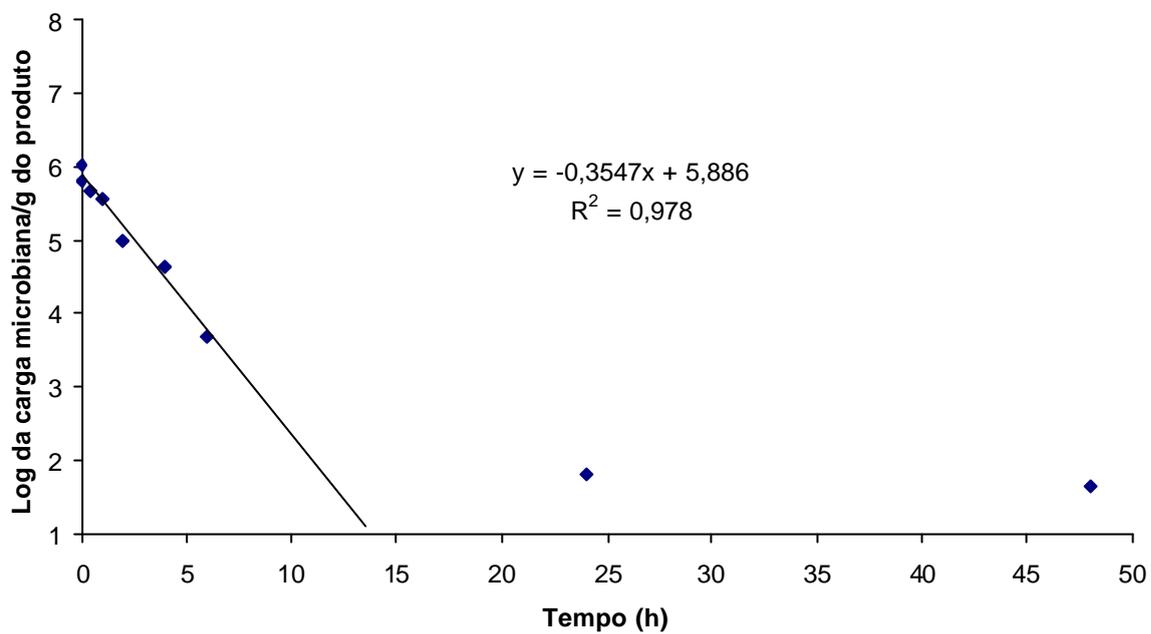


Figura 3. Curva de sobreviventes de *Staphylococcus aureus* em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a) e na formulação adicionada de Immucel[®] (b); na formulação adicionada de Colhibin[®] (c) e na formulação adicionada de Revitalin[®] (d) (n = 3).

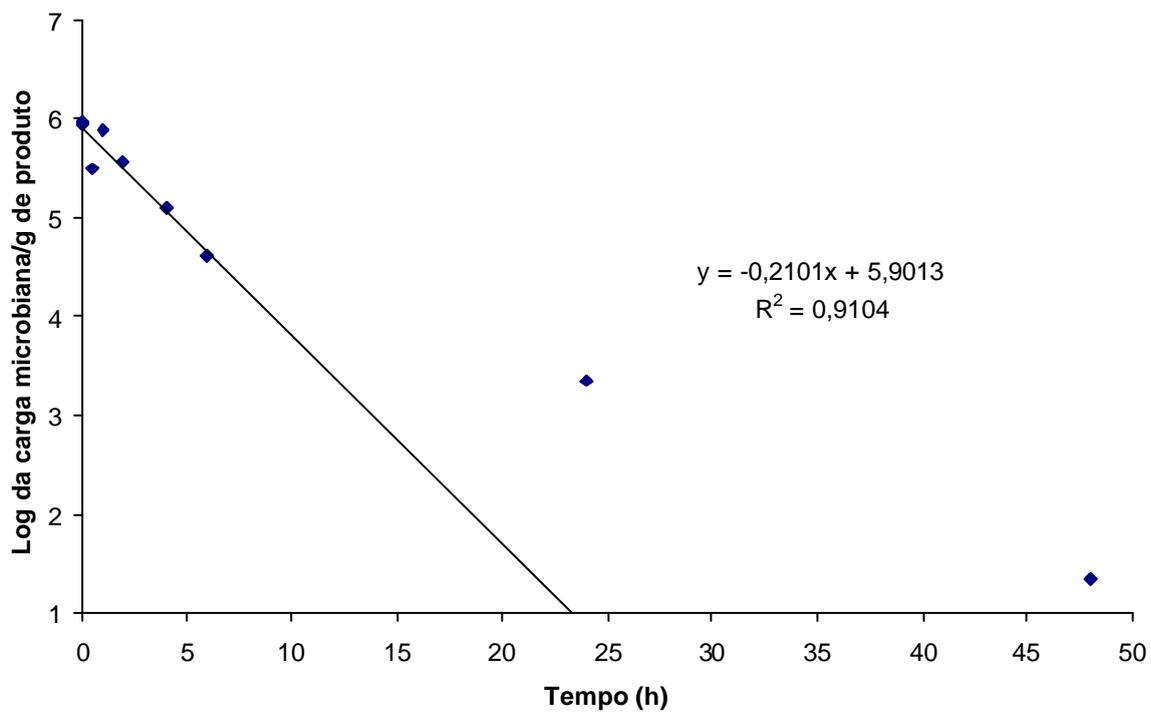
Os resultados obtidos para o teste desafio realizado com *Pseudomonas aeruginosa* estão apresentados na figura 4.

A formulação acrescida de Colhibin[®] apresentou o maior aumento no tempo de redução decimal da carga microbiana dentre os organismos testados e formulações avaliadas (tabelas 5 e 6, e figura 4).

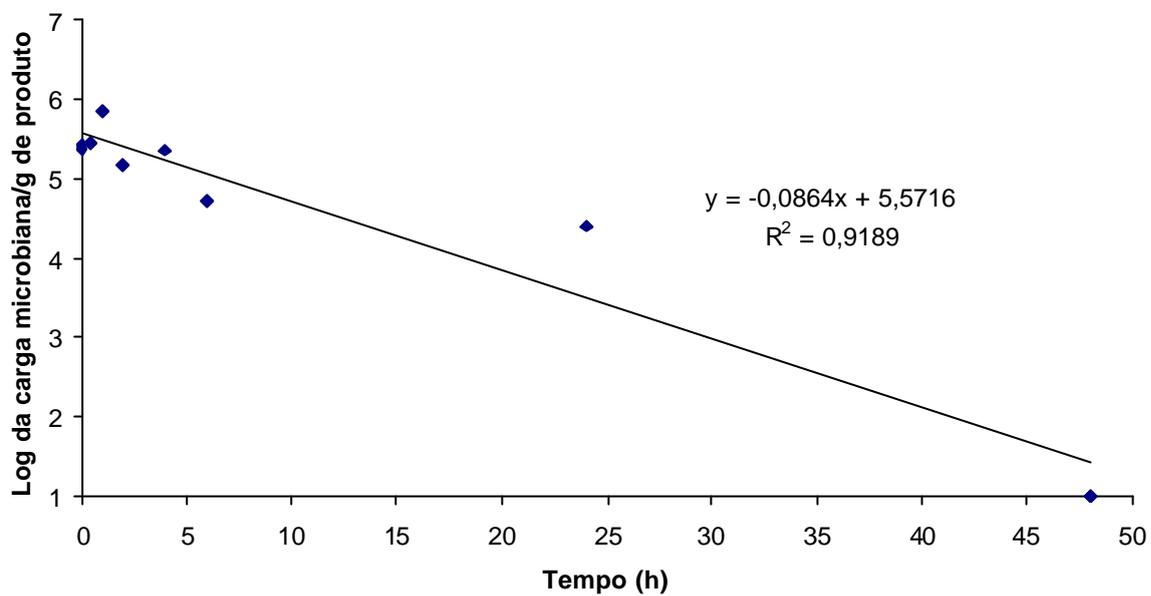
(a)



(b)



(c)



(d)

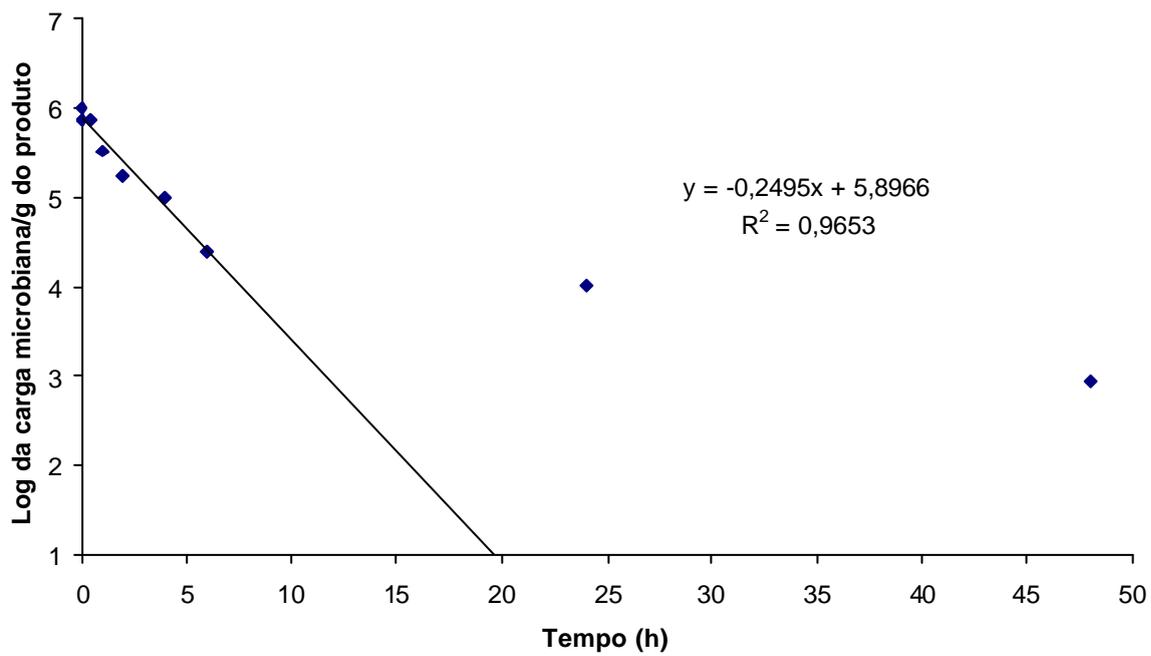
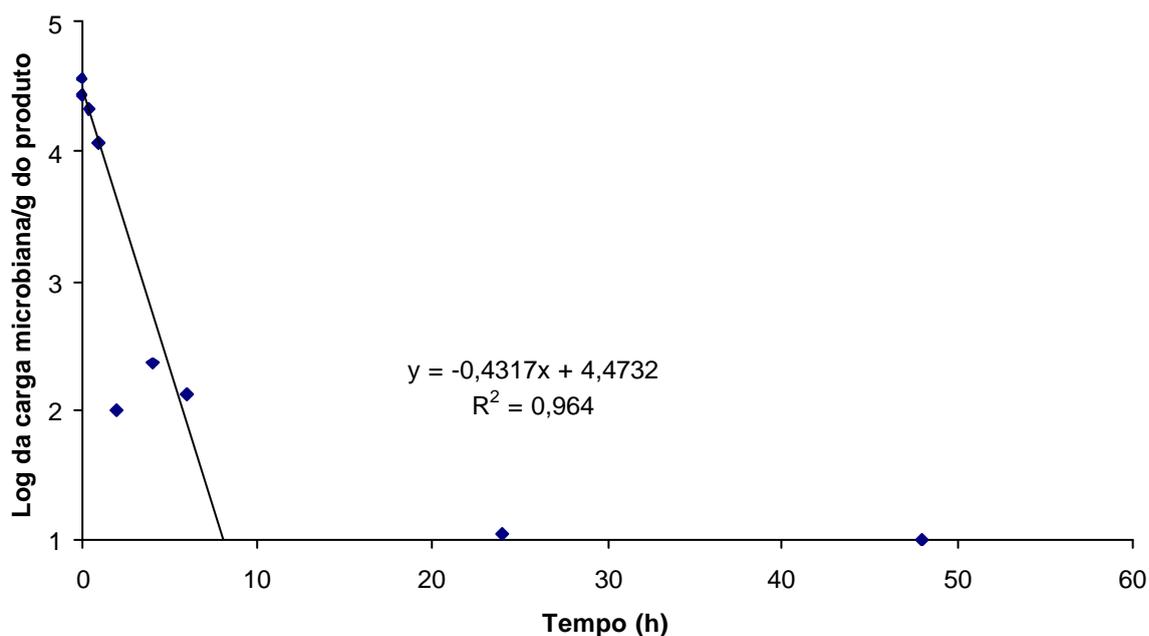


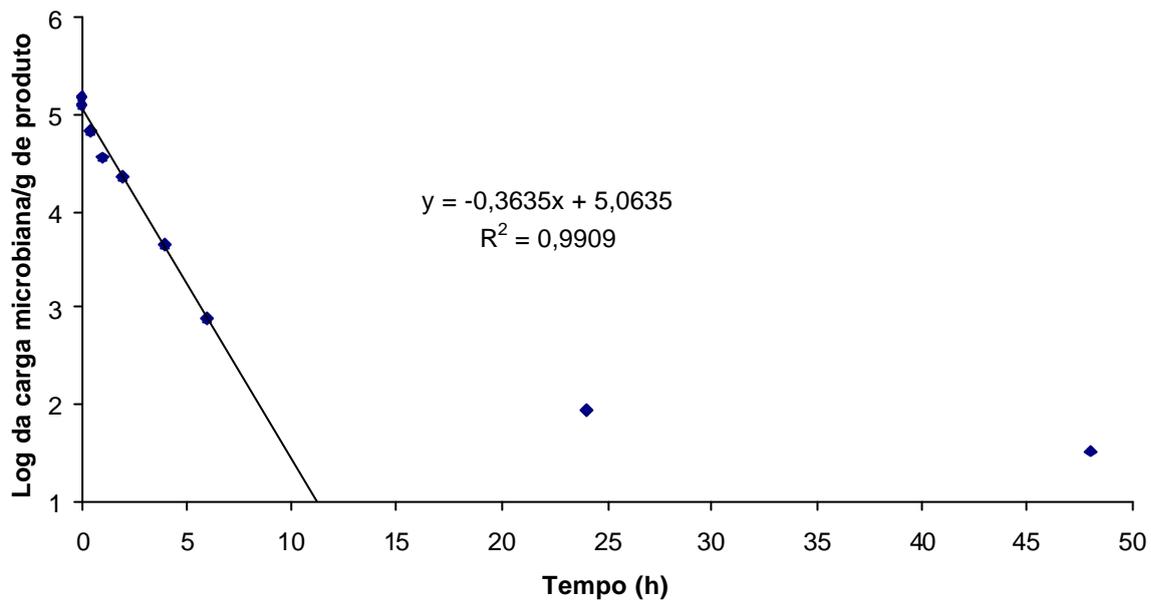
Figura 4. Curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa* em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a) e na formulação adicionada de Immucell[®](b); na formulação adicionada de Colhibin[®] (c) e na formulação adicionada de Revitalin[®] (d) (n = 3).

As formulações contendo Immucell[®], Colhibin[®] e Revitalin[®] que foram desafiadas com a levedura *Candida albicans* (figura 5), apresentaram o menor aumento, e até decréscimo, percentual do valor D em comparação à base, dentre todos os microrganismos testados (tabela 5 e figura 10). Já o experimento realizado com o bolor *Aspergillus niger* apresentou as curvas de decréscimo mostradas na figura 6, com o segundo maior percentual de aumento do valor D obtido para as formulações e o maior aumento percentual para a formulação acrescida de Immucell[®] com relação à base (tabela 5 e figura 12).

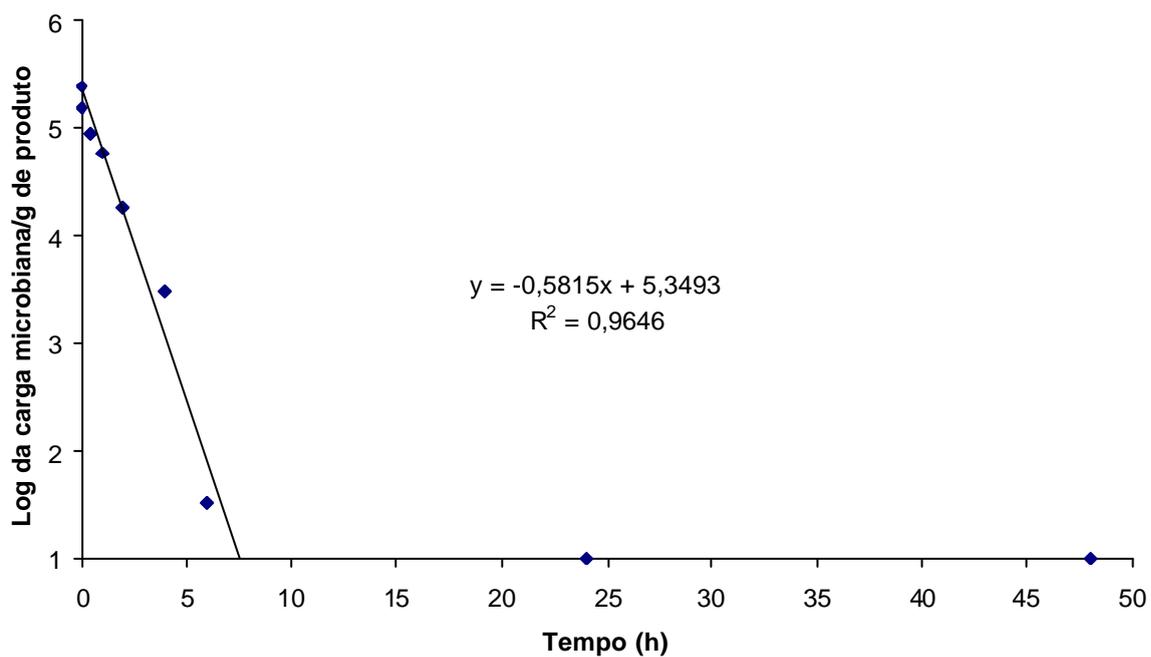
(a)



(b)



(c)



(d)

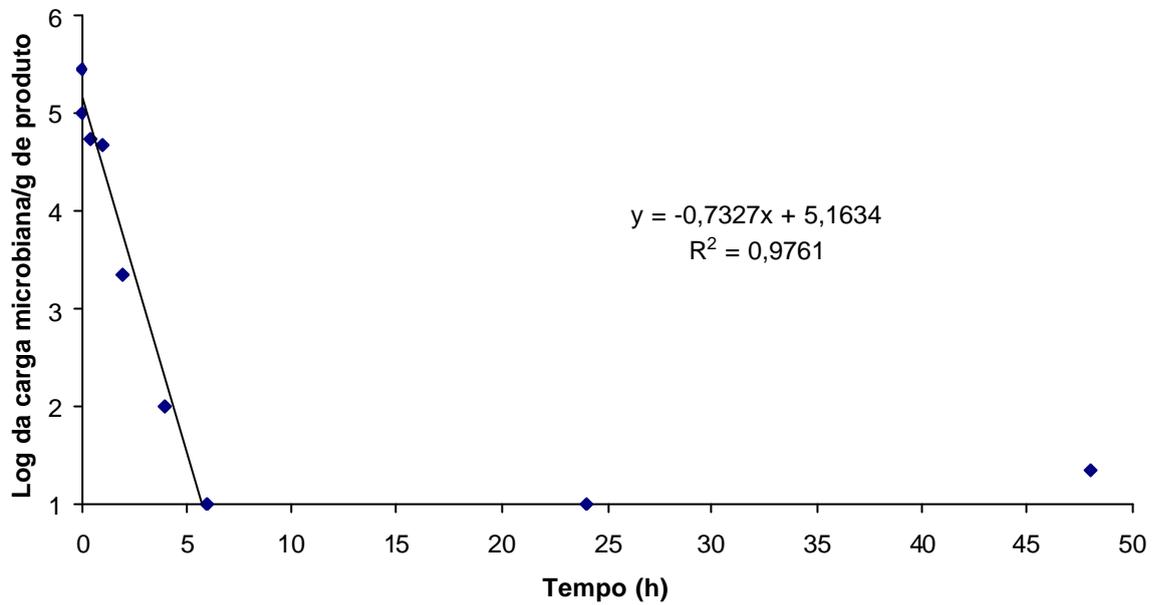
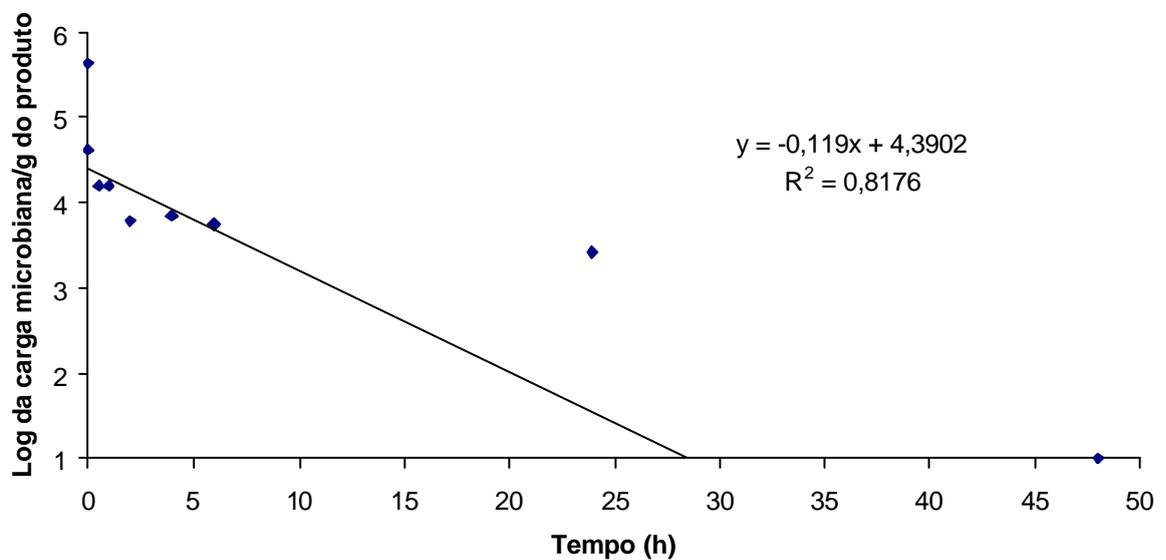
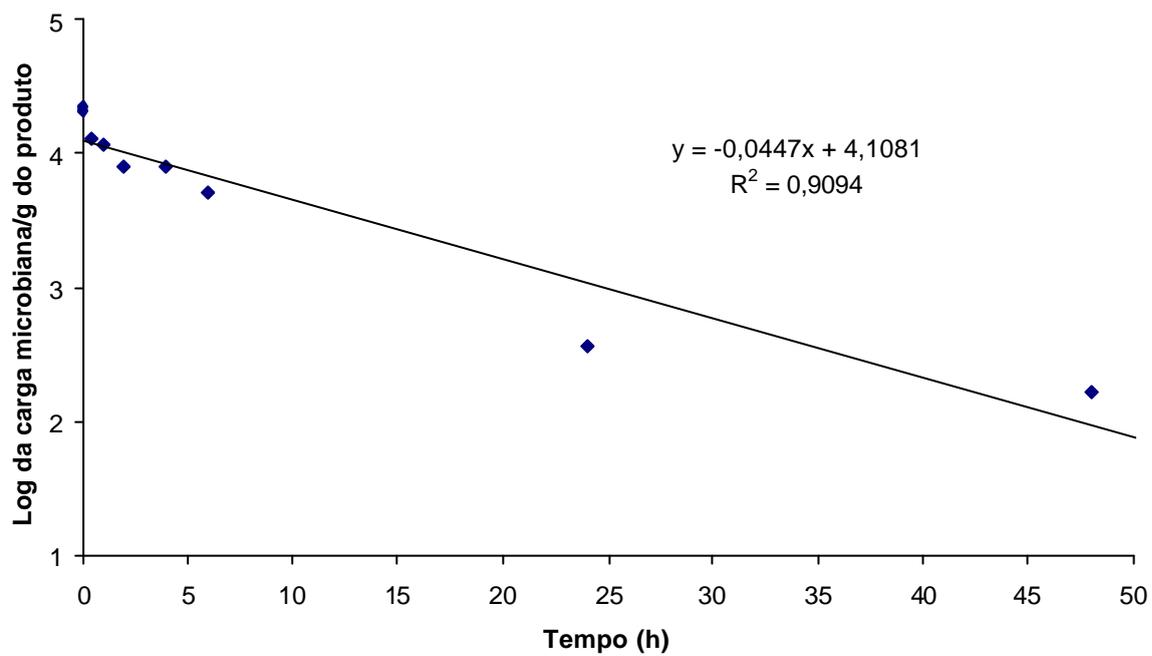


Figura 5. Curva de sobreviventes de *Candida albicans* em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a) e na formulação adicionada de Immucel[®](b); na formulação adicionada de Colhibin[®] (c) e na formulação adicionada de Revitalin[®] (d) (n = 3).

(a)



(b)



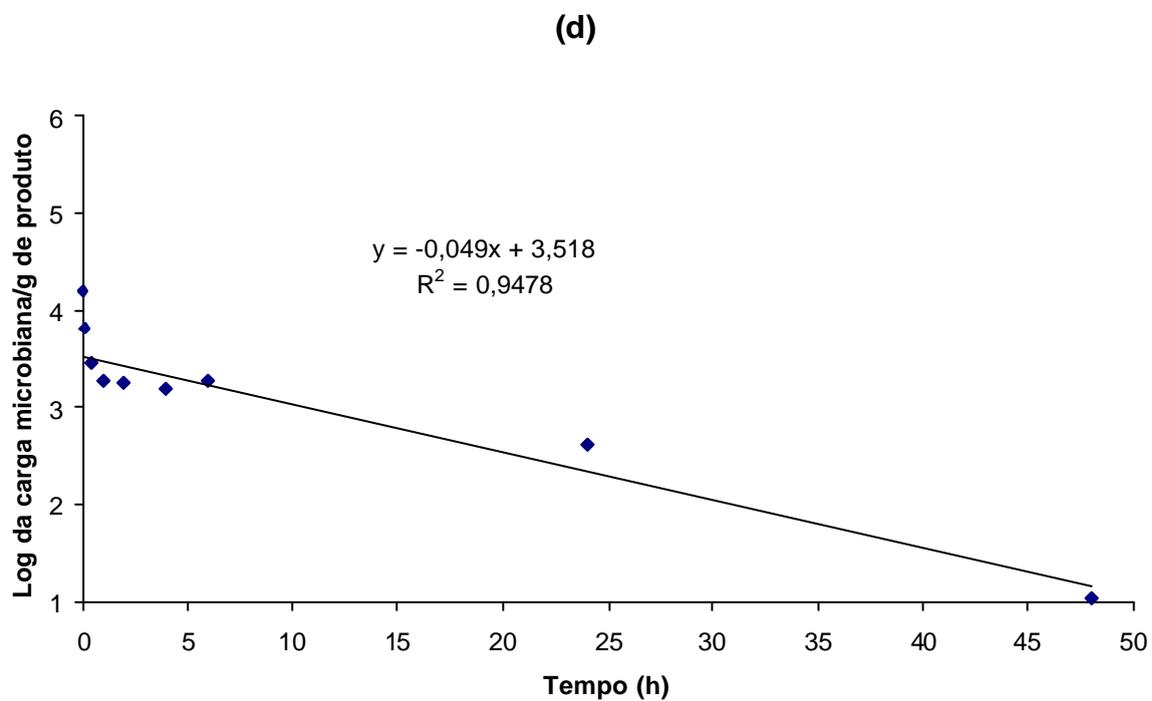
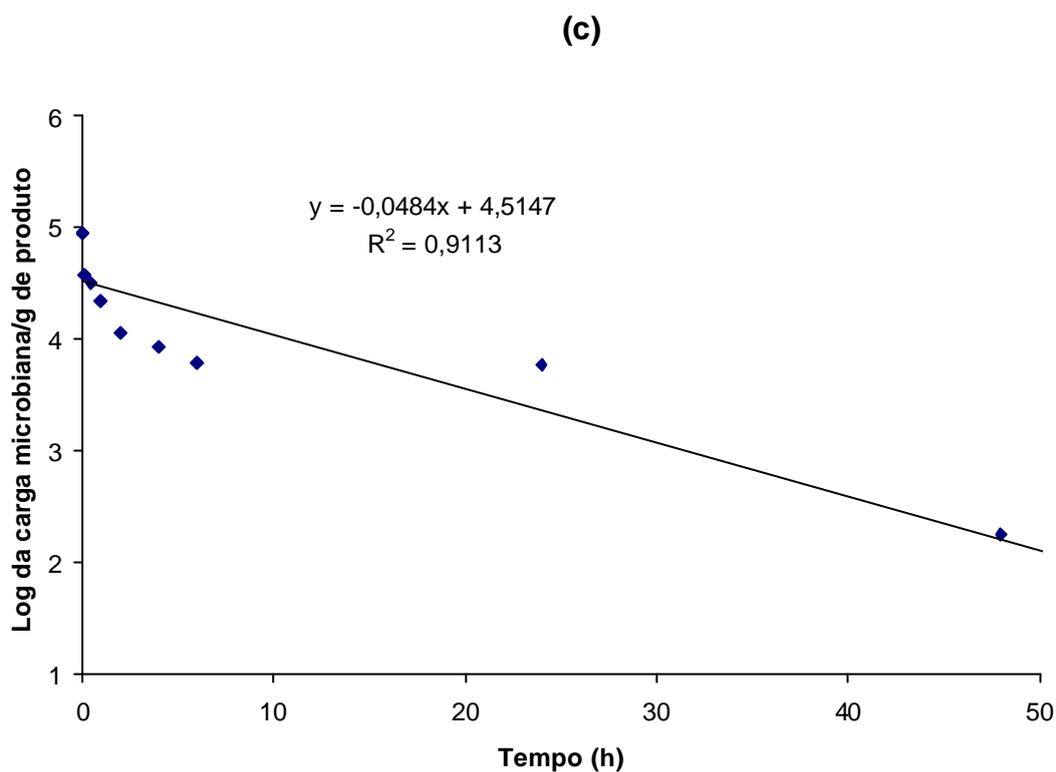


Figura 6. Curva de sobreviventes de *Aspergillus niger* em função do tempo de inoculação da carga microbiana na formulação base (a) e na formulação adicionada

de Immucell® (b); na formulação adicionada de Colhibin® (c) e na formulação adicionada de Revitalin® (d) (n = 3).

Tabela 5 - Valor D obtido para as formulações com e sem macromoléculas submetidas ao teste desafio.

Formulações	Microrganismos	Equação da reta	Valor D	Coefficiente de correlação (r ²)
Gel creme Base	<i>Escherichia coli</i>	$y = -0,9297x + 6,2051$	1,07	0,9668
	<i>Staphylococcus aureus</i>	$y = -0,7883x + 6,1574$	1,27	0,9453
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = -0,3547x + 5,886$	2,82	0,978
	<i>Candida albicans</i>	$y = -0,4317x + 4,4732$	2,32	0,964
	<i>Aspergillus niger</i>	$y = -0,119x + 4,3902$	8,40	0,8176*
Gel creme com 3% de Immucell	<i>Escherichia coli</i>	$y = -0,5795x + 6,1468$	1,72	0,9402
	<i>Staphylococcus aureus</i>	$y = -0,427x + 4,4063$	2,34	0,9088
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = -0,2101x + 5,9013$	4,76	0,9104
	<i>Candida albicans</i>	$y = -0,3635x + 5,0635$	2,75	0,9909
	<i>Aspergillus niger</i>	$y = -0,0447x + 4,1081$	22,37	0,9094
Gel creme com 3% de Colhibin	<i>Escherichia coli</i>	$y = -0,7035x + 6,0041$	1,42	0,9311
	<i>Staphylococcus aureus</i>	$y = -0,3623x + 5,6981$	2,76	0,9678
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = -0,0864x + 5,5716$	11,57	0,9189
	<i>Candida albicans</i>	$y = -0,5815x + 5,3493$	1,72	0,9646
	<i>Aspergillus niger</i>	$y = -0,0484x + 4,5147$	20,66	0,9113
Gel creme com 3% de Revitalin	<i>Escherichia coli</i>	$y = -0,7271x + 6,3662$	1,37	0,9714
	<i>Staphylococcus aureus</i>	$y = -0,3662x + 5,1425$	2,73	0,9568
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = -0,2495x + 5,8966$	4,00	0,9653
	<i>Candida albicans</i>	$y = -0,7327x + 5,1634$	1,36	0,9761
	<i>Aspergillus niger</i>	$y = -0,049x + 3,518$	20,41	0,9478

Legenda: *, valor calculado para $R < 0,9$; $D = -1/a$ ($y = ax + b$).

Tabela 6 - Tempo de eliminação total do inóculo nos produtos.

Formulações	Microrganismos	Valor D	Log do inóculo	Tempo de eliminação (h)	
				Estimado	Experimental
Gel creme base	<i>Escherichia coli</i>	1,07	6,20	6,63	6
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,27	6,16	7,82	entre 6 e 24
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,82	5,89	16,61	>48
	<i>Candida albicans</i>	2,32	4,47	10,37	entre 6 e 24
	<i>Aspergillus niger</i>	8,40	4,39	36,88	48
Gel creme com 3% de Immucell	<i>Escherichia coli</i>	1,72	6,15	10,58	entre 6 e 24
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,34	4,41	10,32	entre 6 e 24
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,76	5,90	28,08	>48
	<i>Candida albicans</i>	2,75	5,06	13,91	>48
	<i>Aspergillus niger</i>	22,37	4,11	91,94	> 48
Gel creme com 3% de Colhibin®	<i>Escherichia coli</i>	1,42	6,00	8,52	>48
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,76	5,70	15,73	<48
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,57	5,57	64,44	> 48
	<i>Candida albicans</i>	1,72	5,35	9,20	Entre 6 e 24
	<i>Aspergillus niger</i>	20,66	4,51	93,18	>48
Gel creme com 3% de Revitalin	<i>Escherichia coli</i>	1,37	6,37	8,73	Entre 24 e 48
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,73	5,14	14,03	Entre 24 e 48
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,01	5,89	23,62	>48
	<i>Candida albicans</i>	1,36	5,16	7,02	Entre 6 e 24
	<i>Aspergillus niger</i>	20,41	3,52	71,84	> 48

Para uma visualização mais fácil das alterações nos tempo de eliminação do *bioburden* da cada uma das formulações e organismos teste, os valores D obtidos nos testes desafio foram plotados em valores percentuais com relação à formulação base, para as diferentes formulações por tipo de microrganismo usado no teste desafio (figuras 7 a 11).

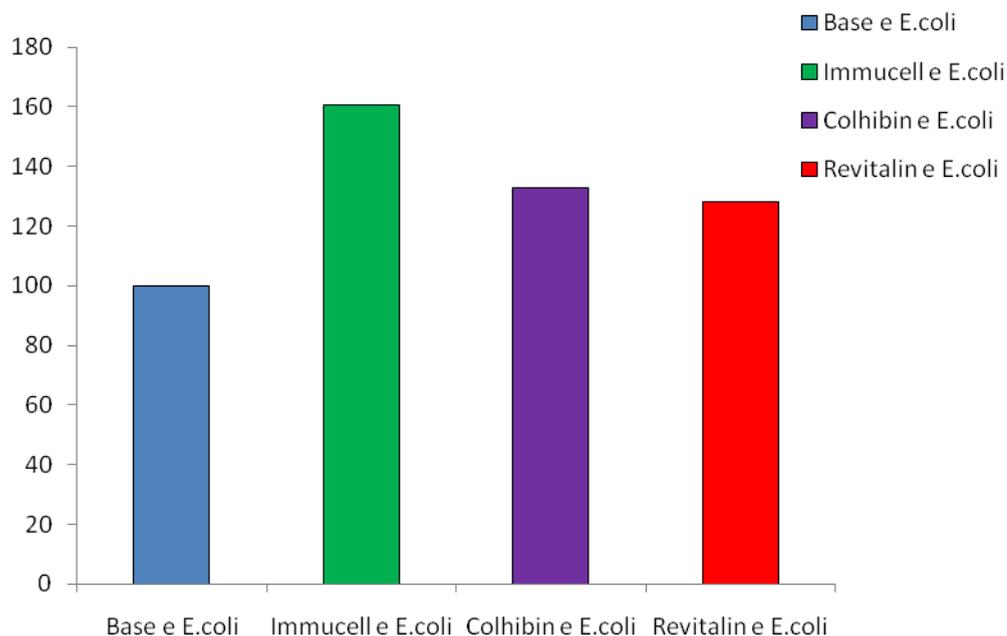


Figura 7 - Comparação em porcentagem dos valores D para as diferentes formulações desafiadas por *E. coli*.

Observando a figura 7 em que há a comparação do valor D para as formulações desafiadas por *E. coli* em relação ao gel creme base, é possível perceber que a formulação adicionada de Immucell[®] apresentou o maior aumento percentual (61%) do parâmetro analisado. As formulações acrescidas dos ativos Colhibin[®] e Revitalin[®] apresentaram um aumento percentual de, respectivamente, 32% e 28% no valor D em relação ao gel creme base.

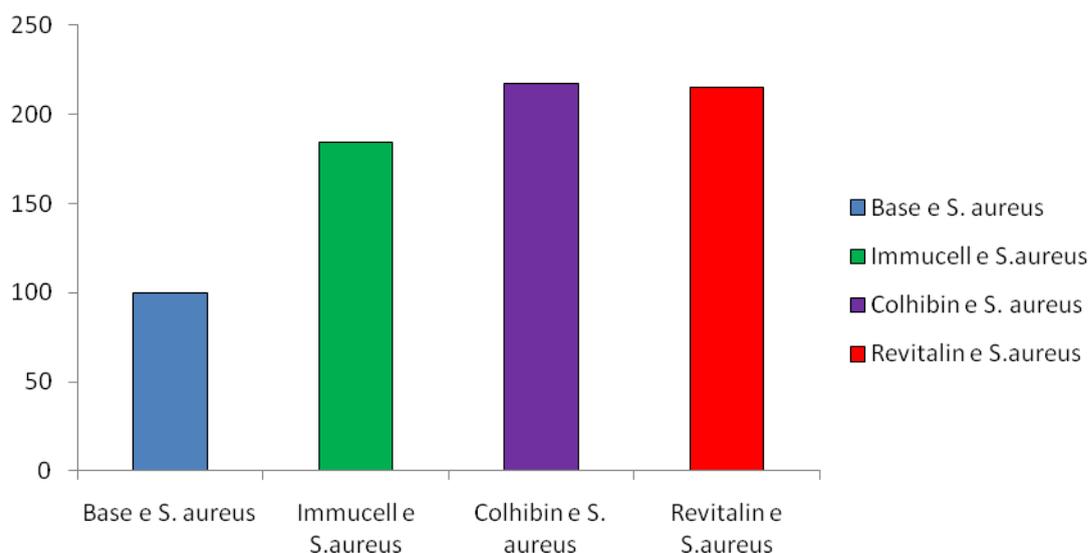


Figura 8 - Comparação em porcentagem dos valores D para as diferentes formulações desafiadas por *S. aureus*.

Quando o microrganismo desafiador era *S. aureus*, a formulação que mostrou um maior aumento de valor D em relação à base foi a formulação acrescida de Colhibin[®] que obteve um aumento percentual de 117%.

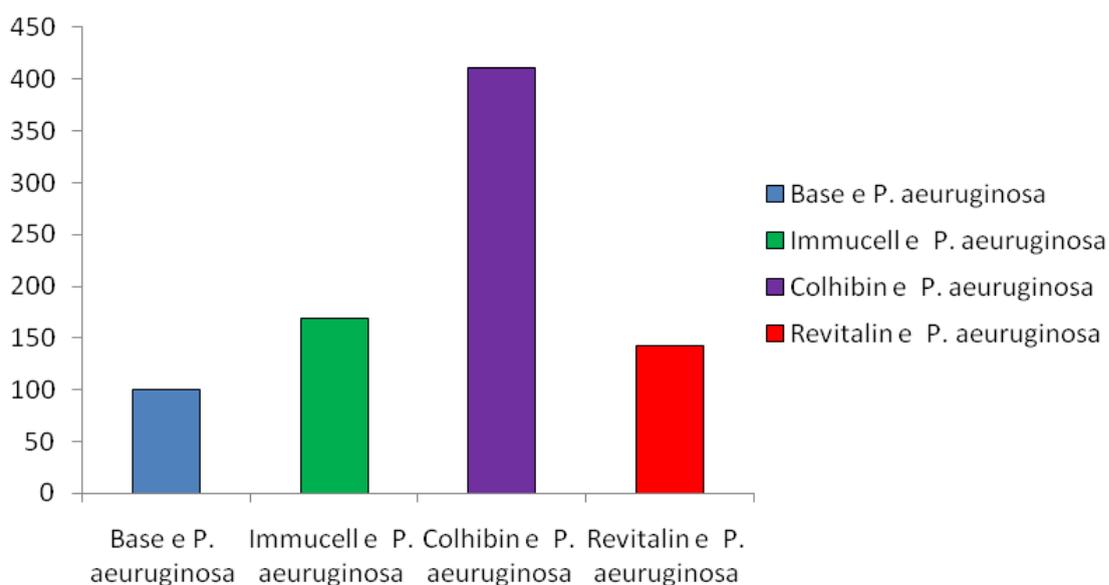


Figura 9 - Comparação em porcentagem dos valores D para as diferentes formulações desafiadas por *P. aeruginosa*.

Observando a figura 9 em que há a comparação do valor D para as diferentes formulações desafiadas por *P. aeruginosa* em relação ao gel creme base, é possível perceber que a formulação adicionada de Colhibin® apresentou o maior aumento percentual (310%) da variável analisada. As formulações acrescidas dos ativos Immucell® e Revitalin® apresentaram um aumento percentual de 68% e 42%, respectivamente, no valor D em relação ao gel creme base.

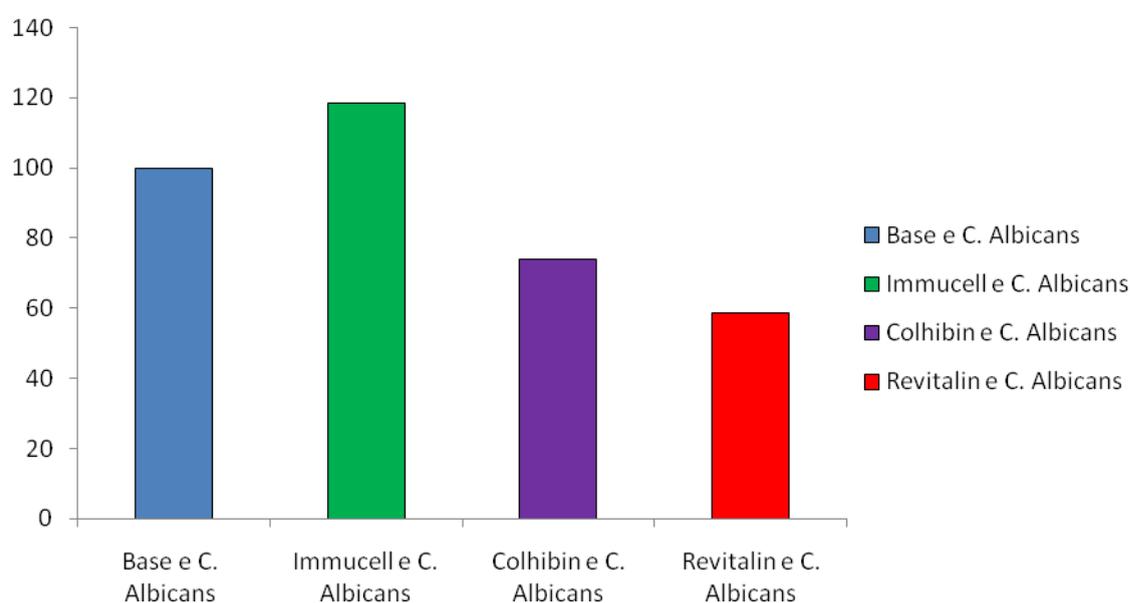


Figura 10 - Comparação em porcentagem dos valores D para as diferentes formulações desafiadas por *C. albicans*.

Para os testes desafios em que o microrganismo utilizado foi *C. albicans*, a formulação com Immucell® mostrou um maior valor D em relação a base e demais formulações testadas. O aumento percentual desse foi de 18% em relação à base. Já as formulações acrescidas de Colhibin® e Revitalin®, apresentaram descréscimo no valor D quando comparadas ao gel creme base.

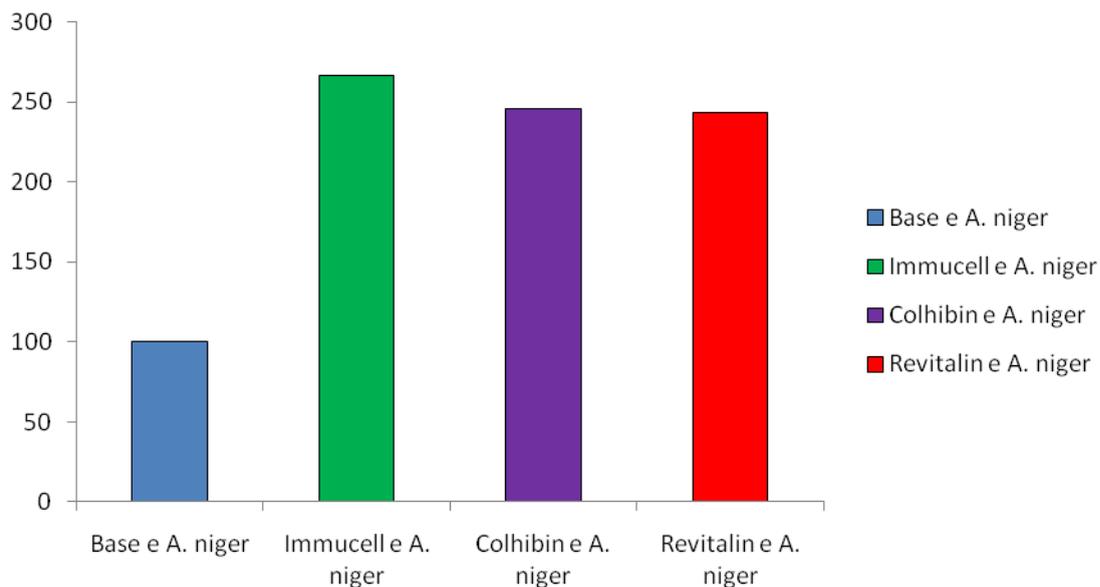


Figura 11 - Comparação em porcentagem dos valores D para as diferentes formulações desafiadas por *A.niger*.

Quando se utilizou como desafiante o bolor *A. niger*, a formulação adicionada do ativo Immucell[®] voltou a apresentar um maior aumento percentual do valor D em relação à base. Esse aumento chegou a ser 166% em relação ao tempo de redução decimal observado para o gel creme livre de ativos. As formulações que continham Colhibin[®] e Revitalin[®] presentes mostraram um aumento percentual de, respectivamente, 103,8% e 81% em relação ao valor D apresentado pela base.

5.5 TESTE DE ADAPTAÇÃO MICROBIANA

Tabela 7. Teste de adaptação realizado com a cepa padrão de *E. coli* submetida a diferentes condições de crescimento.

Microrganismo teste: <i>E. coli</i>								
Concentração de sistema conservante - propilparabeno: metilparabeno: imidazolidinil uréia (mg/mL)	Meio + conservante	Meio + conservante + Colhibin®	Meio + conservante + Immucell	Meio + conservante + Revitalin	Meio + conservante + Tensoativo	Meio + conservante + Tensoativo + Colhibin®	Meio + conservante + Tensoativo + Immucell	Meio + conservante + Tensoativo + Revitalin
0,25 : 0,75 : 0,75					-	-	-	-
0,2 : 0,6 : 0,6	-	-	-	-	+	+	+	+
0,1 : 0,3 : 0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05 : 0,15 : 0,15	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: +, crescimento microbiano; -, ausência de crescimento microbiano.

Observando os dados ilustrados na tabela 7, em que há o resultado do teste de adaptação para *E. coli*, percebe-se que os experimentos em que os microrganismos cresceram em meio de cultura no qual estavam presentes o tensoativo e o sistema conservante ou tensoativo, sistema conservante e um dos ativos cosméticos foram os que mostraram a necessidade uma maior concentração de conservante para inibição de crescimento em relação aos demais.

Tabela 8. Teste de adaptação realizado com a cepa padrão de *S. aureus* submetida a diferentes condições de crescimento.

Microorganismo teste: <i>S. aureus</i>								
Concentração de sistema conservante - propilparabeno: metilparabeno: imidazolidinil uréia (mg/mL)	Meio + conservante	Meio + conservante + Colhibin®	Meio + conservante + Immucell	Meio + conservante + Revitalin	Meio + conservante + Tensoativo	Meio + conservante + Tensoativo + Colhibin®	Meio + conservante + Tensoativo + Immucell	Meio + conservante + Tensoativo + Revitalin
0,8 : 2,4 : 2,4					-	-	-	-
0,5 : 1,5 : 1,5			-		+	+	+	+
0,25 : 0,75 : 0,75	-	-	+	-	+	+	+	+
0,2 : 0,6 : 0,6	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1 : 0,3 : 0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05 : 0,15 : 0,15	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: +, crescimento microbiano; -, ausência de crescimento microbiano.

Os resultados do teste de adaptação obtidos para *S. aureus* revelaram que os microrganismos submetidos a crescimento em meio bacteriológico adicionado de conservante, tensoativo e uma das biomoléculas ativas conseguiram resistir a maiores concentrações de sistema conservante.

Tabela 9. Teste de adaptação realizado com a cepa padrão de *P. aeruginosa* submetida a diferentes condições de crescimento.

Microrganismo teste: <i>P. aeruginosa</i>								
Concentração de sistema conservante - propilparabeno: metilparabeno: imidazolidinil uréia (mg/mL)	Meio + conservante	Meio + conservante + Colhibin®	Meio + conservante + Immucell®	Meio + conservante + Revitalin®	Meio + conservante + Tensoativo	Meio + conservante + Tensoativo + Colhibin®	Meio + conservante + Tensoativo + Immucell®	Meio + conservante + Tensoativo + Revitalin®
1 : 3 : 3						-	-	-
0,8 : 2,4 : 2,4		-	-		-	+	+	+
0,5 : 1,5 : 1,5	-	+	+	-	+	+	+	+
0,25 : 0,75 : 0,75	+	+	+	+	+	+	+	+
0,2 : 0,6 : 0,6	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1 : 0,3 : 0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05 : 0,15 : 0,15	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: +, crescimento microbiano; -, ausência de crescimento microbiano.

Quando a cepa que passou pelo teste de adaptação foi de *Pseudomonas aeruginosa*, os microrganismos que cresceram em meio adicionado de conservante, tensoativo e uma das biomoléculas conseguiram sobreviver a concentrações maiores de conservantes, concentrações estas que chegaram a ser superiores às concentrações de uso dos conservantes nas formulações em estudo.

Tabela 10. Teste de adaptação realizado com a cepa padrão de *C. albicans* submetida a diferentes condições de crescimento.

Microorganismo teste: <i>C. albicans</i>								
Concentração de sistema conservante - propilparabeno: metilparabeno: imidazolidinil uréia (MG/mL)	Meio + conservante	Meio + conservante + Colhibin®	Meio + conservante + Immucell®	Meio + conservante + Revitalin®	Meio + conservante + Tensoativo	Meio + conservante + Tensoativo + Colhibin®	Meio + conservante + Tensoativo + Immucell®	Meio + conservante + Tensoativo + Revitalin®
1 : 3 : 3						-		-
0,8 : 2,4 : 2,4						+	-	+
0,5 : 1,5 : 1,5		-	-	-	-	+	+	+
0,25 : 0,75 : 0,75		+	+	+	+	+	+	+
0,2 : 0,6 : 0,6	-	+	+	+	+	+	+	+
0,1 : 0,3 : 0,3	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05 : 0,15 : 0,15	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: +, crescimento microbiano; -, ausência de crescimento microbiano.

Observando os dados ilustrados na tabela 10, em que há comparação entre as concentrações mínimas de conservantes a partir das quais o crescimento de *C. albicans* era interrompido, nota-se que os organismos que cresceram em meio em que estavam presentes o tensoativo, sistema conservante e um dos ativos apresentaram a necessidade de uma maior concentração de conservantes para a inibição de crescimento.

Tabela 11. Teste de adaptação realizado com a cepa padrão de *A. niger* submetida a diferentes condições de crescimento.

Microrganismo teste: <i>A. Níger</i>								
Concentração de sistema conservante - propilparabeno: metilparabeno: imidazolidinil uréia (MG/mL)	Meio + conservante	Meio + conservante Colhibin®	Meio + conservante Immucell®	Meio + conservante Revitalin®	Meio + conservante Tensoativo	Meio + conservante Tensoativo Colhibin®	Meio + conservante Tensoativo Immucell®	Meio + conservante Tensoativo Revitalin®
0,2 : 0,6 : 0,6		-			-			
0,1 : 0,3 : 0,3	-	+	-	-	+	-	-	-
0,05 : 0,15 : 0,15	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: +, crescimento microbiano; -, ausência de crescimento microbiano.

Em relação ao teste de adaptação microbiana realizado com a cepa de *A. niger*, cujos resultados estão apresentados na tabela 11, percebe-se que os inóculos que cresceram em meio de cultura no qual estavam presentes Colhibin® e sistema conservante ou sistema conservante e tensoativo foram os que apresentaram a necessidade de maiores concentrações de conservantes para a inibição do crescimento microbiano.

5.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)

As cepas padrões de microrganismos e as cepas obtidas após o ensaio de adaptação microbiana foram submetidas ao teste da concentração inibitória mínima do sistema conservante, respeitando-se as proporções dos conservantes usadas nas formulações.

Os resultados deste ensaio estão mostrados na tabela 12 e figuras 12 a 16.

Tabela 12. Valores de concentração inibitória mínima (mg/mL) dos conservantes obtidas para as cepas de organismos testadas.

Cepas testadas	Concentração inibitória mínima do sistema conservante propilparabeno:metilparabeno:imidazolidinil uréia (mg/mL)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Cepa Padrão (ATCC)	0,2 : 0,6 : 0,6	0,4 : 1,2 : 1,2	0,4 : 1,2 : 1,2	0,25 : 0,75 : 0,75	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante	0,2 : 0,6 : 0,6	0,4 : 1,2 : 1,2	0,4 : 1,2 : 1,2	0,25 : 0,75 : 0,75	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante e Colhibin®	0,2 : 0,6 : 0,6	0,5 : 1,5 : 1,5	0,4 : 1,2 : 1,2	0,57 : 1,7 : 1,7 (± 0,21 : 0,62 : 0,62)	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante e Immucell®	0,2 : 0,6 : 0,6	0,5 : 1,5 : 1,5	0,35 : 1,05 : 1,05 (± 0,09 : 0,26 : 0,26)	0,5 : 1,5 : 1,5	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante e Revitalin®	0,2 : 0,6 : 0,6	0,5 : 1,5 : 1,5	0,4 : 1,2 : 1,2	0,4 : 1,2 : 1,2	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante e tensoativo	0,2 : 0,6 : 0,6	0,5 : 1,5 : 1,5	0,4 : 1,2 : 1,2	0,8 : 2,4 : 2,4	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante, tensoativo e Colhibin®	0,25 : 0,75 : 0,75	0,25 : 0,75 : 0,75	0,5 : 1,5 : 1,5	0,35 : 1,05 : 1,05 (± 0,087 : 0,26 : 0,26)	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante, tensoativo e Immucell®	0,25 : 0,75 : 0,75	0,25 : 0,75 : 0,75	0,5 : 1,5 : 1,5	0,25 : 0,75 : 0,75	0,2 : 0,6 : 0,6
Cepa submetida à adaptação em meio com conservante, tensoativo e Revitalin®	0,2 : 0,6 : 0,6	0,25 : 0,75 : 0,75	0,5 : 1,5 : 1,5	0,47 : 1,4 : 1,4 (± 0,06 : 0,17 : 0,17)	0,2 : 0,6 : 0,6

Como pode-se perceber, os diferentes tipos de microrganismos responderam de forma diversa ao teste. Várias das cepas de *E. coli* submetidas ao teste de adaptação foram sensíveis às mesmas concentrações inibitórias mínimas de conservantes que a cepa padrão, com exceção das cepas que eram advindas do teste de adaptação em que os ativos Colhibin® e Immucell® estavam presentes no meio de crescimento, juntamente com o tensoativo não iônico.

As cepas de *S. aureus* responderam de maneira diferente ao teste em relação às cepas de *E. coli*. Os microrganismos que vieram do teste de adaptação em que um dos ativos, conservantes e tensoativo estavam presentes no meio, exigiram menor concentração de conservantes para inibição de crescimento que a cepa padrão. Entretanto, as cepas que cresceram em meio com conservantes e as biomoléculas ou com conservantes e tensoativo no teste de adaptação, apresentaram a necessidade de uma concentração superior de conservantes para inibição do crescimento do que a cepa padrão.

No caso das cepas de *P. aeruginosa*, os microrganismos que tinham como origem o teste de adaptação em que o sistema conservante, tensoativo e um dos ativos estavam presentes no meio, a concentração inibitória mínima do sistema conservante foi maior que o apresentado pela cepa padrão e pelos demais organismos advindos do teste de adaptação. Nota-se que as cepas provindas do teste de adaptação em que estavam presentes o sistema conservante, um dos ativos e o tensoativo necessitaram de uma concentração maior de conservantes, em relação à cepa padrão, para que o crescimento fosse inibido.

Para uma melhor visualização dos resultados obtidos e para comparação dos valores de concentração inibitória mínima obtidos para as diferentes cepas de microrganismos testadas com a concentração de conservantes usadas nas formulações, os resultados foram expressos graficamente. Estes resultados estão apresentados nas figuras 12 a 16. As barras azul e vermelha presentes nas figuras abaixo representam as concentrações de uso de sistema conservante nas formulações. A barra azul ilustra a concentração de uso nas formulações de propilparabeno. Já a barra vermelha, as concentrações de uso de metilparabeno e imidazolidinil uréia nas formulações testadas.

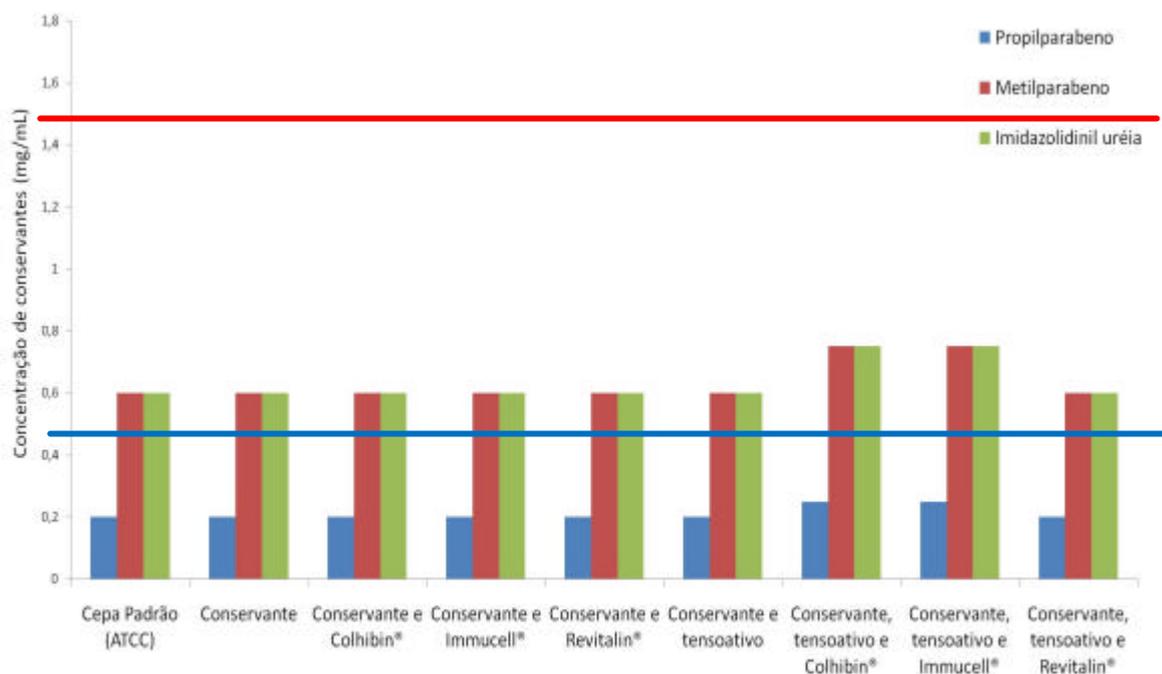


Figura 12. Comparação das concentrações inibitórias mínimas do sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *E. coli* testadas.

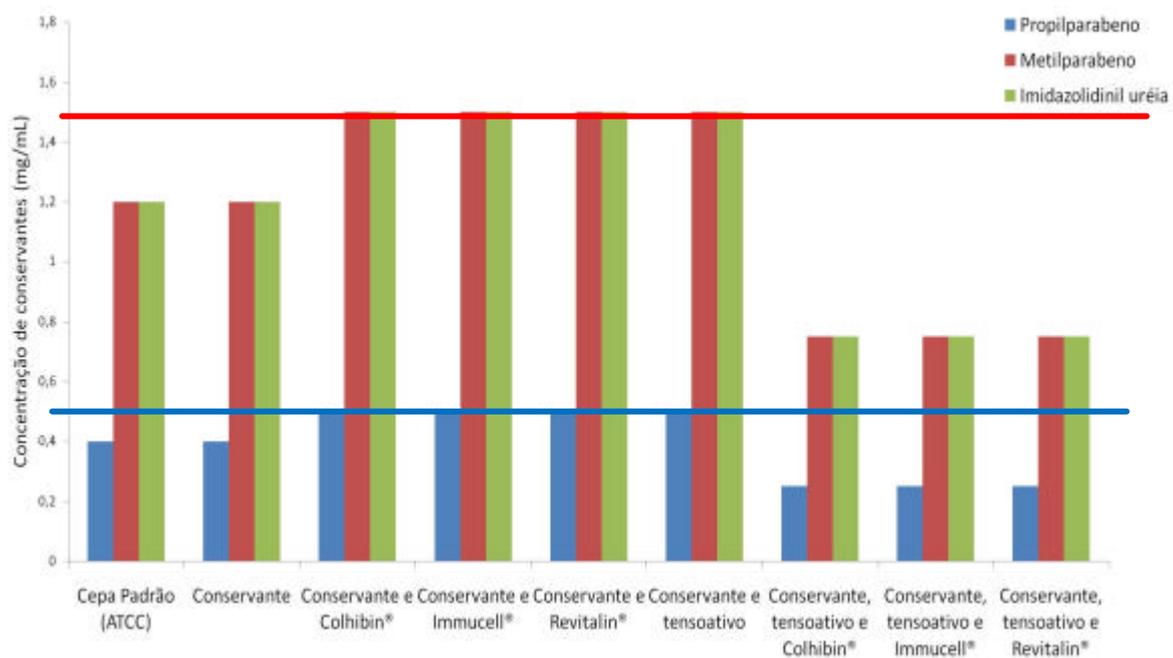


Figura 13. Comparação das concentrações inibitórias mínimas do sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *S. aureus* testadas.

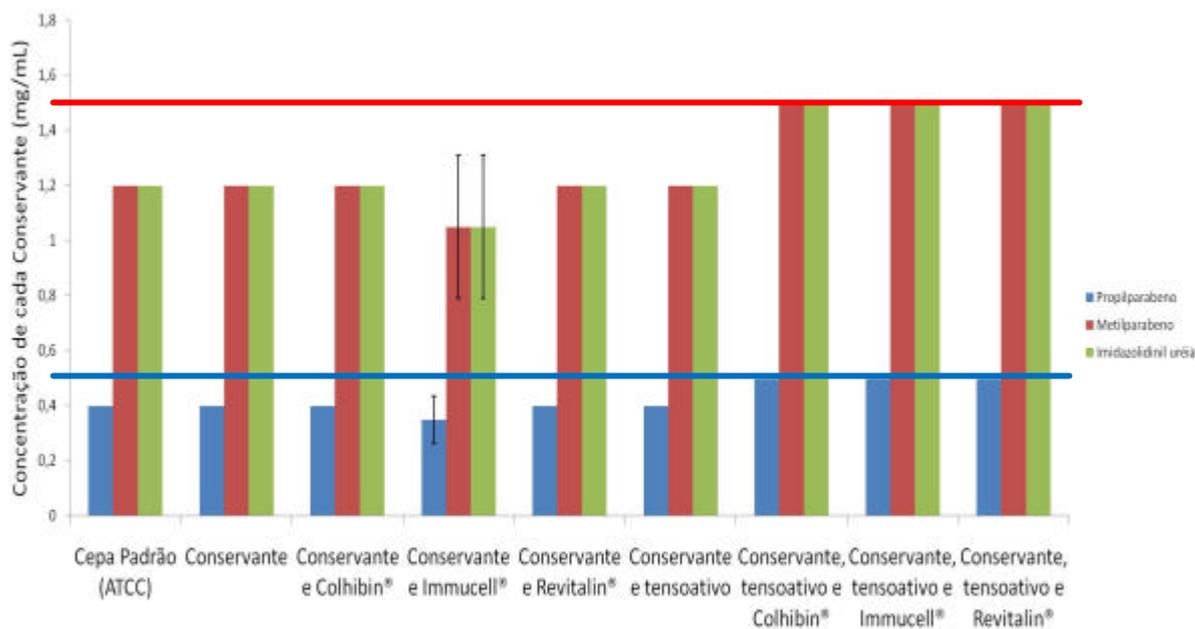


Figura 14. Comparação das concentrações inibitórias mínimas do sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *P. aeruginosa* testadas.

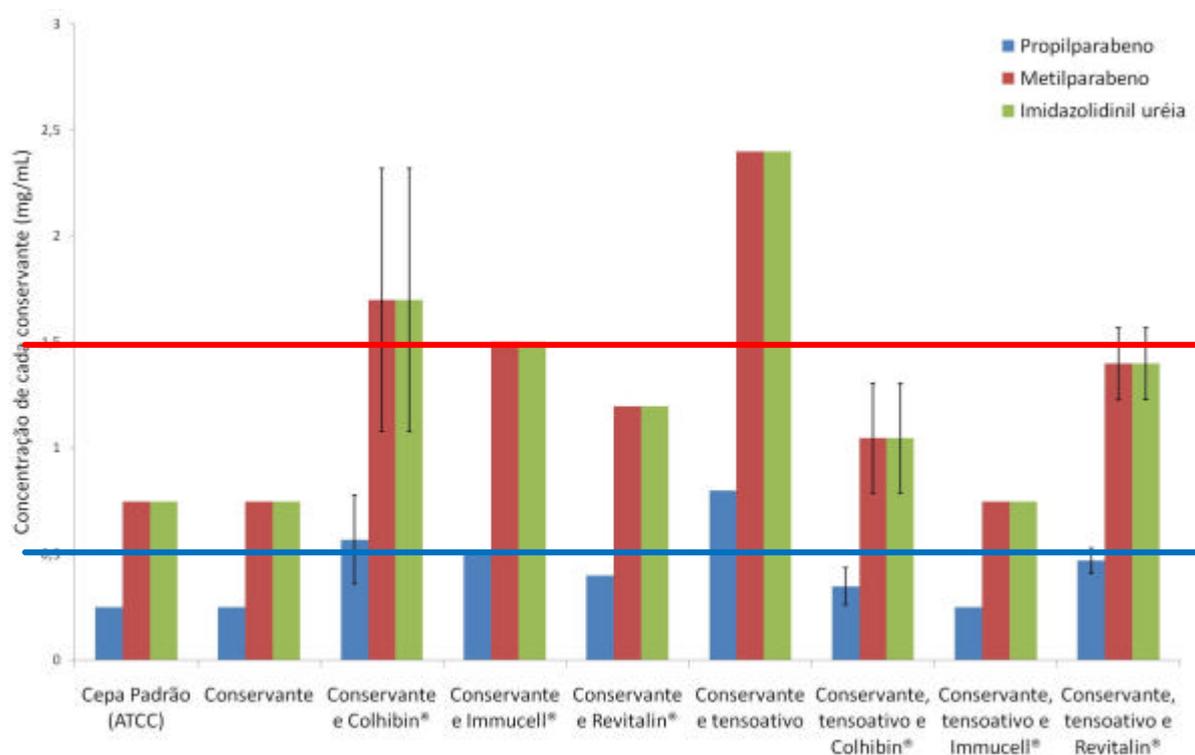


Figura 15. Comparação das concentrações inibitórias mínimas do sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *C. albicans* testadas.

Para *C. albicans* obteve-se um resultado que chamou atenção pelo fato de que as cepas que provinham de teste de adaptação em que estavam presentes no meio de cultura o sistema conservante e Colhibin[®] e também naquele em que havia sistema conservante e tensoativo apresentaram as maiores concentrações inibitórias mínimas e ainda concentrações superiores às utilizadas nas formulações estudadas, expressas pelas linhas contínuas nos gráficos.

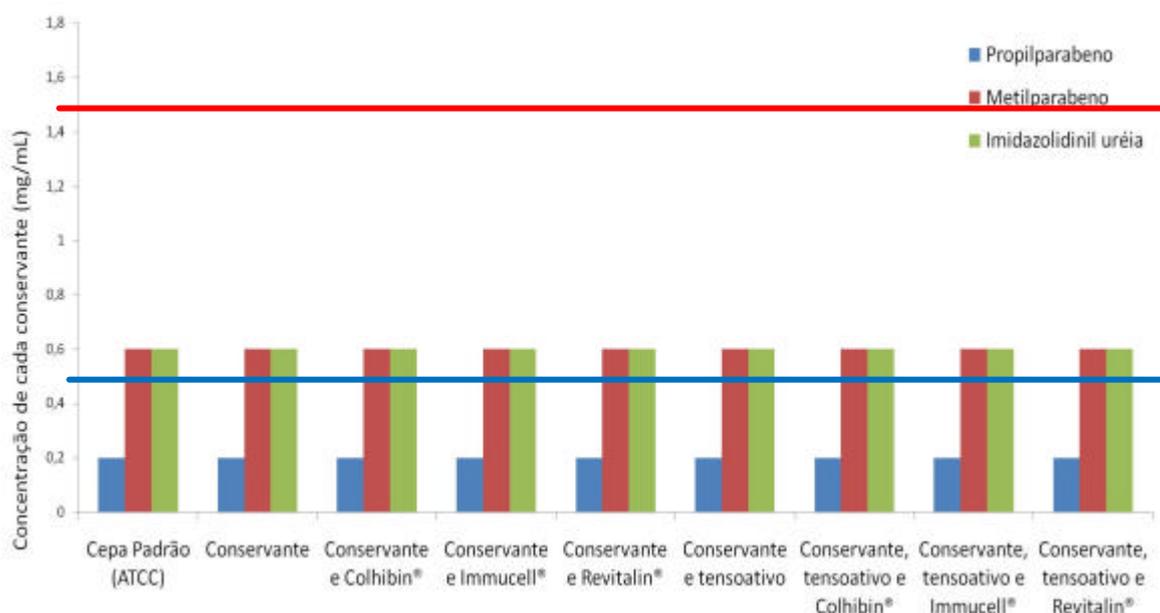


Figura 16. Comparação das concentrações inibitórias mínimas do sistema conservante obtidas para as diferentes cepas de *A. niger* testadas

Quando as cepas testadas eram de *A. niger* obteve-se a mesma concentração inibitória mínima para todos os organismos testados, inclusive a cepa padrão.

6 DISCUSSÃO

Matéria-prima farmacêutica é definida como toda substância, farmacologicamente ativa ou inerte, utilizada no processo de fabricação de uma forma farmacêutica. Esta substância pode permanecer inalterada ou sofrer alguma alteração durante o processo (102). O uso de matérias-primas de boa qualidade microbiológica é um dos requisitos necessários para o cumprimento das boas práticas de fabricação na indústria farmacêutica (103).

O controle de contaminação microbiológica das matérias-primas e materiais de embalagem é extremamente importante, pois os microrganismos podem contaminar tanto o produto nas diferentes etapas do processo de fabricação quanto na sua forma acabada. Os equipamentos também constituem uma fonte de contaminação (104). Os excipientes são, entre todas as matérias-primas, os mais influentes neste tipo de contaminação de produtos, uma vez que são os mais abundantes na formulação. Os microrganismos que aparecem nas matérias-primas podem ser a origem de doenças ou podem causar deterioração dos produtos (102).

Diante da importância do controle microbiológico de matérias-primas, foi realizada a determinação quantitativa de microrganismos viáveis nas matérias-primas utilizadas no preparo das formulações (Tabela 2). Por meio desse ensaio detectamos a presença de microrganismos viáveis em dois dos ativos cosméticos estudados, Colhibin® e Revitalin®. Os microrganismos viáveis presentes nessas formulações estão dentro dos níveis de aceitabilidade da CTFA, que é de até 100 UFC/g ou mL de matéria-prima. Não houve aparecimento de microrganismos viáveis no ativo Immucell®. É importante observar que tanto o Revitalin® quanto o Immucell® são produzidos através de processos fermentativos com *Saccharomyces cerevisiae* enquanto o Colhibin® é resultado de fração isolada de peptídeos de arroz. É comum, e aceitável dentro dos padrões estipulados, que produtos derivados de processos fermentativos carreguem certa quantidade do microrganismo produtor do mesmo. Como as contagens de microrganismos viáveis encontradas estão dentro dos limites permitidos pelo CTFA, esse fator pode ser aceito como não interferente na avaliação microbiológica realizada para as formulações testadas (103).

Os ativos cosméticos utilizados neste estudo foram Immucell®, Colhibin® e Revitalin® (Penthapharm, Basel, Suíça). Immucell® é um ativo cosmético que, apesar

de ter recebido pelo INCI (CTFA) a denominação de glicoproteínas, é uma mistura composta, prioritariamente, de oligopeptídeos glicosilados, além de proteínas e aminoácidos. É isolado e purificado do citosol de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* por métodos de biofermentação. O Colhibin[®], por sua vez, é um ativo cosmético que é resultado de fração isolada de peptídeos de arroz. Ele recebeu pelo INCI (CTFA) a denominação de hidrolisado de proteínas de arroz. Já o Revitalin[®]-BT, ativo cosmético, é uma combinação de constituintes citoplasmáticos e mitocondriais naturais, específicos, selecionados de cepas de espécies naturais de *Saccharomyces cerevisiae*. É produzido por fermentação em condições aeróbicas específicas. Todos esses ativos são conservados com 0,5% de Phenonip[®], que é constituído de parabenos (metil, etil, butil, propil e isobutil parabenos) e fenoxietanol.

O uso de princípios ativos de origem biotecnológica em cosméticos e o uso destes produtos na pele, com o objetivo de proteção ou de tratamento, está em constante crescimento. Os produtos cosméticos e farmacêuticos têm recebido cada vez mais proteínas em sua composição com fins de tratamento da pele, com objetivo de prevenir ou atenuar os danos causados à pele como consequência do envelhecimento (48).

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de proteínas farmacêuticas é lidar com ambas suas instabilidades, química e física (1,5). A instabilidade das proteínas constitui uma barreira indiscutível à comercialização dos produtos farmacêuticos e cosméticos delas derivados (6).

Uma vez que se estima que um adulto utilize, em média, pelo menos sete diferentes produtos cosméticos por dia, a composição e a estabilidade dos cosméticos são de especial importância na nossa vida diária (47).

Além disso, sabendo-se que as proteínas são neutralizadores de conservantes, outro problema que pode resultar da estrutura química desses novos produtos macromoleculares é sua conservação (27,32). Portanto, agentes antimicrobianos, que impeçam o crescimento de microrganismos, desempenham um papel crucial na formulação desses produtos (69).

A presença de água e componentes orgânicos na formulação favorece o crescimento de microrganismos e, em alguns casos, também afetam a estrutura dos conservantes, influenciando na estabilidade do produto, e justificando a necessidade de avaliação microbiológica do produto e matérias-primas (97).

O uso de conservantes é um importante meio de limitação do crescimento microbiano (44) e os conservantes podem exibir atividade microbicida ou bacteriostática. Sua função é proteger os produtos contra a contaminação microbiana. Eles estão dentre os compostos químicos mais ativos biologicamente usados em cosméticos e, como tal, eles são um risco à saúde do consumidor (114). A quantidade exata de conservantes a se adicionar a um produto é um ponto muito importante a ser determinado, pois, se por um lado o uso excessivo pode causar danos aos consumidores, causados por sua alta atividade biológica, por outro, uma dose abaixo da concentração inibitória mínima pode favorecer as contaminações. Isso porque os microrganismos, por sua vez, têm diversas capacidades metabólicas e são hábeis para utilizar qualquer composto orgânico como substrato, além de que a habilidade dos microrganismos para se adaptarem tem sido reconhecida por vários autores (65). Os microrganismos podem se adaptar a condições desfavoráveis usando uma ampla variedade de mecanismos que evitam ou reparam lesões e danos, chamados de estratégias de sobrevivência do microrganismo, que são características morfológicas e processos fisiológicos com os quais os microrganismos reagem às mudanças ambientais (66).

Entretanto, o uso do conservante também pode produzir outros efeitos indesejáveis, que podem aparecer tanto após a primeira aplicação ou após anos de uso do cosmético. Estes efeitos variam de irritação leve da pele a atividade estrogênica e, recentemente, a possibilidade de que eles poderiam ter potencial para induzir tumores de mama em humanos tem sido discutida (104-107). Assim, a escolha correta de conservantes deve garantir a ausência de efeitos colaterais indesejáveis e, ao mesmo tempo satisfazer as exigências de garantir a ausência de ação bacteriana (69). É importante observar que os conservantes utilizados devem estar em conformidade com o estabelecido na Resolução 162/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e suas atualizações (94).

Especialistas em microbiologia, toxicologia, epidemiologia e dermatologia têm discutido os riscos e benefícios de conservantes adicionados aos produtos cosméticos e concordam que o desafio é, simultaneamente, proteger os produtos da deterioração e os consumidores de microrganismos potencialmente patogênicos, sem correr o risco de efeitos adversos (69).

As informações científicas sobre conservantes em cosméticos que ofereçam boa proteção contra a contaminação microbiana é escassa. Desta forma, para os

microbiologistas, para alcançar a eficácia contra microrganismos e evitar a toxicidade direta para os consumidores, deve-se trabalhar dentro de uma faixa estreita de concentrações de conservantes (69).

Assim, como a responsabilidade em relação à avaliação da estabilidade de produtos cosméticos é da empresa fabricante, antes de disponibilizá-los ao consumo, essa avaliação é requisito fundamental à qualidade e à segurança dos mesmos. Produtos que apresentem problemas de estabilidade organoléptica, físico-química e ou microbiológica expostos ao consumo podem colocar em risco a saúde do consumidor, configurando uma infração sanitária (94).

O sistema conservante utilizado no preparo das formulações em estudo foi composto por 0,15% de metilparabeno, 0,05% de propilparabeno e 0,15% de imidazolidinil uréia.

Os parabenos são derivados do ácido p-hidroxibenzóico esterificados na posição C4 e são amplamente utilizados como conservantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (115-118). Sua atividade de conservação aumenta com o comprimento do grupo alquila, de metila para n-butilico (118), e eles mostram efeitos inibitórios no transporte de membrana microbiana e função mitocondrial (119). Cosméticos podem conter vários desses compostos ou apenas um deles (120). Algumas combinações de parabenos podem reduzir a sua eficácia, enquanto outras combinações demonstraram efeitos sinérgicos e proporcionam a conservação contra uma ampla gama de microrganismos. Por exemplo, a combinação de metil e propilparabeno é muitas vezes adicionada às formulações tópicas aquosas, devido aos seus efeitos antimicrobianos sinérgicos (119).

Parabenos possuem várias características de um conservante ideal, incluindo um amplo espectro de atividade antimicrobiana, estabilidade química em relação ao pH (efetivo em pH 4,0 a 8,0) e temperatura, bem como o baixo custo (121).

O grupo dos parabenos inclui metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isopropilparabeno, isobutilparabeno e benzilparabeno. Eles são, em sua maioria, ativos contra fungos. Apresentam atividade contra bactérias Gram positivas, mas são considerados fracos contra bactérias Gram negativas (122). As regulamentações da União Européia e do Brasil permitem o uso de no máximo 0,4% de cada parabeno e um máximo de 0,8% de parabeno total no produto cosmético (48,94).

Já a imidazolidinil uréia é uma uréia heterocíclica, produzida pela reação de alantoína com formaldeído. É comercializada na forma de pó branco, puro. O produto é muito solúvel em água (200 gramas/100 gramas de água), insolúvel em óleo e tem solubilidade limitada em propilenoglicol. Apresenta grande atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas nenhuma atividade contra fungos. Demonstra sinergismo com parabenos. A faixa de pH em que este conservante demonstra atividade antimicrobiana é de 3,0 a 9,0. Na União Européia e no Brasil é permitido o seu uso em nível máximo de 0,6% (48,122).

Baseados na faixa de pH exigida para atividade antimicrobiana efetiva dos conservantes utilizados nas formulações, foi feita a avaliação do pH das formulações de uso tópico desenvolvidas. Por meio deste ensaio pode-se notar que todas as formulações em estudo possuíam pH na faixa de atividade antimicrobiana dos conservantes em uso. Além disso, com a realização de testes estatísticos para verificação de diferenças significativas no pH, foi observado que entre as formulações base e adicionada de Colhibin[®] houve uma diferença significativa de pH. Já quando essa análise foi realizada entre as formulações acrescidas de ativos, uma diferença significativa foi observada entre o pH da formulação adicionada de Colhibin[®] e daquela acrescida de Revitalin[®]. No entanto, como todas as composições apresentaram pH dentro da faixa de atividade efetiva dos conservantes, não se acreditou que essas diferenças pudessem ser relevantes para a avaliação microbiológica.

Os produtos cosméticos mais suscetíveis à contaminação são os que apresentam água em sua formulação, como emulsões, géis, suspensões ou soluções. A utilização de sistemas conservantes adequados e validados, assim como o cumprimento das boas práticas de fabricação são necessários para a conservação adequada das formulações (94).

Segundo a Resolução nº 481 de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais, para produtos cosméticos suscetíveis a contaminação microbiológica, deve ser de não mais que 10^3 UFC/g ou mL; com um limite máximo de 5×10^3 UFC/g ou mL; ausência de *Pseudomonas aeruginosa* em 1 g ou 1 mL; ausência de *Staphylococcus aureus* em 1 g ou 1 mL; ausência de coliformes totais e fecais em 1 g ou 1 mL e ausência de *Clostrídios* sulfito redutores em 1 g (exclusivamente para talcos). Já para produtos de uso infantil, produtos para área dos olhos e produtos que entram

em contato com mucosas, a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais deve ser de não mais que 10^2 UFC/g ou mL com um limite máximo de 5×10^2 UFC/g ou mL; ausência de *Pseudomonas aeruginosa* em 1 g ou 1 mL de produto; ausência de *Staphylococcus aureus* em 1 g ou 1 mL; ausência de coliformes totais e fecais em 1 g ou 1 mL; e ausência de *Clostrídios* sulfito redutores em 1 g (exclusivamente para talcos) de produto (94).

Neste estudo, após uma avaliação de microrganismos viáveis nas formulações preparadas, conforme ilustrado na tabela 3, mais uma vez foram observados crescimentos nas formulações adicionadas com os ativos compostos de macromoléculas, porém todas estavam dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA. Estas formulações foram submetidas ao teste desafio do sistema conservante.

O teste desafio do sistema conservante, também conhecido como *Challenge Test*, ou teste de eficácia antimicrobiana, consiste na contaminação proposital do produto com microrganismos específicos e avaliação da amostra em intervalos de tempo definidos, com o objetivo de avaliar a eficácia do sistema conservante necessário à proteção do produto.

Os microrganismos usados nos testes desafio, teste de adaptação e concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) do sistema conservante foram escolhidos de modo a se utilizar representantes de microrganismos Gram positivos, Gram negativos, Gram negativos não coliformes, bolores e leveduras. Estes microrganismos estão entre os sugeridos para estudos de eficácia de conservantes nas Farmacopéias e literatura pertinente (74).

A escala de MacFarland (contagem por turbidimetria) foi utilizada para se estimar a carga microbiana das suspensões de microrganismos inoculadas nos produtos nos ensaios de desafio do sistema conservante e concentração inibitória mínima. Utilizando-se a turbidimetria como método de estimativa do número de microrganismos, foi possível verificar um crescimento dentro do esperado no inóculo inicial dos produtos. Além disso, este método de determinação da concentração microbiana em suspensão é ágil, quando comparado ao da semeadura em superfície (100).

Para o estudo de controle de qualidade microbiológico, é necessário estimar a eficácia do sistema conservante da formulação após certo tempo de estocagem, segundo Orth (74). Uma vez que nem todas as variáveis que afetam o crescimento

de organismos danificados ou adormecidos são conhecidas, os produtos não devem conter microrganismos viáveis. A coleta de amostras para contagem de microrganismos viáveis das formulações submetidas a teste desafio foi realizada no momento de inóculo (tempo 0), 30 minutos, 1 hora, 2, 4, 6, 24 e 48 horas e 56 dias após o início do teste. Para diluição das amostras, uma solução neutralizadora adequada para inibir a ação do sistema conservante em estudo foi utilizada. A efetividade desta solução neutralizadora foi previamente testada para a formulação em estudo.

As figuras 2 a 6 mostram as curvas de decréscimo de carga microbiana das formulações de gel creme base em comparação às formulações de gel creme adicionadas de Immucell[®], de Colhibin[®] ou de Revitalin[®] que foram desafiadas com *Escherichia coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *A. niger*.

Os diferentes organismos possuem características fisiológicas e metabólicas diversas, assim podem apresentar diferenças nas taxas de morte quando expostos a qualquer tratamento letal. A justificativa para a utilização do método da regressão linear é que cada organismo tem um ritmo característico da morte, quando sujeito a um tratamento letal (54). Desta forma, o valor D fornece uma expressão quantitativa das taxas de mortalidade da população de cada organismo desafiante na amostra de teste. A curva de sobreviventes obtida ao realizar testes de eficácia dos conservantes por este método é funcionalmente equivalente à fase de declínio da curva de crescimento bacteriológico idealizado (82). A mortalidade dos organismos de ensaio numa velocidade mais lenta poderá resultar em desvio de taxas lineares de morte e permitir que os organismos-teste se adaptem e sobrevivam, indicando que o produto não foi devidamente conservado (65).

Os resultados dos testes desafios realizados com as formulações, base e acrescidas com um dos ativos cosméticos Immucell[®], Colhibin[®] e Revitalin[®], são mostrados nas figuras 2 a 6, e os valores D obtidos para esses experimentos estão nas tabelas 5 e 6. As comparações entre o valor D das diversas formulações adicionadas de ativos em relação ao gel creme base de acordo com o organismo desafiante podem ser visualizadas nas figuras 7 a 11. Apesar de alguns experimentos possuírem diferenças em relação ao período requerido para a eliminação do inóculo, os microrganismos testados para as formulações foram eliminados dentro de um prazo considerado aceitável segundo os critérios de aceitabilidade do CTFA que determina que um produto pode ser aprovado no teste

de preservação se a redução de bactérias vegetativas for maior que 99,9% e a de fungos maior que 90%, dentro de um prazo de 7 dias. Dentre os microrganismos testes utilizados, os bolores levaram mais que 48 horas para serem totalmente eliminados. Além desses, *Pseudomonas aeruginosa* na formulação acrescida de Colhibin[®] levou mais de 48 horas para ser eliminada.

Do mesmo modo, segundo os critérios de aceitabilidade do método da regressão linear, que exigem um valor D < 4 horas para patógenos e um valor D < 28 horas para bactérias vegetativas não patogênicas, bolores e leveduras (73), a maioria dos produtos em estudo, com ou sem as biomoléculas, foram adequadamente conservados, exceto quanto o microrganismo desafiador foi a *P. aeruginosa*. A formulação contendo 3% de Colhibin[®] não se encaixou dentro dos critérios de aceitabilidade que exige um valor D < 4 para patógenos. Essa formulação apresentou um valor D de 11,57 quando desafiada por *P. aeruginosa*, ou seja, 2,89 vezes maior que o permitido. Além disso, uma atenção especial deve ser dada para as formulações contendo 3% de Immucell[®] e 3% de Revitalin[®] inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa*, que não obtiveram um resultado aceitável segundo os critérios estabelecidos, sendo seus valores D, respectivamente, 4,76 e 4,01, e que poderiam ser um problema principalmente para indivíduos imunodeprimidos.

Os valores D foram determinados e, juntamente com o tempo estimado para a eliminação da carga microbiana total estão apresentados na tabela 6. Podemos observar que os valores experimentais estão próximos aos valores estimados e que em sua maioria estão dentro dos prazos de eliminação aceitos pelos critérios do CTFA.

Comparando os valores D obtidos em testes desafios, figuras 7 a 11, percebeu-se que, quando o microrganismo desafiador era *Escherichia coli*, o gel creme adicionado de Immucell[®] foi o que apresentou um maior aumento percentual, 61%, no valor D em relação ao do gel creme base. Já quando o desafiante era o *Staphylococcus aureus*, a formulação adicionada de Colhibin[®] apresentou um tempo de redução decimal 117,32% maior que a base. Essa mesma formulação foi a que mostrou um maior aumento percentual no valor D, 310%, para o teste desafio com *Pseudomonas aeruginosa*. Quando o mesmo teste foi realizado para *Candida albicans*, o maior valor D foi o apresentado pela formulação adicionada de Immucell[®], 18% maior que o mesmo parâmetro obtido para a base. Em se tratando de tempo de redução decimal para o teste de *Aspergillus Niger*, a formulação

acrescida de Immucell[®] foi a que mostrou um maior aumento do valor D, 166,31%, em relação ao gel creme base.

Nenhuma das formulações submetidas ao teste desafio do sistema conservante apresentou crescimento de microrganismos na avaliação realizada 56 dias após o inóculo inicial.

Podemos concluir, portanto, segundo os valores obtidos nos testes desafios, que a formulação base está adequadamente conservada, mas que a presença das biomoléculas farmacêuticas na formulação pode provocar modificações no comportamento do sistema conservante frente a alguns dos microrganismos. Isso é um indício de que formulações com adição de proteína ou peptídeos devem merecer um cuidado aumentado com relação à sua conservação e produção.

Os microrganismos respondem às condições físicas e químicas presentes no seu ambiente com suas estratégias de sobrevivência (74) e estas incluem reações metabólicas, com produção de enzimas que podem proteger suas células.

Segundo Meyer (108), resistência é um fenômeno determinado geneticamente e tem que ser distinguido de processos de adaptação fenotípicos em que não há herança e transferência sustentada após a remoção de pressão seletiva. Muitos relatos de resistência a substâncias biocidas descrevem, na verdade, a adaptação fenotípica.

O termo resistência adquirida é utilizado para certas cepas de espécies microbianas que diferem significativamente em sua suscetibilidade a biocidas quando comparadas com a média das espécies (109,110). Já a tolerância ou adaptação fenotípica é um fenômeno definido como uma modificação transiente na suscetibilidade causada por fatores ambientais como o modo de crescimento como biofilme (110).

A literatura que descreve a resistência a biocidas pode ser encontrada desde a década de 50 do século passado. Várias revisões têm sido publicadas recentemente e são extensivamente referenciadas (89). Como resultado dos trabalhos realizados, principalmente nos últimos 20 anos, tem se tornado claro que bactérias utilizam as mesmas três principais estratégias de resistência empregadas para resistência a antibióticos: alteração do alvo, inativação e redução de acesso ao alvo. A redução do acesso ao alvo pode ser acompanhada de efluxo ou exclusão (110).

Assim, testes de adaptação microbiana frente ao sistema conservante foram realizados para confirmação do risco que poderia ser causado pela presença das

biomoléculas na conservação das formas farmacêuticas. Neste teste, os microrganismos foram semeados em meio líquido contendo os conservantes utilizados na formulação, as biomoléculas em estudo e o tensoativo não iônico em diferentes concentrações, começando o teste da menor e passando sucessivamente para a maior concentração de conservantes, como descrito por Favet e colaboradores (90). Caso não houvesse crescimento na primeira transferência de microrganismos de uma concentração menor para maior, o procedimento era repetido por mais duas vezes. Este procedimento foi repetido até que se encontrou a maior concentração de sistema conservante em que cada microrganismo foi capaz de sobreviver. Os resultados obtidos para esse ensaio podem ser vistos nas tabelas 7 a 11.

Quando o microrganismo testado foi *E. coli*, os resultados mostraram que as cepas crescidas em meio em que estavam presentes o sistema conservante e o tensoativo ou o sistema conservante, tensoativo e um dos ativos foram os que apresentaram um crescimento do microrganismo em maiores concentrações de conservantes.

O teste de adaptação microbiana realizado para *S. aureus* mostrou um padrão de resposta semelhante ao de *E. coli* no que diz respeito aos microrganismos que apresentaram crescimento em maior concentração de conservantes. Neste teste, os microrganismos que cresceram em meio em que estavam presentes o sistema conservante e tensoativo ou o sistema conservante, tensoativo e um dos ativos foram os que apresentaram um crescimento microbiano em maior concentração de conservantes. A concentração mínima em que os microrganismos não cresceram neste teste foi superior (0,8 mg de propilparabeno, 2,4 mg de metilparabeno e 2,4 mg de imidazolidinil uréia por mL) à de uso do sistema conservante nas formulações de gel creme (0,5 mg de propilparabeno, 1,5 mg de metilparabeno e 1,5 mg de imidazolidinil uréia por mL) - tabela 8.

Para *P. aeruginosa*, o ensaio de adaptação (tabela 9) revelou um comportamento semelhante aos realizados para *E. coli* e *S. aureus*. Porém, a maior concentração de sistema conservante em que o microrganismo foi capaz de sobreviver foi ainda maior que os anteriores. A concentração de conservantes que conseguiu eliminar os microrganismos foi o dobro da concentração utilizada nas formulações (1,0 mg de propilparabeno, 3,0 mg de metilparabeno e 3,0 mg de imidazolidinil uréia por mL).

Quando o microrganismo testado foi *C. albicans*, fenômeno parecido ao ocorrido nos teste de adaptação para os outros organismos foi constatado (tabela 10). Entretanto, para esse, notou-se que a simples presença de um dos ativos ou tensoativo não iônico já foi suficiente para que os organismos crescessem até uma concentração de conservantes superior a do organismo que passou pelo mesmo teste em meio em que havia apenas o sistema conservante (0,2 mg de propilparabeno, 3,0 mg de metilparabeno e 3,0 mg de imidazolidinil uréia por mL). A cepa de *C. albicans* que cresceu em meio de cultura em que estavam presentes um dos ativos e o tensoativo, além do sistema conservante, precisou de uma maior concentração de conservantes para ser eliminada, em relação às cepas que estiveram em contato com as outras condições de meio de crescimento (tabela 10).

No teste de adaptação a que foram submetidas as cepas de *A. niger* (tabela 11) ocorreu um fenômeno diferente, apenas os microrganismos que cresceram em meio de cultura em que havia sistema conservante e Colhibin[®] ou sistema conservante e tensoativo necessitaram de concentrações de conservantes maiores que as demais para terem seu crescimento inibido. Em sua maioria, *A. niger* sobreviveu apenas à primeira concentração de sistema conservante no teste de adaptação (0,05 mg de propilparabeno, 0,15 mg de metilparabeno e 0,15 mg de imidazolidinil uréia por mL).

A partir dos resultados obtidos no teste de adaptação microbiana é possível perceber que a presença de ativos derivados protéicos e tensoativo não iônico interferem na capacidade de adaptação dos microrganismos testados em relação ao sistema conservante. Entre os microrganismos estudados, os que mostraram maior diferença de comportamento em relação à cepa padrão em termos de concentração inibitória (mg/mL) do sistema conservante quando a base auto-emulsificante e um dos ativos faziam parte da solução foram: *C. albicans*, concentração necessária para inibição de crescimento até 5 vezes maior que a da cepa padrão; *S. aureus*, uma concentração 3,2 vezes maior de sistema conservante para inibição de crescimento obtida pela cepa submetida a teste apenas com conservante e *P. aeruginosa* que necessitou de 2 vezes mais sistema conservante para eliminação de crescimento.

A suscetibilidade dos organismos a conservantes varia com a natureza dos componentes de uma formulação e com a possibilidade de interação entre eles. Uma concentração normalmente ativa de conservantes pode estar presente num produto, e essa pode não ser totalmente efetiva, pois os microrganismos podem estar protegidos de sua ação (54). Fatores que afetam o estado da superfície celular

podem alterar, em extensão, o processo de adsorção. Foi demonstrado, por exemplo, que a adição de baixas concentrações de detergentes catiônicos pode potencializar o efeito biológico de agentes antibacterianos como os fenóis (113).

Em 1962, Judis estudou o mecanismo de ação de desinfetantes fenólicos por medida da liberação da atividade radioativa em células de *E. coli* marcadas com carbono 14. O tensoativo Tween 80 agiu como um protetor dos efeitos letais de o-cloro-m-xilenol em *E. coli* e preveniu, em parte, a fuga do conteúdo celular. Beckett e Robinson, em 1958, encontraram que a adição de concentrações extremamente baixas de monocetil polietilenoglicol 1000 (cetomacrogol) reduziu a quantidade de hexil-resorcinol absorvido por *E. coli* em várias concentrações diferentes. Portanto, os autores concluíram que o tensoativo não iônico interferiu na interação de medicamentos com a membrana citoplasmática no organismo. Achados similares foram encontrados para o Tween 80 e laurato de polietilenoglicol 400 que protegeram as células de *E. coli*, *Pseudomonas fluorescense* e *Streptococcus bovis* em relação aos efeitos inibitórios de conservantes (89,92).

Entretanto, os efeitos da estrutura do tensoativo não iônico polietileno aquil éster na absorção de butilparabeno pela matriz lipídica celular e o aumento da eficácia do conservante foi relatada por Fukahori e colaboradores (93).

Os microrganismos padrões e as cepas obtidas após o crescimento nos meios contendo o sistema conservante, tensoativo não iônico e um ativo foram submetidos a um teste de concentração inibitória mínima (MIC), pelo ensaio da diluição seriada, como descrito por Kavanagh (100). Esse ensaio foi realizado para comparar a menor concentração em que os microrganismos podem sobreviver após serem submetidos ao teste de adaptação e como cepas padrões. O método de diluição determina a concentração mínima de sistema conservante necessário para inibir o crescimento ou matar um microrganismo.

Observando a tabela 12, e a figura 12, é possível observar que as cepas de *E. coli* submetidas ao teste de adaptação e a cepa padrão apresentaram concentrações inibitórias mínimas similares. Os microrganismos submetidos ao teste de adaptação em presença de um dos ativos, tensoativo e o sistema conservante foram os que apresentaram uma maior concentração de inibição de crescimento no ensaio de MIC. Isto sugere que esses últimos podem ter sofrido um processo de adaptação ao sistema conservante.

No entanto, observando a tabela 12, e a figura 13, nota-se que as cepas de *S. aureus* submetidas ao teste de adaptação e a cepa padrão apresentaram comportamentos bem diferentes nos ensaios realizados. Os microrganismos submetidos ao teste de adaptação em presença de um dos ativos, tensoativo e o sistema conservante foram os que apresentaram as menores concentrações de inibição de crescimento no MIC.

Segundo Russel e Chopra, a resistência a conservantes determinada por mutações em genes cromossomais tem sido pouco estudada em comparação a resistência a antibióticos. Entretanto, observou-se que células bacterianas podem se adaptar em presença de altas concentrações de um conservante. Resistência aumentada a clorexidina e a compostos de amônio quartenário foram descritas, mas essa resistência é relatada como instável pelo fato da transferência de resistência a células em um meio livre de conservante, e então, remoção da pressão seletiva, geralmente levar a mutações de retorno e re-expressão do fenótipo sensível. Esse fenômeno pode ter ocorrido com as cepas de *S. aureus* que cresceram em meio adicionado de conservantes, um dos ativos e do tensoativo não iônico. Pode ter ocorrido a re-expressão do fenótipo sensível aos conservantes pela transferência dos microrganismos provenientes do teste de adaptação para meio inclinado, livre de qualquer conservante ou dos ativos derivados protéicos. Os resultados sugerem que o que ocorreu não deve ter sido uma adaptação fenotípica pelo fato das concentrações inibitórias mínimas dessas cepas terem sido inferiores às concentrações de inibição exigidas para a cepa padrão, ou seja, acredita-se que não houve a re-expressão do fenótipo anterior e sim de um fenótipo mais sensível ao conservante (105).

Em qualquer situação em que bactérias estejam expostas a um conservante químico inibitório, ou a agentes físicos, é possível que a população bacteriana seja, depois da exposição, constituída por células não afetadas, em um extremo, e células irreversivelmente inativadas, em outro. Vários são os graus de danos que podem ocorrer, variando de danos leves a severos. Células danificadas são particularmente sensíveis a meios seletivos, mas isso pode ser utilizado como medida de seu reparo ao dano causado (46).

Recentemente, Collins e colaboradores mostraram que quando o grupo de bactérias está ameaçado, as bactérias mais fortes se sacrificam em prol das outras, ao contrário do que se imaginava previamente. Os cientistas acreditavam que a

resistência aos antibióticos acontecia quando uma bactéria sofria mutações genéticas, tornando-se indiferente à ação do medicamento. Como esses microrganismos se dividem para criar novos exemplares, achava-se que a superbactéria disseminava a mutação para suas descendentes. No novo estudo, porém, foi comprovado que as bactérias trabalham de uma forma diferente. Quando confrontou um ataque violento de antibióticos, a cepa mais resistente de *Escherichia coli* produziu, às custas de sua própria energia, uma proteína que desencadeava um mecanismo de proteção às vizinhas mais fracas (111).

Concentrações inibitórias mínimas superiores às apresentadas pelas demais cepas foram visualizadas nos testes com as cepas de *P. aeruginosa* que haviam crescido em presença do sistema conservante, tensoativo e um dos ativos. Esses microrganismos conseguiram resistir a uma concentração inibitória mínima de conservantes superior às utilizadas nas formulações de gel creme. Desta forma, diante dos resultados obtidos nos testes desafios, testes de adaptação e MIC para *Pseudomonas aeruginosa* é possível perceber que realmente houve uma alteração na suscetibilidade do microrganismo ao sistema conservante nas formulações acrescidas de ativos protéicos. Esses resultados são importantes pelo fato desse microrganismo ser um patógeno oportunista e ser encontrada nos mais diferentes ambientes, principalmente na água.

Organismos cujos valores de MIC estão acima de uma determinada faixa de concentração são denominados resistentes. Alguns desses parâmetros obviamente não se aplicam a biocidas. Em adição, uma definição paralela de resistência tem ido contra aos que definem resistência como um aumento mensurável no valor de MIC, às vezes por um fator de 4 a 16 vezes. Tolerância é muito diferente de resistência, e é usada para descrever microrganismos que são inibidos, mas não mortos por agentes antimicrobianos (110).

Comparando o MIC realizado para *C. albicans*, nota-se que as cepas que cresceram em meio de cultura contendo Colhibin[®] e sistema conservante ou sistema conservante e tensoativo apresentaram maiores concentrações inibitórias mínimas.

Apesar do valor D obtido nos testes desafios para as formulações acrescidas de Colhibin[®] e Revitalin[®] sofrerem diminuição em relação ao valor D mostrado para a formulação base, os testes de adaptação e MIC mostraram que esse microrganismo pode mostrar uma maior capacidade adaptativa e alteração em sua suscetibilidade ao sistema conservante quando os mesmos ativos estão presentes em combinação

com o tensoativo não iônico. Quando a cepa de *C. albicans* provinha do teste de adaptação em que estavam presentes no meio de cultura apenas o sistema conservante e Colhibin[®], a suscetibilidade ao sistema conservante se mostrou menor em relação às cepas que eram advindas do teste adaptação em que estavam presentes no meio de cultura o sistema conservante, tensoativo e Colhibin[®].

Resistência fenotípica adquirida a conservantes ácidos lipofílicos, como ácido benzóico e ácido ascórbico, é bem conhecida em leveduras (112). Isso resulta do aumento na habilidade das células adaptadas de catalisar a extrusão de ácidos dependente de energia. Esses mecanismos não foram observados para bactérias. Entretanto, os níveis de resistência adquirida de bactérias à maioria dos ácidos orgânicos raramente excede duas a três vezes (44).

Em relação ao *A. niger*, os resultados do MIC revelaram que não houve aumento de concentração inibitória mínima entre as cepas advindas de teste de adaptação e a cepa padrão. Os microrganismos que passaram por teste de adaptação em que havia Colhibin[®] e sistema conservante ou tensoativo e sistema conservante no meio de cultura mostraram uma necessidade de maiores concentrações de conservantes para a inibição do crescimento microbiano nesse teste, porém exibiram a mesma concentração inibitória no teste de MIC (0,2 mg de propilparabeno, 0,6 mg de metilparabeno e 0,6 mg de imidazolidinil uréia por mL).

Outra maneira eficaz de controle, e ainda de prevenção ou superação da resistência, é usar sistemas conservantes que dependem de efeitos combinados de vários fatores. Por exemplo, combinações de conservantes podem aumentar o espectro de atividade, diminuir a resistência e reduzir os efeitos tóxicos. Outra combinação de fatores que inclui pH subótimo, temperatura, pressão osmótica de sistemas e atmosfera da embalagem deve ser considerada como a própria conservação química (44).

Os resultados obtidos pelo método de diluição em meio líquido revelaram que o comportamento dos microrganismos difere em relação à cepa padrão quando estão presentes no meio de crescimento derivados protéicos e tensoativo não iônico. Porém, é possível verificar também com este teste que as formulações encontram-se adequadamente conservadas pelo fato das concentrações inibitórias mínimas das cepas que passaram por teste de adaptação em que estavam presentes tensoativo não iônico, sistema conservante e um dos ativos cosméticos ter sido inferior ou, no máximo, igual à concentração de uso do sistema conservante (0,05% de

propilparabeno; 0,15% de metilparabeno e 0,15% de imidazolidinil uréia) nas formulações estudadas, exceto para a *Candida albicans*.

7 CONCLUSÃO

A formulação base estudada foi adequadamente conservada, mas foi possível observar uma alteração na eficácia do sistema conservante desta formulação quando derivados protéicos e tensoativo não iônico estavam presentes conjuntamente na mesma. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que Immucell[®], Colhibin[®] e Revitalin[®], macromoléculas farmacêuticas utilizadas como ativos cosméticos, diminuem a eficácia do sistema conservante composto por metilparabeno, propilparabeno e imidazolidinil uréia na formulação estudada. Esse efeito pode levar à adaptação de microrganismos aos conservantes e colocar em risco a saúde dos usuários de produtos cosméticos e farmacêuticos, caso o sistema conservante utilizado nas formulações não seja cuidadosamente avaliado. O conhecimento detalhado de como esta redução de eficácia pode ser prejudicial à conservação do produto serve de base para um melhor cuidado no desenvolvimento de formulações, pois esse sistema conservante é amplamente empregado na manipulação de medicamentos e cosméticos e a adição de biomoléculas farmacêuticas a eles é cada vez mais freqüente.

Foi observado que, mesmo quando o valor D obtido no teste desafio estava dentro dos níveis aceitáveis, houve uma tendência à adaptação por parte de certos microrganismos ao sistema conservante testado quando proteínas farmacêuticas e o tensoativo não iônico estavam presentes no meio.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Solá, RJ; Griebenow, K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* July 25, 2008.
2. Solá, RJ; Griebenow, K. E. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2009 April; 98(4): 1223-1245. Doi:10.1002/jps.21504.
3. Fontana, A; Spolare, B; Mero, A; Veronese, F. Site-specific modification and pegylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 13–28, 2008.
4. Sekhon, BS. Biopharmaceuticals: an overview. *Thai J. Pharm. Sci.* 34 (2010) 1-19.
5. Rader, RA. (Re)defining biopharmaceutical. Commentary, *Nature Biotechnology*, Vol. 26, number 7, 743-751(2008).
6. Manning, MC; Chou, DK; Murphy, BM; Payne, RW; Katayama, DS. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharmaceutical Research*, Vol.27, no 4, April 2010.
7. Vongenberg, FR; Holland, JP; Liebeskind, D. Employer Benefit Design Considerations for the Era of Biotech Drugs. *JOEM*, 49 (6): 626-32, 2007.
8. Burgess, DJ; In: Pezzuto, JM; Johnson, ME; Manasse, HR. Physical Instability of Proteins. *Biotechnology and pharmacy*. New York, 1993, p. 118-122.
9. Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in Biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 289 (1-2): 1-30.
10. Salmaso, S; Bersani, S; Semenzato, A; Caliceti, P. Nanotechnologies in protein delivery. *J Nanosci Nanotechnol*, Italy, 6(9-10):2736-53), 2006.
11. Pasut, G and Veronese, FM. Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Progress in Polymer Science. Polymers in Biomedical Applications* Volume 32, Issues 8-9: 933-961, August-September 2007.
12. Rader, RA. Biopharmaceutical? - Part 1: (Bio)Technology-Based Definitions. *Bioexecutive International* , MARCH, 2005.

13. Azevedo, AM; Rosa, PAJ; Ferreira, F and Barros, MRA. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends in Biotechnology*, 27 (4): 240-247, 2009.
14. Redman, ERM.(2009). Animal-Derived Pharmaceutical Proteins', *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 30: 3, 262 — 290. To link to this Article: DOI 10.1080/15321810903084400.
15. Walsh, G. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology – second edition – 2003*, wiley – 5-6.
16. Walsh, G. *Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions*. *Trends in Biotechnology*. Volume 23, Issue 11, November 2005, Pages 553-558
17. Crommelin, DJA; Storm, G.; Verrijck R.; Leede L.; Jiskoot, W., and Hennink, W E. Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs, *Int. J. Pharm.* 266: 3-16, (2003).
18. Hu, X.; Ma, Q., and Zhang, S. (2006). *Biopharmaceuticals in China*, *Biotechnol. J.*†1: 1215-1224.
19. Cahill, D J. Protein and antibody arrays and their medical applications. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 250 (1-2): 81-91.
20. Walsh, G; Headon, DR. *Protein Biotechnology*. *Journal of Basic Microbiology*. Volume 35, Issue 3, page 178, 1995.
21. Salmaso, S; Semenzato, A; Bersania, S; Chinol, M; Paganelli, G and Caliceti P. Preparation and characterization of active site protected poly(ethylene glycol)–avidin bioconjugates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects - Volume 1726, Issue 1, 30 October 2005, Pages 57-66*.
22. Piedmonte, DM; Treuheit, MJ. *Formulation of Neulasta® (pegfilgrastim) - Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier, 2008.
23. Smith, RAG; *et al.* Chemical derivatization of therapeutic proteins. *TIBTECH* 11:397-403 (1993).
24. Jovanovic´, N; Bouchard, A; Hofland, GW.; Witkamp, GJ; Daan, JA, Crommelin, DJA and Jiskoot, W. Stabilization of Proteins in Dry Powder Formulations Using Supercritical Fluid Technology. *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, No. 11, November 2004.
25. Ryan, SM; Mantovani, G; Wang, X; Haddleton, DM & Brayden, DJ. Advances in pegylation of important biotech molecules: delivery aspects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, Vol. 5, No. 4, Pages 371-383, 2008.

26. Mire-Sluis, AR. Progress in the use of biological assays during the development of biotechnology products. *Pharm Res*, 18 (9):1239-1246. , 2001.
27. Capelle, MA; Gurny, R; Arvinte, T. High through put screening of protein formulation stability: practical considerations. *Eur J Pharm Biopharm*. Geneva, Switzerland;65 (2):131-148, 2007.
28. Lai, MC; Topp, EM. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (5): 489-500, 2000.
29. Frokjaer, S; Otzen, D E. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat. Rev. Drug Discov*. 4(4): 298-306, 2005.
30. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 203 (2000) 1–60.
31. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. Volume 185, Issue 2, 20 August 1999, Pages 129-188 (1999)
32. Costantino, HR; Langer, R; Klibanov, AM. Solid-phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions. *J Pharm Sci, United States*. 83(12): 1662-1669, Dec 1994.
33. Chiti, F; Stefani, M; Taddei, N; Ramponi, G & Dobson, CM. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* 424, 805-808 (14 August 2003) | doi:10.1038/nature01891.
34. Gupta, R et al. Antimicrobial susceptibility and frequency of Clinical blood isolates in Europe from SENTRY antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998. *Clinical infectious diseases*, 2000: 454-460.
35. Carpenter, Stephen R. 1999. Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: Reply. *Ecology* 80:1085–1088.
36. Jorgensen, L; Moeller, EH; Van de weert, M; Nielsen, HM; Frokjaer, S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *Eur J Pharm Sci.*, 29(3-4): 174-82, 2006.
37. Inada, Y; *et al.* Biomedical and biotechnological applications of PEG-and PM-modified proteins. *Trends in Biotechnology*, Elsevier -1995.
38. Veronese, F. M. Peptide and protein pegylation a review of problems and solutions. *Biomaterials*. Volume 22:405-417, Issue 5, March 1, 2001.
39. Khandare, J; Minko, T. Polymer–drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. Elsevier, 2006.

40. Bailon, P; Berthold, W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, Elsevier - 1998.
41. Bolle, A; Mirimanoff, A. Antagonism between non-ionic detergents and antiseptics. *J Pharm Pharmacol*, 2(10):685-92, Oct 1950.
42. Singer, S. The Use of Preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media. *Cosmet & Toilet*. 102(12): 55-60, 1987.
43. Blanchard, J; Fink, WT; Duffy, JP. Effect of sorbitol on interaction of phenolic preservatives with polysorbate 80. *J Pharm Sci*, 66(10): 1470-3, 1977.
44. Russell, AD. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 71, Issue 3, pages 191–201, September 1991.
45. Orth, DS. Principles of Preservation. Denyer SP Baird RM. In: *Guide to microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*. Second Edition. Boca Raton, London, New York: CRC Press. 2007. P. 309-321.
46. Fassihi, RA. Preservation and Microbiological Attributes of Nonsterile Pharmaceuticals Products. Block, SS. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
47. Ravita, TD; Tanner, RS; Ahearn, DG; Arms, EL; Crockett, PT. Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2009) 36:35-38.
48. Geis, PA. *Cosmetic Microbiology, A Practical Approach*. Second Edition, Chapter Six. Taylor & Francis Group New York, 2006.
49. Brannan, DK. Cosmetic preservation. *J Soc Cosmet Chem* (1995) 46:199–220. Brannan, DK. Cosmetic microbiology. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, Boca Raton, (1992), vol 1, pp 593–603.
50. Hugo and Russell's *Pharmaceutical Microbiology*. 7th ed. Denyer, S.P., Hodges, N.A., and Gorman, S.P., Eds. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 263–284 (1991).
51. Orth, DS. (1979). Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 30, 321–332.
52. Orth, DS. (1999a). *An Introduction to Cosmetic Microbiology*. IFSCC Monograph Number 5. Micelle Press, Weymouth, U.K.

53. Orth, DS and Kabara, J.J. (1998). Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: application of hurdle technology. *Cosmet. Toiletr.*, 113(4), 51, 52, 54, 56–58.
54. Russell, AD. Challenge Testing: Principles and Practices. *International Journal of Cosmetic Science*, 2003, 25, 147-153.
55. Singh, A et al. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25 (2007) 99–121.
56. Moat, AG. and Foster, JW. *Microbial Physiology*. 2nd ed. Wiley, New York, pp.523–578(1988).
57. Dunnigan, AP and Evans, JR. (1970). Report of a special survey: microbiological contamination of topical drugs and cosmetics. *TGA Cosmet. J.*, 2, 39–41.
58. Bruch, CW. (1971). Cosmetics: sterility vs. Microbial control. *Am. Perfum. Cosmet.*, 86, 45–50.
59. Baird, RM. (1977). Microbial contamination of cosmetic products. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 28, 17–20.
60. McCarthy, T.J. (1980). Microbiological control of cosmetic products. *Cosmet. Toiletr.*, 95(8), 23–27.
61. Orth, DS. Putting the Phoenix phenomenon into perspective. *Cosmet. Toiletr.*, (1999b). 114(4), 61–66.
62. Dunnigan, AP. (1968). Microbiological control of cosmetic products. Proceedings of the Joint Conference. *Cosmetic Science*, Washington, DC, April 21–23, 1968. Cited in McCarthy, T.J. (1984). Formulated factors affecting the activity of preservatives. In *Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice*. Kabara, J.J., Ed. Marcel Dekker, New York, pp. 359–388.
63. Bruch, CW. (1972). Objectionable micro-organisms in non-sterile drugs and cosmetics. *Drug Cosmet. Ind.*, 111(4), 51–54, 151–156.
64. Polati, S; Gosetti, F e Gennaro, MC. Preservatives in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods. Salvador, A; Chisvert, A. In: *Analysis of Cosmetic Products*. First Edition. Amsterdam: Elsevier. 2007, p. 210-241.
65. Noble, WC. and Savin, JA. (1966). Steroid cream contaminated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, i, 347–349.
66. Cowen, RA. and Steiger, B. Why a preservative system must be tailored to a specific product. *Cosmet. Toiletr.* (1977)., 92(3), 15–16, 18–20.

67. Bhadaurie, R and Ahearn, DG. (1980). Loss of effectiveness of preservative systems of mascaras with age. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 665–667.
68. Orth, DS, Lutes, CM, Milstein, SR, and Allinger, JJ (1987). Determination of shampoo preservative stability and apparent activation energies by the linear regression method of preservative efficacy testing. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 38, 307–319.
69. Orth, DS. (1997). Inactivation of preservatives in surfactants. In *Surfactants in Cosmetics*. Rieger, M.M. and Rhein, L.D., Eds. 2nd ed. Marcel Dekker, New York, pp. 583–603.
70. Campana R; Scesa C; Patrone V; Vittoria E; BaVone W. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative. *Lett Appl Microbiol* (2006), 43:301–306. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01952.x
71. Cosmetic T, Fragrance Association (1983) Microbiological limit guidelines for cosmetics and toiletries. CTFA technical guidelines. Cosmetic, toiletry, and fragrance association, Inc., Washington.
72. Orth, DS and Lutes, CM (1985). Adaptation of bacteria to cosmetic preservatives. *Cosmet. Toiletr.*, 100(2), 57–59, 63–64.
73. Levy, E. (1987). Insights into microbial adaptation to cosmetic and pharmaceutical products. *Cosmet. Toiletr.*, 102(12), 69–74.
74. Orth, DS. (1993). *Handbook of Cosmetic Microbiology*. Marcel Dekker, New York.
75. Close, J and Nielsen, PA (1976). Resistance of a strain of *Pseudomonas cepacia* to esters of p-hydroxybenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 718–722.
76. Yablonski, ME; Burde, RM. Cataracts Induced by Topical. *Arch Ophthalmol.*;96(3):474-476, 1978.
77. Orth, DS; Dumatol, C; and Zia, S. (1996). House organisms: dealing with the “bug in the plant.” *Cosmet. Toiletr.*, 111(6), 59–66, 68–70.
78. Orth, DS. Principles of preservative efficacy testing. *Cosmet. Toiletr.*, 96(3), 43, 44, 48–52(1981).
79. Russell, AD; Ahonkhai, I; and Rogers, DT. (1979). A review. Microbiological applications of the inactivation of antibiotics and other antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol.*, 46, 207–245.

80. Hugo, WB and Denyer, SP (1987). The concentration exponent of disinfectants and preservatives (biocides). In *Preservatives in the Food, Pharmaceutical and Environmental Industries*. Board, R.G., Allwood, M.C., and Banks, J.G., Eds. SAB Technical Series no. 22. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 281–291.
81. Hurwitz, S.J. and McCarthy, T.J. (1985). Dynamics of disinfection to selected preservatives against *Escherichia coli*. *J. Pharm. Sci.*, 74, 892–894.
82. Orth, DS and Milstein, SR (1989). Rational development of preservative systems for cosmetic products. *Cosmet. Toiletr.*, 104(10), 91, 92, 94–100, 102, 103.
83. Varvaresou, A; Papageorgiou, S; Tsihrivas, E; Protopapa, E; Kintziou, H; Kefala, V and Demetzos, C. (2009). Self-preserving cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 31, 163–175.
84. Kabara, JJ and Orth, DS (1997). Principles for product preservation. In *Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice*. Kabara, JJ and Orth, DS, Eds. Marcel Dekker, New York, pp. 1–14.
85. Denyer, SP and Stewartt, GSAB (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *Internat. Biodet. & Biodeg.*, 41, 261–168.
86. Russell, AD and Gould, GW. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 65, Issue Supplements17, pages 167S–195S, December 1988.
87. McDonnell, G. And Russell, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 147–179.
88. Al-Masaudi, SB; Day, MJ; Russell, AD. Effect of some antibiotics and biocides on plasmid transfer in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 71, Issue 3, pages 239–243, September 1991
89. Orth, DS (2000). Cosmetics, toiletries and antibiotic-resistant “superbugs.” *Cosmet. Toiletr.*, 115(3), 88.
90. Favet, J; Griffiths, W; Amacker, PA; Schorer, E. Adaptation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to Katon CG and Germall II in an O/W Cream. *Cosmetics & Toiletries*, 102 (9), 75-85, 1987.
91. Lundov, MD; Moseby, L; Zachariae, C; Johansen, JD. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and

- contact allergy. Contact Dermatitis 2009: 60: 70-78.
92. Pinto, TJ A; Kaneko, TM; Ohara, MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu, 2003.
93. Orus, P.; Leranoz, S. Current trends in cosmetic microbiology. *Internacional Microbiology, Spain*, 8: 77-79, 2005.
94. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) – Cosméticos – Informações Técnicas. Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br/>>. Acesso em: 01 jun. 2008.
95. Brannan, D. K. Cosmetic preservation, *Cosmet. Toilet.* 11,69, 1996.
96. Steinbergh, DC. Voluntary Registration of Cosmetics and 2007 Frequency of Preservative Use. *Cosmetics & Toiletries' magazine*, Vol. 123, No. 10/October 2008.
97. FDA (U.S. Food and Drug Administration) – Center for Food Safety e Applied Nutrition - CFSAN/Office of Cosmetics and Colors March 20, 2006. Informações disponíveis em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-para.html>>. Acesso em 13 ago. 2008.
98. O'Brien, T. J. Imidazolidinyl urea (Germall 115) causing Cosmetics Dermatitis. *Australasian Journal of Dermatology*. Volume 28 Issue 1, Pages 36 – 37, published Online: 28 Jun 2007.
99. Borin, MF. Controle de qualidade químico, físico e microbiológico de uma formulação de uso tópico contendo superóxido dismutase [tese]. Ribeirão Preto: USP;2003.
100. Bier, O. *Microbiologia e Imunologia*. 24ª ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985.
101. Kavanagh, HF. *Analytical Microbiology*. 707 S., New York and London 1963: Academic Press.
102. Rosa, MC; Medina, MR; Vivar, C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 70 (1995) 227-232.
103. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC., The United States Pharmacopeia 24 The National Formulary 19. Rockville: United States Pharmacopeial 1990.
104. Weyland, JW and Wagstaffe, PJ. Cosmetic preservatives reference materials. *Parfümerie und Kosmetik*. 1991, vol. 72, no11, pp. 750-765.

105. Russell, AD & Chopra, I. Understanding Antibacterial Action and Resistance. Ellis Horwood, Chkhester, United Kingdom (1990).
106. Harvey, PW; Everett, DJ. Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. Journal of Applied Toxicology. Volume 24, Issue 1, pages 1–4, January/February 2004.
107. Jensen, PA; Lambert, LA; Iademarco, MF; Ridzon, R. Guidelines for Preventing the Transmission of Mycobacterium tuberculosis. December 30, 2005 / 54(RR17);1-141 in Health-Care Settings, 2005.
108. Meyer, B; Cookson, B. Does resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? Journal of Hospital Infection, 76 (2010) 200-205.
109. Chapman, JS. Biocide resistance mechanisms. International Biodeterioration & Biodegradation, 51 (2003) 133-138.
110. Brannan, DK; Dille, JC; Kaufman, DJ. Correlation of In Vitro Challenge Testing with Consumer Use Testing for Cosmetic Products. Applied and Environmental Microbiology, United States. Vol. 53 n.8 p. 1827-1832. Aug. 1987.
111. Lee, HH; Molla MN; Cantor CR & Collins JJ. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. Nature, Vol 467, 2 September 2010 doi:10.1038/nature09354.
112. Warth, AD. (1977) Mechanism of resistance of Saccharomyces bailii to benzoic, sorbic and other weak acids used as preservatives. Journal of Applied Bacteriology 43, 21 5-230.
113. FDA (Federal Drug and Food Administration), 2007. Parabens. Date Prepared: 24-03-06, Revised: 31-10-07.
114. CTFA MICROBIOLOGY GUIDELINES. WASHINGTON: THE COSMETIC, TOILETRY AND FRAGRANCE ASSOCIATION, 1993.
115. Caon, T; Costa, ACO; Oliveira, MAL, Micke, GA, Simões, CMO. Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. International Journal of Pharmaceutics 391 (2010) 1–6.
116. Ishiwatari, S; Suzuki, T; Hitomi, TYT; Matsukuma, S; Tsuji, T. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. J Appl Toxicol, Japan, 27(1):1-9, Jan – Feb. 2007.

117. Turchin, I; Moreau, L; Warshaw, E; Sasseville, D. Cross-reactions among parabens, para-phenylenediamine, and benzocaine: a retrospective analysis of patch testing. *Dermatitis, Canada* 17(4):192-5; 2006.
118. Pedersen, S., Marra, F., Nicoli, S., Santi, P., 2007. In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.* 29, 361–367.
119. Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A., 2005. Safety assessment of esters of phydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* 43, 985–1015.
120. El Hussein, S., Muret, P., Berard, M., Makki, S., Humbert, P., 2007. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis-dermis layers (ex vivo study). *Exp. Dermatol.* 16, 830–836.
121. Maddox, D.N., 1982. The role of p-hydroxybenzoates in modern cosmetics. *Cosmet. Toilet.* 97, 85–88.
122. Conservantes. *Revista Cosméticos e Perfumes* (2007). Editora Insumos, nº44, inverno de 2007, p. 29-52. HTTP://www.insumos.com.br/cosméticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n_44.pdf (obtido em 07/06/2010 às 17:50)
123. Neves, E.R., Schäfer, S., Phillips, A., Canejo, J., Macedo, M.F., 2009. Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. *Int. Biodeteriorat. Biodegrad.* 63, 267–272.
124. Charnock, C., Finsrud, T., 2007. Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *J. Clin. Pharm. Ther.* 32, 567–572.
125. Viress P; Fassihi, R. Probing the dynamics of matrix Hidration in the presence of electrolytes. *Informa Healthcare.* 2001, Vol. 8, n.2, pp. 87-92.
126. Judis, J. Studies on the mechanism of action phenolic disinfectants 1: Realease of radioactivity from carbon¹⁴-labeled *Escherichia coli*. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* Volume 51, Issue 3, pages 261–265, March 1962
127. Beckett AH, Robinson AE. The inactivation of preservatives by non-ionic surface active agents. *Soaps, Perfums and Cosmetics*, 1958; 31: 454-459.
128. McDonnell, G. And Russell, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 147–179.

129. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001. Lista de Conservantes Permitidos para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/162_01rdc.htm>. Acesso em: 23 de jan. de 2004.