UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MARISE BASTOS STEVANATO

**Estudo da eficiência da lactoferrina como
conservante em formulações semi-sólidas para
produtos cosméticos e farmacêuticos**

Ribeirão Preto

2005

MARISE BASTOS STEVANATO

**Estudo da eficiência da lactoferrina como
conservante em formulações semi-sólidas para
produtos cosméticos e farmacêuticos**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos
Orientadora: Profa. Dra. Elza Helena Guimarães Lara

Ribeirão Preto
2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marise Bastos Stevanato

Estudo da eficiência da lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas para produtos cosméticos e farmacêuticos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Stevanato, Marise C. Bastos Stevanato.

Estudo da eficiência da lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas para produtos cosméticos e farmacêuticos / Marise C. Bastos Stevanato ; orientadora Elza Helena Guimarães Lara.

-- Ribeirão Preto, 2005.

139 f.: fig.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

1. Lactoferrina 2. Microbiologia 3. Conservantes 4. Cosméticos

Trabalho realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto e no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob apoio financeiro da UNAERP

DEDICATÓRIA

Ao meu marido André

Nada há mais importante do que o amor demonstrado por meio de atitudes

Obrigada pela paciência, apoio, incentivo, carinho, quietude

Amor das minhas vidas

Aos meus pequenos grandes homens Felipe e Leonardo

Obrigada por tolerarem minhas ausências temporárias

“Daqui pra frente tudo será diferente”

À minha orientadora Prof^a Dr^a Elza Helena Guimarães Lara
Obrigada pela paciência e tolerância nestes quase dez anos de convivência
Os encontros aqui podem ser passageiros, mas sem dúvida, lá, são perenes

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Dermeval de Carvalho
O verdadeiro Doutor não surge com a outorga de um título.
O verdadeiro Doutor é aquele que passa a vida
ensinando, acolhendo, corrigindo, impulsionando, apoiando.
A você , Professor,
o mentor da minha caminhada profissional,
dedico este título

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marilisa Guimarães Lara pela imprescindível colaboração no trabalho, sem a qual nada teria começado.

Ao Mário Sadaiti Ogasawara, pela colaboração na realização das análises físicas e físico-químicas.

Ao Prof. Cesar Mulati, nossa referência em fotografia, pelo trabalho fotográfico da capa

À Universidade de Ribeirão Preto, pelo total financiamento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. LACTOFERRINA	18
2.2. CONSERVANTES	23
2.3. TESTE DE EFICÁCIA CONSERVANTE	28
2.4. TESTES DE ESTABILIDADE	30
2.5. FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS DE USO TÓPICO	31
3. OBJETIVO	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. MATERIAL	36
4.1.1. Formulações semi-sólidas	36
4.1.2. Microrganismos utilizados	38
4.1.2.1. Bactérias	38
4.1.2.2. Fungos	38
4.2. MÉTODOS	39
4.2.1. Preparo das formulações	39
4.2.1.1. Creme não-iônico	39
4.2.1.2. Creme aniônico	39
4.2.1.3. Gel de hidroxietilcelulose	39
4.2.1.4. Gel-creme	40
4.2.2. Obtenção e conservação dos microrganismos	40
4.2.2.1. Bactérias e levedura	40
4.2.2.2. Fungo filamentoso	41
4.2.3. Padronização da suspensão de microrganismos	41
4.2.3.1. Bactérias	41
4.2.3.2. Fungo leveduriforme <i>Candida albicans</i>	42

4.2.3.3. Fungo filamentoso <i>Aspergillus niger</i>	42
4.2.4. Análise da eficácia de inativação da lactoferrina	43
4.2.5. Teste de eficácia conservante	43
4.2.6. Testes de estabilidade físico-química das formulações	44
4.2.6.1. Características macroscópicas	45
4.2.6.2. Estabilidade à centrifugação	45
4.2.6.3. Consistência	45
4.2.6.4. Densidade	46
4.2.6.5. pH	46
4.2.7. Testes de estabilidade física das formulações	46
4.2.8. Análise estatística das estabilidades físico-química e física	47
5. RESULTADOS	49
5.1. TESTE DE EFICÁCIA CONSERVANTE DAS FORMULAÇÕES	49
5.1.1. Creme não-iônico	49
5.1.2. Creme aniônico	56
5.1.3. Gel de hidroxietilcelulose	62
5.1.4. Gel-creme	68
5.2. TESTES DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES	74
5.2.1. Creme não-iônico	74
5.2.2. Creme aniônico	80
5.2.3. Gel de hidroxietilcelulose	86
5.2.4. Gel-creme	92
5.3. TESTES DE ESTABILIDADE FÍSICA DAS FORMULAÇÕES	98
5.3.1. Creme não-iônico	98
5.3.2. Creme aniônico	107
5.3.3. Gel de hidroxietilcelulose	115
5.3.4. Gel-creme	124
6. DISCUSSÃO	133
7. CONCLUSÃO	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

RESUMO

STEVANATO, M. C. B. **Estudo da eficiência da lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas para produtos cosméticos e farmacêuticos.** 2005. 139 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

A lactoferrina bovina, descoberta em 1939, é uma glicoproteína que se liga reversivelmente a dois íons férricos, sendo capaz de seqüestrá-los de certos patógenos ou do meio, promovendo redução do crescimento microbiano ou se ligar as suas paredes celulares resultando na permeabilização. A lactoferrina vem ganhando notoriedade nas pesquisas, pois investigações têm descrito sua atividade *in vitro* frente a diversos microrganismos. Em razão desta propriedade, a mesma poderia ter aplicação nas indústrias cosmética e alimentícia, como um conservante "natural". Embora alguns conservantes já estejam consagrados na literatura, os mesmos têm sido relacionados com o desencadeamento de reações alérgicas e de sensibilização, motivando a procura do conservante ideal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas tópicas para usos cosmético e farmacêutico, bem como verificar as estabilidades física e físico-química. Com esta finalidade, três diferentes concentrações de lactoferrina foram incorporadas nos cremes não-iônico e aniônico, gel e gel-creme. A atividade da lactoferrina foi avaliada através do teste de eficácia conservante, sendo que as formulações foram contaminadas com concentrações conhecidas dos microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, com posterior contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), em placas de Petri, nos tempos zero, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, bem como em 7, 14, 21 e 28 dias. Para estudo das estabilidades, as formulações foram avaliadas nos tempos zero, 15, 30, 60, 90, 150 e 180 dias, nas temperaturas de 4°, 25° e 40°C. A estabilidade físico-química foi avaliada através das características macroscópicas, estabilidade à centrifugação, pH, densidade e consistência. A estabilidade física, por meio da determinação da viscosidade e comportamento reológico. Os resultados obtidos, nas condições experimentais deste trabalho, permitiram inferir que a lactoferrina bovina não provocou alteração significativa nas estabilidades física e físico-química das formulações estudadas. Quanto à eficácia da lactoferrina, a mesma não pode ser classificada como substância dotada de atividade conservante, pois não atendeu às exigências preconizadas em compêndios oficiais, frente aos microrganismos estudados. Mesmo não tendo atendido às exigências oficiais como conservante, mostrou-se efetiva frente à levedura *Candida albicans*, nas formulações do creme não-iônico e gel de hidroxietilcelulose. No entanto, estudos posteriores poderão avaliar a associação da lactoferrina a outros conservantes, buscando sinergismo entre eles, conseqüentemente, podendo diminuir as reações adversas e sensibilizações no usuário.

ABSTRACT

STEVANATO, M. C. B. **Study of the efficiency of the lactoferrin as a preservative in semi-solid formulations for cosmetics and pharmaceutical products.** 2005. 139 s. Thesis (PhD) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

The bovine lactoferrin, discovered in 1939, is a glycoprotein that connects itself reversibly to two ions of iron being able to kidnap them from certain pathogens or from the environment promoting reduction of the microbial growth or, resulting in permeability if connected to its cellular walls. Lactoferrin has become important in researches because investigations have described its activity *in vitro* before many microorganisms. Due to this property, lactoferrin could be applied in cosmetic and food industries as a "natural" preservative. Even though some preservatives are already acclaimed in literature, lactoferrin has been related to the unleashing of allergic reactions and sensibility, motivating the search for the preservative. The goal of this paper was to evaluate lactoferrin as a preservative in semi-solid topic formulations for cosmetic and pharmaceutical uses as to verify the physical and physical-chemical stabilities. On this purpose, three different lactoferrin concentrations were incorporated in non-ionic and anionic creams, gel and gel-cream. Lactoferrin's performance was evaluated through testing the efficiency of the preservative, being that the formulations were contaminated by known concentrations of the microorganisms *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, with posterior counting of the number of Former Colony Units (FCT), in Petri plates, on times zero, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 hours, as well as 7, 14, 21, 15, 30, 60, 90, 150 and 180 days, in temperatures of 4°, 25° and 40°C. The physical-chemical stability was evaluated through the macroscopic characteristics, stability to centrifugation, pH, density and consistency. The physical stability through the determination of viscosity and reologic behavior. The results, in the experimental conditions of this paper, allowed inferring that the bovine lactoferrin didn't provoke significant alteration in the physical and physical-chemical stabilities in the studied formulations. As to the efficiency of lactoferrin, it can't be classified as a substance endowed with preservative activity because it didn't reach the extolled demands in official compendiums before the studied microorganisms. Although it didn't reach the official demands as a preservative, lactoferrin showed itself effective before the yeast *Candida albicans* on the formulations of the non-ionic cream and hidroxiethylcelulose gel. However, posterior studies will be able to evaluate the association of lactoferrin to other preservatives, seeking synergism between them, being able to consequently diminish the adverse reactions and sensibilities in the user.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a população mundial tem se preocupado com os possíveis danos à saúde causados por substâncias químicas utilizadas como conservantes em medicamentos, cosméticos e alimentos, com a finalidade de evitar contaminação por microrganismos.

No entanto, tanto as indústrias de medicamento e cosmética não conseguiram, ainda, abolir definitivamente a sua utilização, porque a presença de microrganismos, inadvertidamente introduzidos nestes produtos, pode causar alterações na formulação, como na viscosidade, cor e odor, e danos ao próprio consumidor. Sendo o conservante um dos principais causadores de reações adversas nos usuários, alguns países, notadamente os europeus, começam a levantar a bandeira da não utilização dos conservantes em produtos cosméticos. Atitude talvez um pouco drástica e utópica, segundo alguns pesquisadores, pois acreditam que a não utilização do conservante é inviável, principalmente, em função do comprometimento do produto causado pelo mau uso.

Portanto, com o objetivo de não causar danos aos usuários, pesquisas têm sido realizadas no intuito de se analisarem novas substâncias com ação conservante ampla sem, contudo, desenvolver reações alérgicas ou adversas.

Dentre as inúmeras substâncias possíveis de serem estudadas, optamos pela lactoferrina, proteína natural, que tem demonstrado atividade antimicrobiana e viral em diversos estudos *in vitro*, sem, no entanto, apresentar efeitos citotóxicos ou provocar reações adversas.

Como a lactoferrina ainda não apresenta informações na literatura sobre possível interação com os componentes da formulação, estudos das estabilidades física e físico-química também se fazem necessários para melhor avaliar os resultados obtidos.

Por se tratar de assunto extremamente novo, necessitando de maiores pesquisas, e de substância de origem fisiológica encontrada, também nos leites humano e bovino, podendo oferecer menores riscos e causar menos sensibilizações quando utilizada, a utilização da lactoferrina como conservante em formulações farmacêuticas e cosméticas

foi pesquisada, pois estudos *in vitro* vêm demonstrando que a mesma tem sido capaz de retardar ou mesmo inibir o crescimento de determinados microrganismos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LACTOFERRINA

A lactoferrina foi isolada do leite bovino pela primeira vez em 1939, e, posteriormente, em 1960, do leite humano (CHANTAYSAKORN; RICHTER, 2000; LEVAY; VILJOEN, 1995; LÖNNERDAL; IYER, 1995; VORLAND, 1999).

A lactoferrina, de coloração vermelha ou rosa clara, é uma glicoproteína de cadeia simples contendo 692 aminoácidos e peso molecular de 80 kDa; composta de aminoácidos semelhantes à proteína transportadora do ferro no plasma, a transferrina (55% da sequência de aminoácidos é semelhante), portanto, trata-se de uma siderofilina. Apresenta duas formas: a hololactoferrina (saturada de ferro) e a apolactoferrina (sem ferro); no entanto, difere da transferrina nas propriedades imunológicas ou antigênicas, composição de carboidratos, solubilidade à água, ponto isoelétrico e a localização da ligação com o ferro e sítios de glicosilação (BAKER et al., 1998; HENDRIXSON et al., 2003; LEVAY; VILJOEN, 1995; MORIISHI et al., 1999; SINGLETON; SAINSBURY, 1996; VORLAND, 1999).

Os sítios de ligação da lactoferrina estão localizados na interface entre os dois domínios de cada lobo, chamados de N e C, similares e conectados através de uma região flexível. No entanto, a lactoferrina não é capaz de se ligar somente aos íons ferro, pode, também, se ligar ao cobre, manganês, zinco, gálio e alumínio (SHARMA et al., 1999; VORLAND, 1999).

Segundo Ohashi et al. (2003), a ligação da hololactoferrina com o ferro é desfeita pela precipitação com ácido sulfato de amônio, em pH 2, transformando-a em apolactoferrina.

Figura 1. Diagrama mostrando a existência dos dois lobos da lactoferrina (vermelho e verde), extraído de Hendrixson et al. (2003)

Aproximadamente, 69% da sequência de aminoácidos da lactoferrina bovina é idêntica à humana, embora as conformações da cadeia polipeptídica sejam as mesmas. A estrutura tridimensional apresenta leve mudança na orientação dos domínios, com angulação menor do que a humana, e estas pequenas diferenças não parecem ter qualquer significado funcional (BAKER et al., 1998).

A lactoferrina é uma proteína encontrada, também, em secreções externas, lágrimas, saliva, secreção vaginal, sêmen, e nos grânulos secundários de neutrófilos, sintetizada pela mucosa epitelial e neutrófilos, sendo liberada destas células em resposta a um estímulo inflamatório (BELLAMY et al., 1992; MANN; ROMM; MIGLIORINI, 1994; PETSCHOW; TALBOTT; BATEMA, 1999; TANIDA et al., 2003; XU et al., 1999; YAMAUCHI et al., 1993; YE et al., 2000). O colostro contém 7,0g de

lactoferrina/L, no leite humano cai para, aproximadamente, 2,0mg/mL, enquanto que no leite bovino é de 0,02 a 0,2mg/mL; no plasma está em pequena concentração, em torno de 0,2µg/mL (van der STRATE et al., 2001).

Uma das primeiras funções atribuídas à lactoferrina foi o transporte de metais, especialmente o ferro; no entanto, esta função principal foi descartada, pois a transferrina é o mais eficiente transportador deste íon. Posteriormente, descobriu-se que a lactoferrina, estrategicamente situada nas mucosas, fazia parte da primeira linha de defesa do organismo contra infecções microbianas, fúngicas e virais (van der STRATE et al., 2001).

A lactoferrina pode se ligar reversivelmente a dois íons férricos, pois é capaz de seqüestrá-los de certos patógenos ou do meio, resultando na redução do crescimento microbiano (AZUMA et al., 1998; BROCK, 1995; IYER; LÖNNERDAL, 1993; NAIDU et al., 1993; OHASHI et al., 2003; SHARMA et al., 1998; SINGLETON; SAINSBURY, 1996), enquanto que, segundo Kanyshkova et al. (1999), as sub-frações que hidrolisam RNA e DNA podem contribuir para a hidrólise dos ácidos nucléicos bacterianos e virais.

Segundo Kanyshkova et al. (2003), as sub-frações de lactoferrina humana purificada possuem cinco diferentes atividades enzimáticas: DNase, RNase, ATPase, fosfatase e hidrólise da malto-oligossacáride, inclusive, algumas de suas sub-frações cataliticamente ativas são citotóxicas, podendo induzir apoptose.

Outra ação inibitória da lactoferrina está limitada à região N-terminal que, com forte carga positiva, se liga aos lipopolissacarídeos da parede celular de microrganismos susceptíveis, carregados negativamente, resultando na sua permeabilização (HENDRIXSON et al., 2003; MARTÍNEZ-GOMIS et al., 1999; XU et al., 1999).

Nas bactérias Gram negativas, os lipídios A dos lipossacarídeos (LPS) são liberados da parede aumentando, conseqüentemente, a permeabilidade da membrana; nas bactérias Gram positivas, a estrutura de ligação inicial ainda não é bem conhecida, mas presume-se que os ácidos lipoteicóico (LTA) e/ou teicóico (TA) estejam envolvidos neste mecanismo (LEITCH; WILLCOX, 1999; OLIVEIRA et al., 2001; VORLAND et al., 1999a).

Vários trabalhos vêm sendo publicados em relação à atividade da lactoferrina *in vitro*, frente a diferentes microrganismos. Arnold, Brewer e Gauthier (1980), em estudos *in vitro*, observaram que várias espécies de estreptococos orais, *S. pneumoniae*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* mostraram-se sensíveis à lactoferrina, enquanto que Ellison e Giehl (1991) estudaram o comportamento de *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* quando incubadas com 2,0mg/mL de lactoferrina, confirmando a ação letal para estas bactérias Gram negativas.

Uma avaliação quantitativa de sua atividade foi determinada por Kimura et al. (2000), que demonstraram a efetividade contra *Escherichia coli* O111 em concentrações de 2,0 e 3,0mg/mL de lactoferrina, enquanto que Lillo, Cernuda e Brock (1998), estudando *Micrococcus* spp, observaram diminuição nas leituras da absorvância das culturas, indicativo de que a morte bacteriana foi acompanhada por lise.

A atividade contra leveduras foi estudada por Nikawa et al. (1993), Nikawa et al. (1994) e Xu et al. (1999), que demonstraram a ação da lactoferrina em diversas espécies de *Candida*, como sendo dose-dependente, embora não tempo-dependente, em pH 7. Kuipers et al. (1999) também observaram que as lactoferrinas, tanto humana quanto bovina, foram capazes de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

De acordo com van der Strate (2001), a lactoferrina apresenta atividade antiviral para citomegalovírus, vírus da hepatite C e poliovírus e, inclusive, sugeriu a sua associação com outras drogas, buscando usufruir do sinergismo entre elas, diminuindo possíveis reações adversas provocadas pelos antivirais.

Segundo Yamauchi et al. (2000b), não foram observados efeitos adversos, quando 2,0g de lactoferrina/kg/dia foram administrados oralmente em ratos. Posteriormente, Yamauchi et al. (2000a) conduziram estudo clínico para avaliar a eficácia da lactoferrina no tratamento de *tinea pedis*. Para tanto, doses orais de 600 a 2000mg de lactoferrina foram administradas durante 8 semanas a indivíduos adultos,

com leve ou moderada *tinea pedis*, observando eficácia antifúngica e melhora dermatológica.

McCann et al. (2003) verificaram que a lactoferrina não apresentou citotoxicidade em culturas de células nas concentrações de 0,1 a 2,5mg/mL, quando incubadas por 24 horas a 37°C e Tenovuo (2002) ressaltou que, em estudos de curto e longo prazo, não foram observados efeitos adversos quando enxagüatórios bucais contendo lactoferrina de origem bovina foram usados diariamente, podendo tal fato ser resultante da similaridade estrutural e imunológica entre as lactoferrinas humana e bovina.

Dentre outras funções atribuídas à lactoferrina, incluem-se atividade imunorregulatória, regulação da mielopoiese, promoção do crescimento e diferenciação celular, efeitos antioxidantes e regulação da homeostase do ferro no trato gastrointestinal (WARD; CUNNINGHAM; CONNEELY, 1997; YAMAUCHI, et al., 2000b).

Apesar de todos os estudos realizados mostrando a atividade da lactoferrina, a sua utilização não se torna viável economicamente sem um processo industrial capaz de obtê-la em escala comercial; atualmente, já é possível produzi-la, bem como seu resíduo lactoferricina, através da fermentação em *Aspergillus niger* e, futuramente, acredita-se que será possível utilizar a lactoferrina humana recombinante (TENOVUO, 2002); sendo que, segundo estudos de Suzuki et al. (2003), a lactoferrina recombinante apresenta atividade biológica semelhante à natural.

A lactoferricina tem sido obtida das lactoferrinas bovina e humana, através da hidrólise ácida com pepsina, originando fragmento de resíduo peptídico contendo 25 aminoácidos, oriundo do domínio N-terminal da lactoferrina (AGUILERA et al, 1999; HAUKLAND et al., 2001; SCHIBLI; HWANG; VOGEL, 1999; TOMITA et al., 1991).

Embora seu modo de ação ainda necessite de maiores pesquisas, alguns pesquisadores acreditam que o efeito bactericida deste peptídeo, carregado positivamente, e com alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos, deve estar ligado à

capacidade de interação com a membrana citoplasmática em bactérias susceptíveis, formando poros na mesma ou desestabilizando sua bicamada, provocando a lise bacteriana (CHAPPLE et al., 2004; FARNAUD et al., 2004; SAMUELSEN et al., 2005; ULVATNE et al., 2001). No entanto, Ulvatne et al. (2001) afirmaram que a lactoferricina não aumenta a permeabilidade da membrana em bactérias intactas, mas provoca a despolarização da mesma, formando vesículas na superfície do microrganismo.

Estudos de Viejo-Díaz et al. (2005) demonstraram que a lactoferricina humana foi efetiva contra espécies clínicas de *C. albicans*, resistentes a fluconazol e anfotericina.

Segundo Stallmann et al. (2005), os aminoácidos da região N-terminal da lactoferrina humana, nas concentrações de 12µg/mL e 400µg/mL, respectivamente, foram letais a 90% dos microrganismos estudados e não foram capazes de provocar alterações na morfologia e viabilidade dos glóbulos vermelhos, não sendo observada toxicidade.

2.2. CONSERVANTES

Segundo a Resolução nº 79, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os conservantes "são substâncias adicionadas aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes com a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações causados por microorganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto."

Embora as formulações cosméticas não necessitem de esterilidade, devem cumprir com as exigências da legislação quanto à ausência de microrganismos específicos, bem como obedecer ao número máximo permitido de Unidades Formadoras de Colônia, determinado pela Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999, da ANVISA.

Para o cumprimento da legislação e garantir a qualidade microbiológica dos produtos, é necessário, além da formulação e conservante adequados, também garantir a qualidade das matérias-primas, da produção e do armazenamento (EIGENER, 2005).

Assim, os conservantes são adicionados às formulações cosméticas com dupla finalidade: a primeira é proteger o usuário de qualquer dano à saúde, em virtude da contaminação do produto e, a segunda, é proteger o produto.

Farrington et al. (1994) realizou interessante pesquisa, a fim de se avaliar o impacto da contaminação introduzida pelo usuário, na eficiência do conservante, em virtude do mau uso. Os autores observaram que as concentrações dos conservantes permaneceram semelhantes em ambas formulações, controle e de uso, mas, no entanto, o conservante não foi capaz de inibir o crescimento microbiano na formulação utilizada.

Stevanato et al. (1999), ao avaliar a qualidade microbiológica de produtos cosméticos adquiridos em farmácias com manipulação de Ribeirão Preto/SP concluíram que 12% dos cremes não cumpriam a legislação e que bactérias do grupo coliforme foram evidenciadas em 2,56% das amostras.

A contaminação microbiana pode causar, entre outras alterações, mudança de coloração, pois alguns microrganismos produzem pigmentos ou ácidos que alteram o pH e afetam os próprios pigmentos adicionados à formulação; formação de odores, em virtude da produção de compostos sulfurados responsáveis pelo mau cheiro e liberação de gases, em função do metabolismo microbiano (MARKOWETZ, 2002).

Em estágios mais avançados da contaminação, aparecem alterações nas características reológicas, mudando a viscosidade devido à produção de enzimas microbianas, que degradam espessantes; desestabilização da emulsão, em função de alterações dos emulsificantes; formação de biofilme e danos às embalagens flexíveis, levando a explosões nas seladas (FRAGA, 1999).

Segundo Fávero (2002), agentes antimicrobianos incluem os antibióticos e germicidas químicos, sendo estes últimos classificados em outras duas categorias: a primeira, dos desinfetantes e, a segunda, dos anti-sépticos e conservantes.

Segundo Markowetz (2002), aproximadamente, 50 conservantes, com grandes diferenças na estrutura química, estão aprovados para uso em cosméticos, mas apenas poucos apresentam ampla atividade antimicrobiana. Estes fatos estimulam o uso de associação de conservantes, para que as deficiências de um possam ser corrigidas pelo outro, além das incompatibilidades que possam ocorrer, como diminuição da atividade em determinados pHs, solubilidade e incompatibilidades com ingredientes da formulação.

O conservante ideal tem sido conceituado como substância que apresenta amplo espectro de atividade; efetividade e estabilidade no pH dos produtos cosméticos; compatibilidade com os componentes da formulação e embalagem; nenhuma alteração da cor, odor, textura e sabor; coeficiente de partição óleo/água efetivo na fase aquosa; evita adaptação de microrganismos; seguro, sem causar irritação ou sensibilização; de baixo custo, e regulamentado por órgãos competentes (ORTH, 1993; SASSEVILLE; 2004).

Atualmente, o sistema conservante de uma formulação refere-se à constituição química e físico-química da mesma. O conservante não deve agir independentemente das outras matérias-primas, é necessário, também, considerar a atividade da água (quantidade de água disponível na formulação), pH, nutrientes, tipo e concentração de tensoativo, agentes sequestrantes, componentes não-aquosos, ingredientes insolúveis, corantes, componentes ativos e antioxidantes que podem afetar a ação do conservante (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Especialmente nos produtos cosméticos, cuja formulação contém várias substâncias necessárias a sua finalidade, diversos processos alérgicos e/ou reações adversas podem ser observados, decorrentes das matérias-primas utilizadas; no caso presente, o conservante, como um dos mais comuns causadores de tais reações (MENNÉ,

2003; TORO; ENGASSER; MAIBACH, 1996). Estas substâncias devem ser adicionadas tão pouco quanto possível e, tanto quanto necessárias (HOJEROVÁ et al., 2001).

Taxas de sensibilização das alergias de contato são dependentes da capacidade inerente de sensibilização da substância, da dose e tipo de exposição, da quantidade por unidade de área da pele, do veículo e das condições da pele. Segundo Wilkinson et al. (2002), taxas de dermatites de contato alérgicas na ordem de 1% ou menos, obtidas em testes clínicos realizados em pacientes, são consideradas aceitáveis; 2% são preocupantes e, superiores a 3%, indicam sérios problemas.

Os parabenos são alquil ésteres do ácido parahidroxibenzóico, tendo sido introduzidos nos anos 30 para uso em cosméticos, alimentos e também em medicamentos de aplicação tópica e sistêmica, na concentração de 0,1 a 0,8%. Em razão de suas diferentes solubilidades, os parabenos são comumente associados, especialmente o etil e metil, sendo mais efetivos contra fungos do que bactérias, com atividade antibacteriana maior contra Gram positivos. No caso de *Pseudomonas aeruginosa*, os parabenos são usados sinergicamente com outros conservantes, como liberadores de formaldeído, isotiazolinonas ou fenoxietanol (FRANSWAY, 1991; SONI et al., 2002).

As taxas de sensibilização dos parabenos foram registradas a partir de diferentes centros da Europa e Estados Unidos, variando de 0 a 3,5%, tendo permanecido constante ao longo dos anos (MARKS et al. 2000; MARKS et al., 2003). Segundo Flyvholm (2005), estas taxas estão entre 0,5 a 1%.

O uso do formaldeído ou metanal como conservante em cosméticos tem diminuído em virtude de ser considerado de moderado a forte alergênico, pois é irritante, sensibilizante e apresenta potencial carcinogênico. Em indivíduos sensíveis, a concentração não deve ultrapassar 0,003% de formaldeído livre (SASSEVILLE, 2004). Nos Estados Unidos, o *Cosmetic Ingredient Review Expert Panel do Cosmetic, Fragrance and Toiletry Association* recomenda concentrações de 0,2% de formaldeído livre em produtos cosméticos (COSMETIC..., 1983). Enquanto que o Conselho da Comunidade Européia tem sugerido que, concentrações maiores de 0,05% de formaldeído livre, sejam

rotuladas como sensibilizantes (EUROPEAN..., 1982). Assuntos relacionados à concentração e dizeres de rótulo têm sido objeto de discussão técnica e científica (FLYVHOLM; MENNÉ, 1992).

Os doadores de formaldeído, como o quaternário de amônio, são altamente solúveis em água, estáveis e ativos frente a uma ampla faixa de pH, sendo efetivos contra leveduras, fungos filamentosos e bactérias, especialmente, *Pseudomonas aeruginosa*. A concentração utilizada varia de 0,2 a 0,3%, e apresenta-se com maior potencial de liberação de formaldeído. O imidazolidinil uréia é um doador de formaldeído muito utilizado nas concentrações de 0,03 a 0,2%, sendo mais efetivo contra bactérias. O 2-bromo-2nitropropanodiol é utilizado nas concentrações de 0,01 a 1%, apresentando notável potencial irritante em concentrações superiores ao máximo estipulado. Tanto o quaternário de amônio quanto imidazolidinil uréia apresentaram 1% de sensibilizações (HERBERT; RIETSCHER, 2004; SASSEVILLE, 2004).

O sistema conservante metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona, introduzido, na Europa, em 1970 e nos Estados Unidos, por volta de 1980, tem sido efetivo, em baixas concentrações, contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias Gram positivas e negativas. Dados europeus demonstram taxas de sensibilização estabilizadas entre 2 e 3% (BASKETTER et al., 1999; FLYVHOLM, 2005).

Metildibromoglutaronitrila/fenoxietanol foi introduzido na Europa em 1985 e, em 1990, nos Estados Unidos, sendo sua concentração restrita entre 0,0075 e 0,06%. Segundo Pedersen et al. (2004), estes conservantes apresentaram, na Europa, significativo aumento na frequência de sensibilizações e Sasseville (2004), acrescentou que 5,5% foi a taxa de sensibilização, entre 2000 e 2002, ocupando o décimo primeiro lugar em casos de alergia. Zachariae et al. (2005), baseados em estudo clínico e dados da literatura, sugeriram que o uso do metildibromoglutaronitrila não é apropriado para cosméticos.

Segundo Croshaw (1977 apud HOJEROVÁ et al., 2001, p.9), nenhum conservante químico típico pode ser considerado como totalmente não alergênico ou totalmente não sensibilizante.

As reações ou sensibilizações provocadas pelos conservantes têm estimulado diversos pesquisadores na busca por substâncias de origem natural para substituição dos conservantes químicos, como Manou et al. (1998), que estudaram as propriedades conservantes de *Thymus vulgaris* e Seo et al. (2002), as da quitina e quitosana como sistema conservante.

2.3. TESTE DE EFICÁCIA CONSERVANTE

Para o desenvolvimento de um produto, seja farmacêutico ou cosmético, é necessário estipular o conservante. No entanto, para se definir qual conservante será ideal à determinada formulação, é necessário que se faça o teste de eficácia, a fim de se determinar substância química e a concentração mínima efetiva para garantir que o produto se mantenha sem contaminação, conforme a legislação específica, durante sua fabricação, na embalagem e distribuição, além de resistir a possíveis contaminações introduzidas pelo usuário em função do mau uso (INTROINI, 1985; CURRY, 1987; CTFA, 1990; ORTH, 1993, PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; RUSSELL, 2003).

O Teste de Eficácia Conservante, Teste Desafio ou *Challenge Test* consiste em realizar contaminação proposital da formulação com os microrganismos testes e posterior contagem em placa de Petri das Unidades Formadoras de Colônia, em diferentes tempos. Segundo Orth (1993), o uso de culturas puras, apesar do tempo dispendido, em detrimento das mistas, é mais apropriado, pois permite conhecer as taxas de morte de cada microrganismo e determinar o perfil de resistência para determinada formulação.

Os microrganismos apropriados dependem do tipo de produto, pois seus comportamentos podem não ser semelhantes. Em função destas diferenças, vários microrganismos testes devem ser incluídos na análise, tais como bactérias Gram negativas com diversas capacidades metabólicas, como *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias do grupo coliforme, como *Escherichia coli*, entre outras; cocos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, Gram positivos esporulados, como *Bacillus cereus* ou *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* como levedura e fungos filamentosos como *Aspergillus niger* ou *A. flavus* (ORTH, 1993).

Além do Teste de Eficácia Conservante tradicional, existem também métodos rápidos como o de regressão linear e análise acelerada para definição do conservante na formulação. A escolha do método a ser utilizado depende de vários fatores, no entanto, o tempo disponível para análise é decisivo. O método de regressão linear fornece a taxa de inativação dos microrganismos, que é obtida pelo tempo de redução decimal (valor D), sendo o tempo necessário para matar 90%, ou seja, 1 log dos microrganismos (ORTH; STEINBERG, 2003). A curva de sobreviventes é obtida quando se plota o log do número de microrganismos viáveis pelo tempo. A utilização deste método possibilita redução no tempo de análise de 28 dias no teste de eficácia conservante para 24 horas (CHACRA, 1999).

Para a determinação da efetividade do conservante, diversos compêndios oficiais estabelecem os critérios de eficiência de um conservante na formulação. Segundo o método preconizado pela USP XXIII (UNITED..., 1990):

- ◆ A concentração de bactérias viáveis deve ser reduzida para não mais que 0,1% da concentração inicial no décimo quarto dia.
- ◆ A concentração de fungos filamentosos e leveduriformes deverá permanecer abaixo da concentração inicial durante os primeiros quatorze dias.
- ◆ A concentração de cada microrganismo teste deverá permanecer abaixo destes níveis durante o período de 28 dias.

Segundo os critérios do *The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association* (CTFA) (CURRY, 1993), o conservante será aprovado quando:

- ◆ A redução do número de bactérias for maior que 99,9% dentro de sete dias, com contínua redução na duração do teste.
- ◆ A redução do número de fungos filamentosos e leveduriformes for maior que 90% dentro de sete dias, com contínua redução na duração do teste.
- ◆ A atividade bacteriostática deverá permanecer durante todo o tempo de teste.

Segundo o método da regressão linear, preconizado por Orth (1993):

- ◆ Valor D menor que 4 horas para microrganismos considerados patogênicos.
- ◆ Valor D menor que 28 horas para bactérias não patogênicas, leveduras e fungos filamentosos.
- ◆ Produtos bacteriostáticos ou bactericidas para esporos de *Bacillus*.

2.4. TESTES DE ESTABILIDADE

O estudo da estabilidade de produtos cosméticos possibilita verificar o grau de estabilidade relativa do produto em diversas condições, desde produção até validade.

Segundo a ANVISA, conforme preconizado no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (GUIA..., 2004), "a avaliação da estabilidade contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado; fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações; estimar prazo de validade e fornecer informações para sua confirmação e auxiliar no monitoramento da estabilidade

organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos."

As alterações provocadas na estabilidade podem ser classificadas como intrínsecas e extrínsecas, segundo suas origens. As intrínsecas são incompatibilidade física (precipitação, separação de fases, entre outras), incompatibilidade química (pH, reações de óxido-redução, reações de hidrólise, interação com ingredientes da formulação, interação entre ingredientes da formulação e o material de acondicionamento). As extrínsecas estão relacionadas ao tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração.

Os testes de estabilidade devem ser realizados em amostras armazenadas em temperaturas específicas mais comuns como a ambiente, elevadas e baixas.

A análise das características da formulação inclui avaliação organoléptica (aspecto, cor, odor, sabor e sensação ao tato); avaliação físico-química (pH, materiais voláteis, teor de água, viscosidade, tamanho de partícula, centrifugação, densidade, granulometria, condutividade elétrica, umidade e teor de ativo) e avaliação microbiológica, que permite verificar o sistema conservante e suas interações com a formulação.

Na avaliação da estabilidade físico-química, a análise das características reológicas tem se tornado comum, uma vez que, além de fornecer informações importantes sobre a estabilidade das formulações, são também de fácil execução (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

2.5. FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS DE USO TÓPICO

As emulsões são sistemas dispersos constituídos por uma fase aquosa e outra oleosa, formando sistemas óleo/água (o/a) ou água/óleo (a/o), sendo utilizadas como

veículos para a incorporação de diversos ativos, sejam farmacêuticos ou cosméticos (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

A emulsificação possibilita misturar substâncias lipo e hidrossolúveis, fornecendo um sistema estável e homogêneo, destinado ao uso interno ou externo. A escolha do tipo de emulsão para aplicação na pele depende dos ativos incorporados, da necessidade de emolientes e integridade cutânea.

Para o processo de emulsificação, é necessária a utilização de agente emulsificante, que tem por finalidade reduzir a tensão interfacial, evitando a união das gotículas em dispersão, processo este chamado de coalescência. A fase aquosa da emulsão é a água, onde podem ser dissolvidos ativos farmacêuticos ou cosméticos, conservantes, entre outros. A fase oleosa pode ser constituída por óleos, essências, resinas, ceras, gorduras e substâncias lipossolúveis (ANSEL et al., 2000; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1991).

Os géis são constituídos por substâncias de alto peso molecular, os polímeros, que são formados por unidades monoméricas repetitivas e, quando em soluções concentradas, apresentam grande viscosidade devido à interação das cadeias do polímero com o solvente; o gel é um sistema solvente-polímero que contém uma rede tridimensional de ligações estáveis, as quais irão determinar se o gel é do tipo I ou II.

Os géis do tipo I são sistemas com rede tridimensional formada por ligações covalentes entre as macromoléculas; os géis do tipo II, reversíveis pelo calor, são formados por ligações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

O gel-creme apresenta características de gel e de creme, pois, quando associados, permitem obter um produto com viscosidade adequada com menor teor graxo.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

- 3.1. Verificar a utilização da lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas tópicas para usos cosmético e farmacêutico, em cremes, gel e gel-creme.

- 3.2. Verificar a interferência da lactoferrina, utilizada como conservante, nas estabilidades física e físico-química das formulações semi-sólidas tópicas para usos cosmético e farmacêutico, em cremes, gel e gel-creme.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Formulações semi-sólidas

As formulações avaliadas, apresentadas a seguir, foram cremes não-iônico e aniônico, gel e gel-creme contendo três diferentes concentrações de lactoferrina bovina (Agri-Cell Company, LLC - Estados Unidos), a saber: 1,0; 2,0 ou 3,0 mg/g de formulação (Sallmann et al., 1999). As mesmas formulações foram analisadas sem a incorporação da lactoferrina, servindo como controles, sendo assim denominadas ao longo do trabalho.

◆ Creme não-iônico

Álcool cetosteárilico (CAS 8005-44-5)	1,0% (p/p)
Monoestearato de glicerila (CAS 123-94-4)	10,0% (p/p)
Álcool cetosteárilico etoxilado (CAS 68439-49-6)	3,0% (p/p)
Miristato de isopropila (CAS 110-27-0)	2,5% (v/p)
Glicerina (CAS 56-81-5)	2,5% (v/p)
Água destilada q.s.p.	100,0% (p/p)

◆ Creme aniônico

Álcoois graxos e cetil-estearil sulfato de sódio*	16,0% (p/p)
Oleato de oleíla (CAS 3687-45-4)	16,0% (v/p)
Sorbitol 70% (CAS 50-70-4)	10,0% (v/p)
Água destilada q.s.p.	100,0% (p/p)

*: Chembase (Valdequímica)

◆ Gel de hidroxietilcelulose

Hidroxietilcelulose 4400*	2,0% (p/p)
Glicerina (CAS 56-81-5)	30,0% (p/p)
Água destilada q.s.p.	100,0% (p/p)

*: Natrosol® (Vital)

◆ Gel-creme

Álcool laurílico etoxilado associado a poliacrilamida*	5,0% (p/p)
Água destilada q.s.p.	100,0% (p/p)

* Sepigel 305® (Chemunion Química)

4.1.2. Microrganismos utilizados

Os microrganismos testes utilizados nas análises foram os preconizados por Curry (1993) e GUIA... (1998).

4.1.2.1. Bactérias

- ◆ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), fornecida por Supriveter Ind. e Com.
- ◆ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), fornecida por Supriveter Ind. e Com.
- ◆ *Escherichia coli* (ATCC 8739), fornecida pela Fundação André Tosello.

4.1.2.2. Fungos

- ◆ *Candida albicans* (ATCC 10231), fornecida por Supriveter Ind. e Com.
- ◆ *Aspergillus niger* (ATCC 16404), fornecido por Supriveter Ind. e Com.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo das formulações

4.2.1.1. Creme não-iônico

As matérias-primas da fase oleosa, álcool cetoestearílico, monoestearato de glicerila, álcool cetoestearílico etoxilado e miristato de isopropila, foram adicionadas em um béquer, e submetidas a aquecimento a 70°C. Em outro béquer, as matérias-primas da fase aquosa, glicerina e 95% do total da água destilada, foram aquecidas, também, a mesma temperatura. A seguir, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa, iniciando-se agitação mecânica constante até resfriamento a 30°C. Em seguida ao resfriamento, a lactoferrina foi dissolvida em 5% do total de água destilada da formulação, sendo incorporada à base com agitação.

4.2.1.2. Creme aniônico

A fase oleosa, composta pelos álcoois graxos e cetil-estearil sulfato de sódio e oleato de oleíla, foi aquecida em béquer a 70°C. À semelhança da fase oleosa, a fase aquosa, sorbitol e água, também foi aquecida. Posteriormente ao aquecimento, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa, mantida agitação mecânica constante até resfriamento a 30°C. Após o resfriamento, a lactoferrina foi dissolvida em 5% do total da água destilada da formulação, sendo incorporada à base com agitação.

4.2.1.3. Gel de hidroxietilcelulose

As matérias-primas foram aquecidas, em béquer até geleificação, submetidas à agitação manual utilizando-se bastão de vidro. A lactoferrina, dissolvida em 5% do total da água destilada da formulação, foi incorporada à base, após seu resfriamento a 30°C, com agitação.

4.2.1.4. Gel-creme

As matérias-primas foram adicionadas em béquer, submetidas à agitação mecânica, por 10 minutos. A lactoferrina foi dissolvida em 5% do total de água destilada da formulação, sendo incorporada à base com agitação, durante 5 minutos.

4.2.2. Obtenção e conservação dos microrganismos

4.2.2.1. Bactérias e levedura

Para evitar repiques sucessivos, facilitando a alteração fenotípica das bactérias e levedura, fato capaz de produzir resultados não confiáveis, os 5 tipos de microrganismos foram retirados dos tubos contendo as cepas-padrão, com auxílio de alça bacteriológica, e transferidos a 5 tubos de ensaio para cada cepa. As bactérias foram semeadas em tubo contendo ágar tripticaseína soja (DIFCO) esterilizado e inclinado, e incubadas em estufa bacteriológica (FANEM, modelo 002 CB), a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

A levedura foi semeada em tubo contendo ágar Sabouraud (DIFCO) esterilizado e inclinado, incubada em estufa bacteriológica (FANEM, modelo 002 CB), a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 48 horas.

Após os períodos de incubação, os tubos contendo os microrganismos foram armazenados em geladeira, a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Para a realização do teste de eficácia conservante, o repique foi efetuado a partir de um tubo armazenado de cada microrganismo (BURLIN, 2000).

4.2.2.2. Fungo filamentoso

A partir do tubo contendo a cepa-padrão, foi retirada amostra, com auxílio de alça em L, sendo repicada em 5 tubos contendo ágar batata (DIFCO) esterilizado e inclinado, e incubados a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 5 dias. Após este período, foram armazenados em geladeira, a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, sendo novamente repicado para a execução do teste de eficácia conservante (BURLIN, 2000).

4.2.3. Padronização da suspensão de microrganismos

4.2.3.1. Bactérias

No dia anterior à execução do teste de eficácia conservante, um tubo de cada uma das bactérias armazenadas em geladeira foi retirado, a fim de se processar nova semeadura em outros tubos padronizados, possuindo todos as mesmas dimensões e contendo 10mL de ágar tripticaseína soja. A semeadura foi cuidadosamente realizada por meio de estrias na superfície do meio, possibilitando um crescimento vigoroso, não permitindo que houvesse superfície sem crescimento do microrganismo. Após a semeadura, foram incubados em estufa a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

Após o período de incubação, as suspensões-estoque foram obtidas removendo-se todo crescimento bacteriano dos tubos com auxílio de palito de madeira esterilizado, utilizando-se 10mL de solução salina esterilizada.

A partir das suspensões-estoque, alíquotas de 35 μL foram diluídas em 9,0mL de solução salina esterilizada, resultando diluição com carga bacteriana necessária à inoculação na formulação. A carga bacteriana desta diluição foi confirmada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) pelo método de semeadura em profundidade, utilizando-se ágar tripticaseína soja.

4.2.3.2. Fungo leveduriforme *Candida albicans*

A partir do tubo armazenado em geladeira, o repique da levedura foi realizado em outro tubo contendo ágar Sabouraud esterilizado e inclinado, 48 horas antes da realização do teste de eficácia conservante.

Após o período de incubação, uma alçada do crescimento leveduriforme foi dissolvida em 10mL de solução salina esterilizada, originando a diluição que foi inoculada nas formulações, sendo a quantificação das UFCs realizada através da técnica de semeadura em profundidade, utilizando ágar Sabouraud.

4.2.3.3. Fungo filamentoso *Aspergillus niger*

O fungo filamentoso foi repicado, a partir dos tubos armazenados na geladeira, 7 dias antes da realização do teste de eficácia conservante, sendo semeado em tubo contendo 10mL de ágar batata-dextrose esterilizado, inclinado e incubado a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Transcorrido o período de incubação, todo o crescimento fúngico foi extraído com auxílio de palito de madeira esterilizado, utilizando-se 10mL de solução salina esterilizada, transferido para outro tubo esterilizado, o qual foi mantido em repouso por 30 minutos.

A quantificação do número de esporos foi determinada através da técnica de semeadura em profundidade, utilizando-se ágar Sabouraud.

4.2.4. Análise da eficácia de inativação da lactoferrina

As formulações contendo 3,0mg/g de lactoferrina foram inoculadas com suspensão contendo mistura de, aproximadamente, 10^3 UFC/mL de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Em seguida à inoculação, as formulações foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-5} em solução salina esterilizada.

Alíquotas de 1,0mL das diluições foram semeadas em ágar tripticaseína soja, em duplicata, utilizando-se a técnica de semeadura em profundidade e incubadas a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por 48 horas. Os tubos controle contendo a mesma suspensão de microrganismos foram submetidos ao mesmo procedimento, em paralelo.

4.2.5. Teste de eficácia conservante

No mesmo dia, a cada semana, 25 embalagens contendo a formulação sem e com as diferentes concentrações da lactoferrina, foram inoculadas com os microrganismos, evitando-se, desta forma, possíveis diferenças nos resultados, provocadas por condições do experimento e não pela concentração da substância em estudo.

As inoculações dos microrganismos obedeceram a uma ordem rígida de início, obedecida à seqüência: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e, por último, *A. niger*, sendo as mesmas seguidas nos tempos posteriores ao tempo zero, evitando-se que as semeaduras subseqüentes fossem realizadas em tempo maior do que os estipulados para as análises. As suspensões de microrganismos foram preparadas conforme descrito no item 4.2.3.

As análises foram realizadas nos tempos zero (imediatamente após a inoculação), 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias (BURLIN, 2000; CURRY, 1993; GUIA..., 1998).

A inoculação das formulações foi realizada com as suspensões dos microrganismos em separado, transferindo-se 0,2mL do inóculo para cada 20g da formulação. O inóculo propiciou uma contagem de 10^7 e 10^6 UFC/g de bactérias e fungos, respectivamente (CURRY, 1993; GUIA..., 1998).

Uma vez realizada a inoculação, 1g de cada formulação foi diluído em tubo contendo 9,0mL de solução salina esterilizada. Aliquotas de 0,1mL foram retiradas das diluições, e semeadas em placas contendo ágar tripticaseína soja e ágar Sabouraud, para bactérias e fungos, respectivamente, sendo espalhadas com auxílio de alça em L esterilizada e descartável. As diluições semeadas, em tese, forneceriam até 300 UFC/placa de Petri.

As placas contendo as bactérias foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por 24 horas; os fungos, foram incubados a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, de 3 a 4 dias e 48 horas, para o filamentoso e leveduriforme, respectivamente.

4.2.6. Testes de estabilidade físico-química das formulações

Os testes de estabilidade foram realizados utilizando-se temperaturas ambiente (aproximadamente 25°C), estufa ($40 \pm 0,5^\circ\text{C}$) com umidade relativa de $75\% \pm 5\%$ e geladeira ($4 \pm 0,5^\circ\text{C}$), segundo Lei dos Genéricos nº 9787, regulamentada pela Resolução 391, de 09 de agosto de 1999, do Diário Oficial da União, nos tempos zero, considerado 24 horas após a manipulação das formulações, 15, 30, 60, 90, 150 e 180 dias, em todas as análises.

As formulações foram analisadas observando-se as características macroscópicas, estabilidade à centrifugação, pH, densidade, consistência e características reológicas (viscosidade e área de histerese).

4.2.6.1. Características macroscópicas

A análise das características macroscópicas das formulações foi realizada através da observação, utilizando a escala de descrição, segundo Wittern et al. (1985).

1. nenhuma modificação visível, produto estável
2. leve evidência de falta de homogeneidade
3. início de separação de fase
4. separação de fase marcada
5. separação de fase total

4.2.6.2. Estabilidade à centrifugação

A centrifugação, utilizando Centrífuga Excelsa baby II, modelo 206-R, FANEM, foi realizada durante três períodos iguais de 15 minutos a 1000, 2500 e 3500 rpm, utilizando-se 5,0g das formulações em estudo. A homogeneidade das mesmas foi avaliada através da observação de separação de fases (IDSON, 1988; IDSON, 1993a, 1993b; RIBEIRO; KHURY; GOTTARDI, 1996; RIEGER, 1996; WITTERN et al., 1985).

4.2.6.3. Consistência

Em placa de vidro foi depositado 0,5mL das formulações; a seguir, outra placa de vidro de peso conhecido foi superposta, juntamente com o peso necessário para completar 300g. Decorridos 10 minutos do início da aplicação da carga, os resultados foram obtidos através da média aritmética da leitura em papel

milimetrado das medidas maior e menor da figura formada entre as duas placas de vidro (PRISTA et al., 1991).

4.2.6.4. Densidade

Em balança analítica, 5,0mL das formulações foram pesados, e os valores obtidos expressos em g/mL, segundo a técnica proposta por Ricci et al. (1975).

4.2.6.5. pH

O pH foi verificado através de potenciômetro ANALYSER, modelo pH 20, utilizando-se 1,0g das formulações e 9,0mL de água recém destilada (DAVIS, 1977).

4.2.7. Testes de estabilidade física das formulações

A estabilidade física foi avaliada através da determinação da viscosidade e da característica reológica, nos tempos 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Para tanto, 25,0mL das formulações foram avaliados em Reômetro Rheotest, modelo 2.1, com dispositivo de cilindros coaxiais BICS1, a uma temperatura de 30°C.

Para obtenção das curvas ascendente e descendente, as velocidades de rotação foram aumentando e diminuindo gradativamente, respectivamente. A viscosidade aparente, expressa em centipoises, foi obtida na velocidade 7, equivalente a 7,5 rpm.

Os valores numéricos das leituras da viscosidade aparente permitiram a elaboração dos reogramas, sendo que no eixo das abscissas foram dispostos os valores da tensão de cisalhamento (dinas/cm^2) e, no eixo das ordenadas, o gradiente de cisalhamento (s^{-1}).

O comportamento reológico das formulações foi avaliado segundo os reogramas e as áreas de histerese foram obtidas, a partir das curvas ascendente e descendente, com auxílio de planímetro digital (modelo KP92N, PLACOM).

4.2.8. Análise estatística das estabilidades físico-química e física

A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do *software* GraphPad Software V2.02, os dados foram considerados paramétricos e analisados por ANOVA.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. TESTE DE EFICÁCIA CONSERVANTE DAS FORMULAÇÕES

Os resultados das análises de todas as formulações estão demonstrados por meio do log de UFC/g de sobreviventes, nas tabelas que se seguem. Para facilitar a visualização do perfil de sobrevivência de todos os microrganismos, simultaneamente, bem como observar as diferenças entre eles, frente às três concentrações da lactoferrina e formulação controle, os resultados, em função do tempo, foram plotados em gráficos.

5.1.1. Creme não-iônico

Figura 2. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme não-iônico controle, em função do tempo

Figura 3. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme não-iônico, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 4. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme não-iônico, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 5. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme não-iônico, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Tabela 1 – Log do número de UFC/g de *Candida albicans*, no creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	5,4	5,2	5,5	5,4	5,5	5,9	6,0	6,1	6,6	6,2	6,4	6,4
1,0mg/g	5,4	5,0	4,0	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,0mg/g	5,4	5,0	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,0mg/g	5,4	4,8	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 6. Curvas de sobreviventes da *C. albicans*, no creme não-iônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 2 – Log do número de UFC/g de *Aspergillus niger*, no creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,1	4,9	4,8	5,0	4,7	4,9	4,9	4,8	5,3	5,1	5,1	5,0
1,0mg/g	7,1	5,3	4,7	4,8	4,8	5,0	4,9	4,3	5,3	5,0	5,2	4,8
2,0mg/g	7,1	4,9	4,9	5,0	5,1	5,0	4,8	4,8	4,9	5,5	5,0	4,9
3,0mg/g	7,1	4,8	4,6	4,9	4,7	4,9	4,9	4,5	5,3	5,0	5,2	4,9

Figura 7. Curvas de sobreviventes da *A. niger*, no creme não-iônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 3 - Log do número de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, no creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,6	6,1	5,8	5,8	5,3	4,7	4,5	0	0	0	0	0
1,0mg/g	7,6	5,6	5,4	4,5	5,3	5,5	5,5	5,5	5,0	4,8	0	0
2,0mg/g	7,6	5,6	5,7	5,2	5,2	5,6	5,6	5,5	4,5	4,3	0	0
3,0mg/g	7,6	5,7	5,1	5,1	5,0	5,1	5,1	5,3	4,3	5,7	0	0

Figura 8.
Curvas de sobreviventes da *S. aureus*, no creme não-iônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 4 - Log do número de UFC/g de *Escherichia coli*, no creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	5,7	5,4	5,3	4,5	0	0	0	0	0	0	0
1,0mg/g	7,5	5,4	5,2	5,0	4,0	0	0	0	6,0	5,3	4,3	0
2,0mg/g	7,5	5,2	5,2	5,0	5,0	0	0	0	0	0	0	0
3,0mg/g	7,5	5,3	4,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 9. Curvas de sobreviventes da *E. coli*, no creme não-iônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 5 - Log do número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa*, no creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	5,8	4,8	0	0	4,0	4,5	4,9	5,6	4,9	6,0	6,0
1,0mg/g	7,5	5,3	5,3	5,3	5,1	4,9	4,5	4,3	5,9	5,7	6,8	7,7
2,0mg/g	7,5	5,6	5,3	5,3	5,3	4,9	4,9	4,8	5,8	7,5	7,5	7,6
3,0mg/g	7,5	5,5	5,4	5,0	5,7	5,0	4,6	4,3	4,6	7,5	7,5	7,5

Figura 10. Curvas de sobreviventes da *P. aeruginosa*, no creme não-iônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

5.1.2. Creme aniônico

Figura 11. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme aniônico controle, em função do tempo

Figura 12. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme aniônico, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 13. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme aniônico, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 14. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no creme aniônico, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Tabela 6 - Log do número de UFC/g de *Candida albicans*, no creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	6,8	5,3	5,2	5,2	5,3	4,9	4,5	4,5	4,5	4,0	4,9	4,8
1,0mg/g	6,8	5,5	5,6	5,6	5,4	5,6	5,4	5,5	5,7	5,5	7,6	6,5
2,0mg/g	6,8	5,0	5,2	5,3	5,3	5,5	5,7	5,0	5,6	6,1	7,1	6,8
3,0mg/g	6,8	5,6	5,6	5,5	5,3	5,8	5,8	5,7	6,0	6,5	8,0	6,9

Figura 15. Curvas de sobreviventes da *C. albicans*, no creme aniônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 7 - Log do número de UFC/g de *Aspergillus niger*, no creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	6,5	4,7	4,7	5,1	5,0	4,9	4,9	4,9	4,8	4,8	4,7	4,8
1,0mg/g	6,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,9	4,8	4,5	6,0	4,3
2,0mg/g	6,5	5,0	5,0	4,9	4,8	5,3	5,1	4,9	4,5	4,8	4,3	4,7
3,0mg/g	6,5	4,8	4,9	5,0	5,1	5,0	5,2	5,1	5,0	4,7	4,6	4,8

Tabela 8 - Log do número de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, no creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	5,5	5,6	5,8	6,4	5,0	5,0	5,0	4,8	4,8	4,7	4,8
1,0mg/g	7,5	5,7	6,4	4,4	6,0	5,5	4,5	4,5	4,8	4,5	6,0	4,3
2,0mg/g	7,5	5,6	6,9	6,1	6,2	5,8	5,0	0	4,5	4,8	4,3	4,7
3,0mg/g	7,5	5,6	6,8	6,5	5,9	5,7	5,2	0	5,0	4,7	4,6	4,8

Figura 17. Curvas de sobreviventes da *S. aureus*, no creme aniônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 9 - Log do número de UFC/g de *Escherichia coli*, no creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,4	5,5	5,4	5,0	5,4	5,3	5,3	5,2	5,2	0	0	0
1,0mg/g	7,4	5,4	5,5	5,7	5,9	5,3	4,0	5,7	5,2	0	0	0
2,0mg/g	7,4	5,2	5,1	5,0	5,8	5,3	4,8	6,2	7,0	4,6	0	0
3,0mg/g	7,4	5,4	5,9	6,3	5,8	5,3	5,8	6,2	5,0	4,6	4,0	4,5

Figura 18. Curvas de sobreviventes da *E. coli*, no creme aniônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 10 - Log do número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa*, no creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	5,3	5,3	5,0	5,0	4,8	4,3	4,5	4,8	5,7	8,0	6,8
1,0mg/g	7,5	5,9	5,7	5,3	5,8	4,0	5,5	5,8	7,3	7,7	8,0	7,5
2,0mg/g	7,5	5,3	5,7	5,5	5,7	6,6	6,8	6,9	7,5	7,5	8,2	7,7
3,0mg/g	7,5	5,5	5,7	6,0	7,0	6,8	7,2	7,3	7,5	7,7	8,3	8,0

Figura 19. Curvas de sobreviventes da *P. aeruginosa*, no creme aniônico, controle e com lactoferrina, em função do tempo

5.1.3. Gel de hidroxietilcelulose

Figura 20. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel de hidroxietilcelulose controle, em função do tempo

Figura 21. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel de hidroxietilcelulose, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 22. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel de hidroxietilcelulose, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 23. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel de hidroxietilcelulose, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Tabela 11 - Log do número de UFC/g de *Candida albicans*, no gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,4	5,0	4,8	5,4	4,9	5,6	5,5	5,5	5,4	5,3	4,2	5,2
1,0mg/g	7,4	5,5	5,1	4,0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,0mg/g	7,4	4,8	5,4	4,3	0	0	0	0	0	0	0	0
3,0mg/g	7,4	4,8	4,3	4,5	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 24. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *C. albicans*, no gel de hidroxietilcelulose, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 12 – Log do número de UFC/g de *Aspergillus niger*, no gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	6,9	5,2	4,5	4,9	4,6	4,9	4,8	4,9	4,6	4,5	5,3	4,8
1,0mg/g	6,9	4,6	4,5	4,6	4,5	5,9	4,8	4,8	5,3	4,5	5,2	5,0
2,0mg/g	6,9	4,6	4,6	4,6	4,5	4,9	5,0	5,1	5,1	4,8	5,0	5,3
3,0mg/g	6,9	4,3	4,9	4,8	4,3	4,9	5,3	5,1	4,9	4,7	4,5	4,8

Figura 25. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *A. niger*, no gel de hidroxietilcelulose, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 13 - Log do número de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, no gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	7,0	5,5	5,0	6,9	7,2	0	0	0	0	0	0
1,0mg/g	7,5	5,7	5,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,0mg/g	7,5	7,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,0mg/g	7,5	7,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 26. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *S. aureus*, no gel de hidroxietilcelulose, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 14 - Log do número de UFC/g de *Escherichia coli*, no gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	6,0	6,5	6,7	5,5	4,4	4,0	5,0	4,0	0	0	0
1,0mg/g	7,5	5,6	5,0	4,7	0	0	0	0	0	0	5,7	0
2,0mg/g	7,5	5,7	6,0	4,5	5,0	5,7	0	0	0	0	0	0
3,0mg/g	7,5	5,8	6,0	5,0	0	5,2	0	0	0	0	0	0

Figura 27. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *E. coli*, no gel de hidroxietilcelulose, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 15 - Log do número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa*, no gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	8,1	5,7	6,4	6,3	6,0	5,0	5,3	4,5	5,6	0	0	0
1,0mg/g	8,1	5,7	5,7	6,3	6,0	4,8	0	0	5,3	5,3	5,3	5,0
2,0mg/g	8,1	5,2	5,0	5,9	5,9	7,3	0	0	4,0	0	0	0
3,0mg/g	8,1	5,5	5,9	7,6	6,0	6,5	0	0	0	0	0	0

Figura 28.
Curva dos microrganismos sobreviventes de *P. aeruginosa*, no gel de hidroxietilcelulose, controle e com lactoferrina, em função do tempo

5.1.4. Gel-creme

Figura 29. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel-creme controle, em função do tempo

Figura 30. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel-creme, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 31. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel-creme, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Figura 32. Curvas dos microrganismos sobreviventes, no gel-creme, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função do tempo

Tabela 16 - Log do número de UFC/g de *Candida albicans*, no gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	6,8	5,1	5,1	5,2	5,1	5,5	5,8	4,5	6,1	6,2	6,8	6,3
1,0mg/g	6,8	5,7	5,5	5,3	5,8	5,5	5,8	6,1	5,9	5,8	6,5	6,0
2,0mg/g	6,8	5,6	5,6	5,6	5,4	5,5	5,5	5,0	6,0	6,7	7,6	6,5
3,0mg/g	6,8	5,5	5,5	5,6	5,3	5,4	5,6	5,7	5,9	6,0	6,0	5,6

Figura 33. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *C. albicans*, no gel-creme, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 17 - Log do número de UFC/g de *Aspergillus niger*, no gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	6,5	4,8	4,9	5,1	5,0	5,0	4,9	4,9	4,5	4,9	4,9	4,7
1,0mg/g	6,5	5,0	4,9	4,8	5,0	4,8	4,9	4,9	4,6	4,9	5,2	4,8
2,0mg/g	6,5	4,6	5,3	5,5	4,7	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,9	5,1
3,0mg/g	6,5	5,0	5,0	5,1	5,3	4,8	4,9	5,0	5,6	4,8	5,0	7,0

Figura 34. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *A. niger*, no gel-creme, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 18 - Log do número de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, no gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	5,3	5,0	4,5	4,8	5,0	5,0	5,0	0	0	0	0
1,0mg/g	7,5	5,1	5,1	5,0	4,9	4,7	4,5	0	5,0	6,0	0	5,7
2,0mg/g	7,5	5,5	5,5	5,5	5,6	4,8	5,0	0	0	0	0	4,3
3,0mg/g	7,5	5,3	5,5	5,2	5,5	5,1	6,5	0	0	0	0	0

Figura 35. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *S. aureus*, no gel-creme, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 19 - Log do número de UFC/g de *Escherichia coli*, no gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,4	5,3	5,1	4,9	5,4	4,7	4,8	4,6	4,3	4,5	6,0	6,0
1,0mg/g	7,4	5,3	5,1	4,8	4,0	5,4	6,3	5,3	5,7	5,8	4,3	4,8
2,0mg/g	7,4	4,6	4,2	5,0	5,5	5,2	5,6	5,4	0	0	6,0	5,0
3,0mg/g	7,4	5,0	5,1	5,1	5,3	5,3	4,9	5,0	5,8	5,8	6,0	6,6

Figura 36. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *E. coli*, no gel-creme, controle e com lactoferrina, em função do tempo

Tabela 20 – Log do número de UFC/g de *Pseudomonas aeruginosa*, no gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração da lactoferrina	Tempo											
	0h	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	7d	14d	21d	28d
controle	7,5	5,6	5,9	6,1	6,2	6,6	6,4	6,7	6,6	6,6	7,9	7,6
1,0mg/g	7,5	5,3	5,7	5,8	5,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,4	7,0	7,7
2,0mg/g	7,5	6	6,2	6,5	5,8	7,0	7,2	7,5	7,6	7,4	8,2	8,2
3,0mg/g	7,5	6,1	6,7	7,0	7,2	7,5	7,5	7,5	7,8	7,7	8,1	8,2

Figura 37. Curvas dos microrganismos sobreviventes de *P. aeruginosa*, no gel-creme, controle e com lactoferrina, em função do tempo

5.2. TESTES DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES

Os parâmetros avaliados foram aspecto macroscópico, estabilidade à centrifugação, pH, densidade e consistência.

5.2.1. Creme não-iônico

Tabela 21 - Análises de pH, do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	7,50	7,83	7,72	7,25	7,28	7,10	6,80	7,25	6,48	6,17
1	7,51	7,85	7,74	7,34	7,33	7,13	6,78	7,45	6,58	6,20
2	7,26	7,49	7,45	7,20	7,65	7,74	6,93	6,52	6,65	6,07
3	6,85	6,99	7,05	6,27	7,12	7,10	6,98	6,49	6,32	6,08

TA: temperatura ambiente

Tabela 22 - Análises de pH, do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	7,46	7,00	7,02	7,80	7,81	7,09	7,60	6,90	6,95	6,99	6,91	6,50
1	7,54	7,03	6,63	7,85	7,74	7,11	6,99	6,88	7,60	6,69	6,62	6,01
2	6,43	6,86	7,03	7,38	6,80	6,30	7,24	7,20	6,05	6,73	6,57	5,98
3	6,66	6,17	6,74	7,23	6,53	6,04	7,30	6,55	6,38	6,69	6,10	5,90

Figura 38.
pH do creme
não-iônico
controle, em
função dos
tempos e
temperaturas

Figura 39.
pH do creme
não-iônico com
1,0 mg/g de
lactoferrina, em
função dos
tempos e
temperaturas

Figura 40.
pH do creme
não-iônico com
2,0 mg/g de
lactoferrina, em
função dos
tempos e
temperaturas

Figura 41.
pH do creme
não-iônico com
3,0 mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Tabela 23 - Análises de densidade (g/mL), do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	0,9001	0,8600	0,9000	0,8559	0,8146	0,8572	0,8975	0,8488	0,8537	0,8455
1	0,8930	0,8604	0,9033	0,8566	0,8158	0,8580	0,8988	0,8491	0,8582	0,8435
2	0,9261	0,9820	0,9837	0,8756	0,9646	1,0131	0,9600	0,9679	0,9192	0,9397
3	0,9562	0,9471	0,9888	0,9793	0,9531	0,9421	0,9059	0,9182	0,8062	0,9241

TA: temperatura ambiente

Tabela 24 - Análises de densidade (g/mL), do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	0,8400	0,8936	0,8526	0,8694	0,8600	0,8422	0,8980	0,8883	0,9242	0,8821	0,8399	0,8497
1	0,8406	0,8953	0,8527	0,8703	0,8747	0,8413	0,8991	0,8910	0,9283	0,8857	0,8418	0,8585
2	0,9642	0,9632	0,9601	0,9777	0,9506	0,9990	0,9607	0,9280	0,9751	0,9572	0,9187	0,9932
3	0,9418	0,9590	0,9319	0,9508	0,9507	0,9638	0,9782	0,9742	0,9680	1,0323	0,9644	0,9940

Figura 42.
Densidade do
creme não-
iônico controle,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 43.
Densidade do
creme não-
iônico com
1,0mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 44.
Densidade do
creme não-
iônico com
2,0mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 45.
Densidade do
creme não-
iônico com
3,0mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Tabela 25 - Análises de consistência (mm), do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	63,0	72,0	67,0	66,0	61,0	61,0	66,5	62,0	70,0	55,0
1	63,0	73,0	69,0	69,0	61,0	62,0	69,5	62,0	71,5	56,5
2	63,0	65,5	76,0	63,0	60,5	67,0	57,5	65,5	65,5	66,5
3	58,5	60,0	65,0	60,5	62,5	67,5	57,5	66,5	66,5	60,5

TA: temperatura ambiente

Tabela 26 - Análises de consistência (mm), do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	69,5	72,0	66,0	70,0	72,0	62,0	71,0	72,0	70,0	62,0	72,5	58,5
1	70,5	73,5	66,5	71,5	72,0	61,5	70,5	74,0	70,0	63,5	73,5	58,0
2	71,5	79,5	77,0	79,5	77,0	71,0	79,5	70,0	62,0	69,5	68,5	58,5
3	74,0	83,0	74,0	75,5	74,0	73,5	69,0	72,5	66,0	67,0	63,0	57,5

Figura 46.
Consistência do
creme não-
iônico controle,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 47.
Consistência do
creme não-
iônico contendo
1,0mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 48.
Consistência do
creme não-
iônico contendo
2,0mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 49.
Consistência do
creme não-
iônico contendo
3,0mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

5.2.2. Creme aniônico

Tabela 27 - Análises de pH do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	6,61	6,53	6,44	6,36	6,85	6,90	6,13	7,20	7,00	4,25
1	6,66	6,68	6,54	6,35	6,90	6,97	5,67	7,30	6,85	4,43
2	6,68	6,75	6,03	6,45	7,00	7,00	6,40	7,40	7,00	4,62
3	6,81	6,83	7,01	6,62	7,10	7,00	6,57	7,40	6,70	4,53

TA: temperatura ambiente

Tabela 28 - Análises de pH do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	5,97	5,44	3,87	6,27	4,10	3,57	6,28	4,22	3,57	5,78	3,86	3,41
1	6,41	4,97	4,06	6,47	4,43	3,67	6,54	5,23	3,67	6,00	4,19	3,45
2	6,27	5,31	4,00	6,50	4,84	3,77	6,74	4,63	3,68	6,10	4,62	3,53
3	6,55	5,39	3,90	6,58	4,82	3,62	6,93	5,06	3,55	6,30	4,07	3,45

Figura 50.
pH do creme
aniônico
controle, em
função dos
tempos e
temperaturas

Figura 51.
pH do creme
aniônico com 1,0
mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 52. pH
do creme
aniônico com
2,0 mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 53. pH
do creme
aniônico com
3,0 mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Tabela 29 - Análises de densidade (g/mL) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀ TA	4 °C	t ₁₅ 25°C	40 °C	4 °C	T ₃₀ 25°C	40 °C	4 °C	T ₆₀ 25°C	40 °C
controle	0,9000	0,9200	0,9300	0,7100	0,9000	0,9000	0,9400	0,9500	0,9500	0,9750
1	0,7500	0,9100	1,0000	0,9300	0,9100	0,8600	0,9500	0,9700	0,9900	0,9000
2	0,8700	0,8900	0,8800	0,9300	0,8800	0,9700	0,8600	0,8900	1,0000	1,0050
3	0,9000	0,8850	0,9300	0,9600	0,9000	0,8900	1,0050	0,9200	1,0000	1,0200

TA: temperatura ambiente

Tabela 30 - Análises de densidade (g/mL) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	4 °C	T ₉₀ 25°C	40 °C	4 °C	T ₁₂₀ 25°C	40 °C	4 °C	T ₁₅₀ 25°C	40 °C	4 °C	T ₁₈₀ 25°C	40 °C
controle	0,9600	0,9800	1,0050	0,9650	0,9800	0,8950	0,9550	0,9550	1,0150	0,9800	0,9950	1,0050
1	0,9750	0,9800	1,0100	0,7250	1,0200	0,9100	0,9650	0,9600	0,9600	0,9500	0,9550	1,0850
2	1,0050	1,0100	0,9950	0,8950	0,9700	0,9750	0,9300	0,9550	0,9650	0,9100	1,0000	0,9850
3	0,9750	0,9950	1,0100	1,0000	1,0500	0,7000	0,9650	0,9600	1,0000	0,9900	0,9400	1,0400

Figura 54.
Densidade do
creme aniônico
controle, em
função dos
tempos e
temperaturas

Figura 55.
Densidade do
creme aniônico
com 1,0 mg/g
de lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 56.
Densidade do
creme aniônico
com 2,0 mg/g
de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 57.
Densidade do
creme aniônico
com 3,0 mg/g
de lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Tabela 31 - Análises de consistência (mm) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	5,9	6,55	6,9	6,7	6,3	7,25	6,9	7,25	6,35	6,6
1	6,6	6,65	6,4	7,6	7,3	7,4	7,3	7,3	7,2	7,35
2	7,55	7,2	6,75	7,45	8,25	7,15	6,7	7,6	7,55	7,45
3	6,95	6,9	6,15	7,2	7,9	7,85	7,2	6,65	7,4	7,4

TA: temperatura ambiente

Tabela 32 - Análises de consistência (mm) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	7,1	7,2	8,5	7,00	7,15	7,10	7,35	6,10	6,70	5,85	6,50	7,50
1	7,8	7,4	8,25	7,20	6,70	7,20	6,75	6,85	7,30	5,50	6,00	6,35
2	7,9	7,1	7,45	7,10	6,50	7,00	7,50	6,25	6,80	6,75	6,40	6,40
3	8,15	7,75	8,0	7,20	7,25	7,10	7,75	7,00	7,70	7,10	7,00	6,80

Figura 58. Consistência do creme aniônico controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 59. Consistência do creme aniônico com 1,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 60. Consistência do creme aniônico com 2,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 61. Consistência do creme aniônico com 3,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

5.2.3. Gel de hidroxietilcelulose

Tabela 33 - Análises de pH do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅		T ₃₀		T ₆₀	
	TA	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	6,18	4,80	5,25	9,38	5,90	6,00	8,26
1	6,17	4,85	5,00	5,10	6,07	6,10	6,83
2	6,15	5,41	5,41	4,86	5,92	6,20	7,50
3	6,12	5,48	5,43	4,90	6,31	6,05	7,19

TA: temperatura ambiente

Tabela 34 - Análises de pH do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀		T ₁₂₀		T ₁₅₀		T ₁₈₀	
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C
controle	5,84	-	5,78	6,17	-	7,71	7,02	-
1	5,95	6,50	6,71	6,31	6,05	8,67	7,63	7,16
2	6,47	6,86	6,33	6,81	6,53	7,54	6,10	6,97
3	6,13	5,87	5,91	5,71	6,07	5,97	6,93	6,60

Figura 62.
pH do gel de hidroxietilcelulose controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 63.
pH do gel de hidroxietilcelulose, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 64.
pH do gel de hidroxietilcelulose, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 65.
pH do gel de hidroxietilcelulose, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Tabela 35 - Análises de densidade (g/mL) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	1,0770	1,0680	1,0351	1,0400	1,0870	1,0730	1,0356	1,0804	1,0920	1,0810
1	1,1234	1,0796	1,0342	1,0605	1,0385	1,0314	1,0756	1,0758	1,0833	1,0839
2	1,0716	1,0724	1,0497	1,0427	1,0056	1,0251	1,0625	1,0791	1,0800	1,0776
3	1,0985	1,0699	1,0641	1,0247	1,0216	1,0199	1,0524	1,0885	1,0758	1,0896

TA: temperatura ambiente

Tabela 36 - Análises de densidade (g/mL) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	1,0534	-	1,0576	1,0243	-	1,0825	1,0251	-	1,0633	1,1458	-	1,0756
1	1,0435	1,0632	1,1083	1,0191	0,9980	1,0445	1,0079	1,0478	1,1033	1,1254	1,0961	1,0834
2	1,0354	1,0733	1,0345	1,0094	0,9871	1,0633	1,0727	1,0669	1,0374	1,0862	1,1081	1,1131
3	1,0241	1,0535	1,0531	1,0370	1,0567	1,0370	1,1042	1,0760	1,0505	1,1094	1,0915	1,1044

Figura 66.
Densidade do gel de hidroxietilcelulose controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 67.
Densidade do gel de hidroxietilcelulose, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 68.
Densidade do gel de hidroxietilcelulose, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 69.
Densidade do gel de hidroxietilcelulose, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Tabela 37 - Análises de consistência (mm) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	46,0	50,5	52,0	53,5	50,0	60,0	56,0	46,0	-	-
1	50,0	49,5	49,0	52,5	50,0	51,0	50,5	48,5	45,0	49,0
2	49,0	51,5	46,5	52,0	47,5	50,0	51,5	49,0	50,0	49,5
3	49,0	53,0	57,0	55,0	51,0	49,5	49,0	50,0	52,0	48,0

TA: temperatura ambiente

Tabela 38 - Análises de consistência (mm) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	49,5	-	50,0	50,0	-	50,5	56,5	-	45,0	42,0	-	47,5
1	50,0	44,0	48,5	52,0	43,5	49,5	44,5	44,5	43,0	42,5	45,0	46,0
2	51,5	48,0	49,5	50,5	47,0	50,0	47,5	44,5	45,5	46,5	45,0	48,0
3	51,5	50,0	52,5	53,0	50,5	53,0	58,0	45,0	57,5	50,0	46,5	47,5

Figura 70.
Consistência do gel de hidroxietilcelulose controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 71.
Consistência do gel de hidroxietilcelulose, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 72.
Consistência do gel de hidroxietilcelulose, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 73.
Consistência do gel de hidroxietilcelulose, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

5.2.4. Gel-creme

Tabela 39 - Análises de pH do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀ TA	4°C	t ₁₅ 25°C	40°C	4°C	T ₃₀ 25°C	40°C	4°C	T ₆₀ 25°C	40°C
controle	6,40	6,02	6,41	6,50	6,35	6,82	7,35	6,45	7,43	7,50
1	6,41	6,02	6,45	6,67	6,47	7,00	7,57	6,51	7,10	7,78
2	6,39	6,26	6,48	6,65	6,68	7,00	7,58	6,70	7,13	7,80
3	6,43	6,35	6,47	6,59	6,89	7,06	7,65	6,95	7,15	7,75

TA: temperatura ambiente

Tabela 40 - Análises de pH do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	4°C	T ₉₀ 25°C	40°C	4°C	T ₁₂₀ 25°C	40°C	4°C	T ₁₅₀ 25°C	40°C	4°C	T ₁₈₀ 25°C	40°C
controle	7,03	8,06	7,65	7,05	8,98	7,89	7,73	9,01	8,00	8,89	9,27	8,98
1	7,12	7,61	7,90	7,45	9,01	8,02	8,10	9,15	8,51	9,01	9,38	9,01
2	7,54	7,52	7,87	7,62	8,04	7,95	8,02	8,42	8,04	8,87	8,78	8,89
3	7,51	7,68	7,26	8,00	7,95	8,01	8,37	8,37	8,12	8,96	9,02	8,98

Figura 85.
pH do gel-creme controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 86.
pH do gel-creme, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 87.
pH do gel-creme, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 88.
pH do gel-creme, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Tabela 41 - Análises de densidade (g/mL) do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	1,0196	1,0264	1,0494	1,0410	1,0293	1,0332	1,0326	1,0347	1,0325	1,0297
1	1,0248	1,0344	1,0268	1,0337	1,0472	1,0253	1,0442	1,0458	1,0343	1,0372
2	1,0432	1,0409	1,0286	1,0221	1,0440	1,0452	1,0222	1,0294	1,0451	1,0291
3	1,0309	1,0321	1,0428	1,0369	1,0235	1,0343	1,0476	1,0434	1,0337	1,0439

TA: temperatura ambiente

Tabela 42 - Análises de densidade (g/mL) do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	1,0242	1,0375	1,0343	1,0139	1,0237	1,0364	1,0217	1,0277	1,0239	1,0272	1,0294	1,0332
1	1,0322	1,0247	1,0271	1,0328	1,0250	1,0242	1,0297	1,0312	1,0379	1,0317	1,0298	1,0430
2	1,0243	1,0233	1,0124	1,0227	1,0197	1,0451	1,0330	1,0211	1,0371	1,0290	1,0342	1,0299
3	1,0321	1,0229	1,0332	1,0349	1,0358	1,0332	1,0284	1,0233	1,0371	1,0362	1,0249	1,0426

Figura 89.
Densidade do gel-creme controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 90.
Densidade do gel-creme, com 1,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 91.
Densidade do gel-creme, com 2,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 92.
Densidade do gel-creme, com 3,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Tabela 43: Análises de consistência (mm) do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅		T ₃₀		T ₆₀	
	TA	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C
controle	45,0	50,0	52,0	55,0	59,5	50,0	61,0
1	49,0	47,5	51,0	49,0	51,5	53,5	50,0
2	48,0	52,0	52,0	51,0	53,0	55,0	56,0
3	47,0	58,0	45,0	54,0	49,0	53,0	52,5

TA: temperatura ambiente

Tabela 44 - Análises de consistência (mm) do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	T ₉₀		T ₁₂₀		T ₁₅₀		T ₁₈₀	
	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C	40 °C	4 °C	25°C
controle	62,5	52,0	56,0	49,0	51,0	42,0	50,5	54,0
1	57,0	47,0	58,5	53,0	50,0	46,0	53,5	48,0
2	58,5	60,0	58,0	49,5	49,0	53,0	50,5	48,5
3	57,0	59,0	52,5	50,0	50,5	50,0	48,5	49,0

Figura 93.
Consistência do gel-creme controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 94.
Consistência do gel-creme, com 1,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 95.
Consistência do gel-creme, com 2,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 96.
Consistência do gel-creme, com 3,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

5.3. TESTES DE ESTABILIDADE FÍSICA DAS FORMULAÇÕES

A estabilidade física foi avaliada através da determinação da viscosidade e da característica reológica. A tixotropia foi observada através dos reogramas, bem como foram obtidas as áreas de histerese.

5.3.1. Creme não-iônico

Tabela 45 - Análises de viscosidade (cps) do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀ TA	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	5565,0	5225,0	4770,0	4202,0	5225,0	5111,0	4998,0	5225,0	4543,0	3975,0
1	5565,0	4202,0	5452,0	4770,0	5225,0	5111,0	6247,0	5338,0	4770,0	4998,0
2	5225,0	5111,0	4657,0	5338,0	4884,0	4657,0	5452,0	3975,0	4884,0	6247,0
3	4657,0	4770,0	4430,0	6588,0	4657,0	4770,0	6133,0	4430,0	4430,0	7156,0

TA: temperatura ambiente

Tabela 46 - Análises de viscosidade (cps) do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	5338,0	4430,0	5338,0	4657,0	4770,0	6928,0	4770,0	4657,0	7156,0	3635,0	3975,0	7383,0
1	4770,0	4202,0	6928,0	3521,0	4543,0	7156,0	3635,0	3975,0	7383,0	3748,0	4430,0	7951,0
2	2612,0	4770,0	6928,0	2726,0	4430,0	6247,0	2158,0	4770,0	7269,0	2385,0	4884,0	8405,0
3	4657,0	4657,0	7042,0	3862,0	4089,0	6474,0	2726,0	4657,0	7042,0	3180,0	5111,0	7723,0

Figura 97.
Viscosidade do
creme não-
iônico controle,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 98.
Viscosidade do
creme não-
iônico, com 1,0
mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 99.
Viscosidade do
creme não-
iônico, com 2,0
mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 100.
Viscosidade do
creme não-
iônico, com 3,0
mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Tabela 47 - Área de histerese (cm²) do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	0,2	33,3	11,9	2,3	15,7	21,9	2,0	9,3	18,2	2,2
1	0,3	34,3	12,4	2,4	15,8	22,2	2,0	10,2	19,7	2,3
2	2,9	12,5	10,4	1,9	0,7	20,7	3,9	13,9	11,3	4,2
3	0,9	1,6	5,7	3,7	0,4	19,4	3,1	3,0	1,7	1,3

TA: temperatura ambiente

Tabela 48 - Área de histerese (cm²) do creme não-iônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	16,7	9,9	1,8	11,7	14,2	1,0	9,4	12,4	0,5	17,9	17,9	0,9
1	17,1	10,3	2,0	12,6	15,1	1,1	9,6	12,6	0,7	18,4	18,9	0,9
2	14,3	14,9	2,8	8,0	5,8	1,4	11,5	12,3	1,1	13,7	15,4	1,3
3	1,7	10,6	0,8	10,7	7,7	0,9	15,7	16,0	0,6	15,6	18,7	1,4

Figura 101.

Áreas de histerese do creme não-iônico controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 102.

Áreas de histerese do creme não-iônico, com 1,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 103.

Áreas de histerese do creme não-iônico, com 2,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 104.

Áreas de histerese do creme não-iônico, com 3,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 105. Reograma de creme não-iônico controle, a 25°C, no tempo zero

Figura 106. Reograma de creme não-iônico controle, a 25°C, no tempo trinta

Figura 107. Reograma de creme não-iônico controle, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 108. Reograma de creme não-iônico controle, a 40°C, no tempo trinta

Figura 109. Reograma de creme não-iônico controle, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 110. Reograma de creme não-iônico controle, a 4°C, no tempo trinta

Figura 111. Reograma de creme não-iônico controle, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 112. Reograma de creme não-iônico com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 113. Reograma de creme não-iônico com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 114. Reograma de creme não-iônico com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 115. Reograma de creme não-iônico com 1mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 116. Reograma de creme não-iônico com 1mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 117. Reograma de creme não-iônico com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 118. Reograma de creme não-iônico com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 119. Reograma de creme não-iônico com 2mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 120. Reograma de creme não-iônico com 2mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 121. Reograma de creme não-iônico com 2mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 122. Reograma de creme não-iônico com 2mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 123. Reograma de creme não-iônico com 2mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 124. Reograma de creme não-iônico com 2mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 125. Reograma de creme não-iônico com 2mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 126. Reograma de creme não-iônico com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 127. Reograma de creme não-iônico com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 128. Reograma de creme não-iônico com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 129. Reograma de creme não-iônico com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 130. Reograma de creme não-iônico com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 131. Reograma de creme não-iônico com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 132. Reograma de creme não-iônico com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

5.3.2. Creme aniônico

Tabela 49 - Análises de viscosidade (cps) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀ TA	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	1552,7	1552,7	1322,7	1380,2	1552,7	1610,2	1322,7	1610,2	1667,8	1380,2
1	1840,3	1782,8	1840,3	1552,7	1725,3	1610,2	1782,8	1782,8	1725,3	1840,3
2	1897,8	2012,8	1667,8	1265,2	1955,3	1725,3	1552,7	1897,8	1667,8	1552,7
3	1322,7	1265,2	1207,7	977,6	1150,2	1207,7	1092,7	1265,2	-	1150,2

TA: temperatura ambiente

Tabela 50 - Análises de viscosidade (cps) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	1322,7	977,6	977,6	1265,2	1610,2	1322,7	1437,7	1667,8	1380,2	1495,2	2012,8	1437,7
1	920,1	2070,3	1092,7	2012,8	1182,1	1667,8	2070,3	1840,3	1725,3	2242,9	1782,8	1840,3
2	1322,7	-	1552,7	1897,8	-	1035,1	2012,8	-	1150,2	2127,8	-	1265,2
3	1322,7	-	1207,7	920,1	-	920,1	1092,7	-	1207,7	1207,7	-	1265,2

Figura 133.
Viscosidade do
creme aniônico,
controle, em
função dos
tempos e
temperaturas

Figura 134.
Viscosidade do
creme aniônico,
com 1,0 mg/g
de lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 135.
creme aniônico,
com 2,0 mg/g
de lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Figura 136.
Teste de creme
aniônico, com
3,0 mg/g de
lactoferrina,
em função dos
tempos e
temperaturas

Tabela 51 - Área de histerese (cm²) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
	TA	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	16,3	18,2	5,4	10,4	10,9	4,0	6,9	13,4	5,4	9,1
1	21,4	18,1	16,4	10,2	7,0	8,1	15,2	7,6	10,7	15,3
2	15,8	21,8	19,9	10,9	15,5	23,3	26,6	16,7	21,1	28,3
3	8,6	6,0	7,9	2,0	3,8	5,3	3,5	4,3	-	4,7

TA: temperatura ambiente

Tabela 52 - Área de histerese (cm²) do creme aniônico controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	3,3	4,4	4,2	4,4	7,0	9,2	0,5	18,3	2,0	5,2	8,5	8,1
1	9,8	21,0	2,8	20,6	30,9	12,2	18,1	28,7	10	17,9	28,5	9,1
2	24,4	-	8,1	28,4	-	11,2	25,5	-	11,2	12,3	-	24
3	14,7	-	6,9	5,4	-	6,3	4,4	-	5,5	7,5	-	5,2

Figura 137.
Áreas de histerese do creme aniônico controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 138.
Áreas de histerese do creme aniônico, com 1,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 139.
Áreas de histerese do creme aniônico, com 2,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 140.
Áreas de histerese do creme aniônico, com 3,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 141. Reograma do creme aniônico controle, a 25°C, no tempo zero

Figura 142. Reograma do creme aniônico controle, a 25°C, no tempo trinta

Figura 143. Reograma do creme aniônico controle, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 144. Reograma do creme aniônico controle, a 40°C, no tempo trinta

Figura 145. Reograma do creme aniônico controle, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 146. Reograma do creme aniônico controle, a 4°C, no tempo trinta

Figura 147. Reograma do creme aniônico controle, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 148. Reograma do creme aniônico, com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 149. Reograma do creme aniônico, com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 150. Reograma do creme aniônico, com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 151. Reograma do creme aniônico, com 1mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 152. Reograma do creme aniônico, com 1mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 153. Reograma do creme aniônico, com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 154. Reograma do creme aniônico, com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 155. Reograma do creme aniônico, com 2mg/g de e lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 156. Reograma do creme aniônico, com 2mg/g de e lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 157. Reograma do creme aniônico, com 2mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo sessenta

Figura 158. Reograma do creme aniônico, com 2mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 159. Reograma do creme aniônico, com 2mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 160. Reograma do creme aniônico, com 2mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 161. Reograma do creme aniônico, com 2mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 162. Reograma do creme aniônico, com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 163. Reograma do creme aniônico, com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 164. Reograma do creme aniônico, com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo sessenta

Figura 165. Reograma do creme aniônico, com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 166. Reograma do creme aniônico, com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 167. Reograma do creme aniônico, com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 168. Reograma do creme aniônico, com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

5.3.3. Gel de hidroxietilcelulose

Tabela 53 - Análises de viscosidade (cps) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t ₀ TA	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	3221,0	3278,0	2818,0	2818,0	2933,0	2300,0	2588,0	3106,0	403,0	115,0
1	3278,0	3451,0	3048,0	3393,0	3048,0	3278,0	3393,0	3393,0	3451,0	3796,0
2	3393,0	3336,0	3163,0	3221,0	3393,0	3393,0	3163,0	3221,0	3336,0	2991,0
3	2991,0	2473,0	2128,0	2588,0	3048,0	2818,0	2876,0	2760,0	2473,0	2530,0

TA: temperatura ambiente

Tabela 54 - Análises de viscosidade (cps) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	2760,0	-	2818,0	2703,0	-	3163,0	2128,0	-	3451,0	3048,0	-	3048,0
1	3798,0	3681,0	3508,0	3853,0	2933,0	3681,0	3623,0	3566,0	3163,0	3508,0	2415,0	3451,0
2	3278,0	3393,0	3048,0	3278,0	3106,0	3048,0	3163,0	3221,0	2991,0	2991,0	3163,0	2991,0
3	2588,0	2415,0	2415,0	2645,0	2473,0	2645,0	2530,0	2703,0	2530,0	2530,0	2933,0	2530,0

Figura 169.
Viscosidade do gel de hidroxietilcelulose controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 170.
Viscosidade do gel de hidroxietilcelulose, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 171.
Viscosidade do gel de hidroxietilcelulose, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 172.
Viscosidade do gel de hidroxietilcelulose, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Tabela 55 - Área de histerese (cm^2) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	t_0	t_{15}			T_{30}			T_{60}		
	TA	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
controle	1,1	3,7	0,4	0,1	1,5	0	0	3,2	0	0
1	2,0	2,0	2,8	0,9	0,3	1,3	1,5	0,7	0,9	1,5
2	2,9	1,4	0,1	1,3	1,3	2,8	1,6	2,3	1,2	1,7
3	2,2	0,8	1,1	0	1,5	0,9	0,7	0,8	0,4	0,2

TA: temperatura ambiente

Tabela 56 - Área de histerese (cm^2) do gel de hidroxietilcelulose controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função do tempo

Concentração (mg/g)	T_{90}				T_{120}				T_{150}				T_{180}	
	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	25°C	40°C
controle	0,4	-	0,7	1,7	-	0,6	0,3	-	1,7	0,5	-	0,2	-	0,2
1	2,4	0,4	1,0	2,1	0,2	1,8	2,4	1,4	0	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2
2	2,2	1,3	1,3	2,9	0,2	1,1	0,5	2,2	1,1	0,7	0,2	0,4	0,2	0,4
3	0,8	0,8	0,4	0,3	1,0	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,6	0,3	0,6	0,3

Figura 173.
Áreas de histerese do gel de hidroxiethylcelulose controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 174.
Áreas de histerese do gel de hidroxiethylcelulose, com 1,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 175.
Áreas de histerese do gel de hidroxiethylcelulose, com 2,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 176.
Áreas de histerese do gel de hidroxiethylcelulose, com 3,0mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 177. Reograma do gel de hidroxietilcelulose controle, a 25°C, no tempo zero

Figura 178. Reograma do gel de hidroxietilcelulose controle, a 25°C, no tempo trinta

Figura 179. Reograma do gel de hidroxietilcelulose controle, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 180. Reograma do gel de hidroxietilcelulose controle, a 40°C, no tempo trinta

Figura 181. Reograma do gel de hidroxietilcelulose controle, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 182. Reograma do gel de hidroxietilcelulose controle, a 4°C, no tempo trinta

Figura 183. Reograma do gel de hidroxietilcelulose controle, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 184. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 185. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 186. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 187. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 1mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 188. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 189. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 190. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 2mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 191. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 2mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 192. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 2mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 193. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 2mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 194. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 2mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 195. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 2mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 196. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 2mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 197. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 198. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 199. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 200. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 201. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 202. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 203. Reograma do gel de hidroxietilcelulose com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

5.3.4. Gel-creme

Tabela 54 - Análises de viscosidade (cps) do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	t ₀ TA	t ₁₅			T ₃₀			T ₆₀		
		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	2356,0	2243,0	2013,0	2185,0	2818,0	2760,0	2703,0	2876,0	2530,0	2818,0
1	3048,0	3451,0	3048,0	2876,0	3221,0	3048,0	3221,0	3163,0	2991,0	3796,0
2	3048,0	2645,0	2818,0	2876,0	2933,0	2818,0	2703,0	3106,0	3106,0	2703,0
3	3048,0	2876,0	2991,0	2934,0	3048,0	2933,0	2760,0	3163,0	2818,0	2760,0

TA: temperatura ambiente

Tabela 55 - Análises de viscosidade (cps) do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	T ₉₀			T ₁₂₀			T ₁₅₀			T ₁₈₀		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
controle	3163,0	2356,0	2703,0	2645,0	3048,0	2818,0	2530,0	2991,0	2933,0	2300,0	2876,0	2876,0
1	3106,0	2876,0	3738,0	3393,0	3681,0	3106,0	3163,0	3681,0	2760,0	3106,0	3623,0	2703,0
2	3163,0	2991,0	2588,0	2818,0	2760,0	2473,0	2876,0	2760,0	2473,0	2818,0	2703,0	2358,0
3	3278,0	2760,0	2703,0	3106,0	2760,0	2703,0	3048,0	2760,0	2473,0	2991,0	2703,0	2415,0

Figura 204.
Viscosidades do gel-creme controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 205.
Viscosidades do gel-creme, com 1,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 206.
Viscosidades do gel-creme, com 2,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 207.
Viscosidades do gel-creme, com 3,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Tabela 56 - Área de histerese do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	t ₀ TA	4°C	t ₁₅ 25°C	40°C	4°C	T ₃₀ 25°C	40°C	4°C	T ₆₀ 25°C	40°C
controle	0	0,4	1,5	1,2	0	0	0	0,3	0	0,4
1	0	0,3	0	0,2	1,1	0,4	0,2	0,4	0	0
2	0	0,6	0	0	0,4	1,3	1,4	0	0	0
3	0	1,4	0,5	0	0,5	0,7	0,8	0	0	0

TA: temperatura ambiente

Tabela 57 - Área de histerese do gel-creme controle e com diferentes concentrações de lactoferrina, em função dos tempos

Concentração (mg/g)	4°C	T ₉₀ 25°C	40°C	4°C	T ₁₂₀ 25°C	40°C	4°C	T ₁₅₀ 25°C	40°C	4°C	T ₁₈₀ 25°C	40°C
controle	0	0,1	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0,1	0	0,2	0	0	0,1	0	0,6	0	4,7
2	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0	4,1	0
3	0	0	0	0,1	0	0	0	0,3	0	0	0,9	0,2

Figura 208.
Áreas de histerese do gel-creme controle, em função dos tempos e temperaturas

Figura 209.
Áreas de histerese do gel-creme, com 1,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 210.
Áreas de histerese do gel-creme, com 2,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 211.
Áreas de histerese do gel-creme, com 3,0 mg/g de lactoferrina, em função dos tempos e temperaturas

Figura 212. Reograma do gel-creme controle, a 25°C, no tempo zero

Figura 213. Reograma do gel-creme controle, a 25°C, no tempo trinta

Figura 214. Reograma do gel-creme controle, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 215. Reograma do gel-creme controle, a 40°C, no tempo trinta

Figura 216. Reograma do gel-creme controle, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 217. Reograma do gel-creme controle, a 4°C, no tempo trinta

Figura 218. Reograma do gel-creme controle, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 219. Reograma do gel-creme, com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 220. Reograma do gel-creme, com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 221. Reograma do gel-creme, com 1mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 222. Reograma do gel-creme, com 1mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 223. Reograma do gel-creme, com 1mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 224. Reograma do gel-creme, com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 225. Reograma do gel-creme, com 1mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 226. Reograma do gel-creme, com 2mg/g de e lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 227. Reograma do gel-creme, com 2mg/g de e lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 228. Reograma do gel-creme, com 2mg/g de e lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 229. Reograma do gel-creme, com 2mg/g de e lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 230. Reograma do gel-creme, com 2mg/g de e lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 231. Reograma do gel-creme, com 2mg/g de e lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 232. Reograma do gel-creme, com 2mg/g de e lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

Figura 233. Reograma do gel-creme, com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo zero

Figura 234. Reograma do gel-creme, com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo trinta

Figura 235. Reograma do gel-creme, com 3mg/g de lactoferrina, a 25°C, no tempo cento e oitenta

Figura 236. Reograma do gel-creme, com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo trinta

Figura 237. Reograma do gel-creme, com 3mg/g de lactoferrina, a 40°C, no tempo cento e oitenta

Figura 238. Reograma do gel-creme, com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo trinta

Figura 239. Reograma do gel-creme, com 3mg/g de lactoferrina, a 4°C, no tempo cento e oitenta

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os tempos modernos nos trouxeram tantas facilidades e comodidades que não conseguimos sequer imaginar a vida sem todos estes avanços, sejam tecnológicos ou intelectuais. No entanto, com toda esta parafernália disponível, ainda não conseguimos a tão sonhada longevidade, muito menos longevidade com qualidade de vida. Ao longo dos séculos vimos tentando e, nas últimas décadas, algumas pesquisas nos têm feito vislumbrar os incipientes embriões da "juventude eterna". Medicamentos cada vez mais eficazes, direcionados e particularizados e cosméticos eficientes, graças a investimentos volumosos, certos do retorno rápido.

Mas, existem adversários inteligentes. Os maravilhosos e tenebrosos microrganismos, que fazem a nossa alegria, mas também nossa tristeza. Sem eles, sem vida; com eles, com antimicrobianos: briga de gigantes na vida microscópica.

No século passado, a descoberta de substâncias antimicrobianas revolucionou a saúde pública mundial, evitou mortes, diminuiu infecções e contaminações oriundas do meio ambiente, alimentos, medicamentos e cosméticos. A indústria cosmética, preocupada com a possibilidade de fornecer produtos contaminados ao usuário, se rendeu aos conservantes (AHEARN; WILSON, 1976; ASHOUR; HEFNAI, 1987; BRUCH, 1972).

Os índices de contaminações microbianas em produtos farmacêuticos e cosméticos caíram drasticamente; no entanto, os índices de sensibilizações e reações alérgicas provocadas pelos produtos cresceram, em virtude da incorporação de substância com finalidade de garantir a qualidade do produto e segurança do usuário, o conservante.

De acordo com Giovanni et al. (2006), a indústria cosmética utiliza cerca de 13.000 ingredientes, que correspondem a mais de 30.000 diferentes denominações comerciais, o que gerou receita de 55,64 milhões de euros, em 2003. Recentemente, outro importante aspecto tem sido considerado: o uso dos produtos cosméticos pode estar associado a reações adversas. Entre as reações adversas a cosméticos, as de

aplicação tópica estão relacionadas à irritabilidade, coceiras, dermatites, entre outras, enquanto a ação sistêmica pode desencadear dor de cabeça, náusea, tontura, dispnéia e vômitos. Os efeitos adversos observados foram tabulados de acordo com a classificação de um total de 18 produtos. Dos 1037 casos avaliados, cremes, emulsões e óleos para a pele representam 23,6% dos episódios de reações adversas. Ainda em relação ao assunto, a literatura é bastante rica e citada freqüentemente conforme atestam entre outros tantos, os trabalhos de Berne et al. (1996), Meloni e Berardesca (2001), Sosted et al. (2002), Tissier e Lepagnol (2002), Darbre (2003), Mehta e Reddy (2003), Lindberg et al. (2004), Darbre et al. (2004), Orton e Wilkinson (2004) e Schnuch et al. (2004).

Frente a este impasse e a necessidade de busca de novos conservantes que pudessem somar àqueles recomendados na *23rd Commission Directive of September 3* e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, citados na Resolução 79, de 28 de agosto de 2000, pesquisadores têm buscado descobrir outras substâncias com atividade antimicrobiana, sem causar sensibilizações no usuário, sejam extraídas de ativos vegetais ou de outras fontes, como do homem e dos animais (GERBERICK et al., 2004; MANOU et al., 1998).

Durante a fase inicial da pesquisa, visando definir substância dotada de atividade antimicrobiana, a lactoferrina bovina foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho, pois, segundo Jones et al. (1994) e Harmsen et al. (1995) sua atividade inibitória é 2,5 vezes maior do que a humana. Para tanto, realizamos o presente estudo para verificar se sua atividade *in vitro* seria eficiente para utilizá-la como conservante em preparações cosméticas e farmacêuticas.

A lactoferrina, descoberta em 1939, vem ganhando notoriedade nas pesquisas, pois investigações têm descrito sua atividade *in vitro* frente a diversos microrganismos e, segundo Leppälä et al. (1999) e Ye et al. (2000), a mesma poderia ter aplicação na indústria cosmética e alimentícia, como um conservante "natural".

A fim de se observar possíveis alterações na atividade da lactoferrina como agente antimicrobiano, três formulações farmacêuticas semi-sólidas, de uso tópico, foram estudadas: creme, gel e gel-creme. A definição das formulações foi baseada nas concentrações da água e substâncias graxas, nos polímeros natural modificado e sintético e no caráter iônico e não iônico.

Segundo Brannan (1997), a composição da formulação exerce grande influência na sua estabilidade microbiológica. Diferentes componentes podem potencializar ou diminuir a ação do conservante ou sistema conservante. Portanto, as formulações semi-sólidas estudadas foram preparadas com componentes ainda muito utilizados e sem adição de ativo cosmético, pois a escolha de outras substâncias poderia interagir com a lactoferrina. Esta interação, entre a lactoferrina e substâncias rotineiramente utilizadas no preparo de formulações farmacêuticas e cosméticas, poderia dificultar a interpretação dos resultados, vez que ainda não foi referida na literatura.

As concentrações dos componentes da formulação foram avaliadas em função de testes preliminares, buscando formulações estáveis e com sensorial agradável, permitindo uma adequada espalhabilidade.

A incorporação da lactoferrina foi realizada a 30°C, para evitar sua possível desnaturação, o que poderia alterar sua atividade, conforme descrito pelos autores McCann (2003) ao comprovar que, o seu respectivo hidrolisado, a lactoferricina, não possuía a mesma ação contra poliovírus; van der Strate et al. (2001) comprovaram sua menor atividade, sugerindo que a conformação estrutural é importante, enquanto que Nielsen et al. (2004) observaram a interferência do aquecimento na atividade antioxidante da mesma.

As características macroscópicas das formulações, cor e odor, não foram alteradas com a incorporação da lactoferrina, o que já era esperado, pois a mesma não apresentava odor perceptível e, sua coloração rosa clara, não foi suficiente para provocar alteração, a menos que alguma interação entre os componentes da formulação ocorresse.

Após a incorporação, sem alteração das características macroscópicas, a avaliação preliminar da estabilidade foi realizada, por centrifugação. As formulações apresentaram-se estáveis, possibilitando a continuidade da pesquisa; caso contrário, sua utilização como conservante, inviabilizaria, de imediato, o prosseguimento dos trabalhos. A ausência de alterações no aspecto macroscópico após centrifugação é um bom indicador da estabilidade destes sistemas, uma vez que este método evidencia problemas de estabilidade de emulsões como cremeação, coalescência e separação de fases.

Em seguida, os demais estudos de estabilidade foram realizados e através de análise estatística, observou-se que pH, densidade e consistência de todas as formulações não apresentaram diferenças significativas, com a incorporação das diferentes concentrações de lactoferrina, nas três temperaturas avaliadas.

A análise da estabilidade física, através de estudos reológicos também é importante, pois, segundo Almeida e Bahia (2003), cada categoria de formulação deve apresentar comportamento reológico adequado a sua aplicação. Todas as formulações estudadas neste trabalho apresentaram comportamento pseudoplástico, caracterizado pela diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da velocidade de deformação.

Todas as formulações mantiveram-se estáveis ao longo do tempo estudado, e os valores das viscosidades, nas diferentes concentrações de lactoferrina, não apresentaram alterações significativas intra-grupos (ambiente, 40 e 4°C). No entanto, ao se compararem as viscosidades, nas condições de armazenagem em estufa e geladeira, notadamente, nos cremes não-iônico e aniônico, na presença de 2,0 e 3,0mg/g de lactoferrina, foram observadas oscilações significativas nos resultados, provavelmente em função das temperaturas e não da lactoferrina, pois, segundo Shaw (1970) e Stern, Valentová e Pokorny (2002), a viscosidade é dependente da temperatura.

Tixotropia é entendida como diminuição da viscosidade dependente do tempo e é representada, quantitativamente, pela área de histerese formada entre as curvas ascendente e descendente do reograma (ALMEIDA; BAHIA, 2003; SHAW, 1970). Os cremes não-iônico e aniônico, em temperatura ambiente (25°C), apresentaram-se tixotrópicos e sem alterações significativas na área de histerese, comparando-se controles e demais concentrações da lactoferrina. Entretanto, as áreas de histerese, nas demais condições de armazenamento apresentaram oscilações significativas, quando comparadas entre-grupos. As formulações do gel de hidroxietilcelulose e gel-creme, neste trabalho, podem ser consideradas sistemas não tixotrópicos, pois suas respectivas áreas de histerese foram muito pequenas e, se comparadas as concentrações de lactoferrina, bem como condições de estocagem, não foram observadas alterações significativas ao longo do tempo de estudo.

A contagem de microrganismos viáveis em produtos farmacêuticos e cosméticos necessita de completa neutralização da substância ou substâncias presentes que impeçam ou prejudiquem o crescimento dos microrganismos (CURRY, 1993; GUIA..., 1998; ORTH, 1993). Os conservantes, na sua maioria, podem ser quimicamente neutralizados, no momento da análise, mediante adição ao diluente ou nos meios de cultura, dos neutralizantes, ou fisicamente, através de diluições sucessivas (BRANNAN, 1997). A inativação da lactoferrina foi realizada por meio de diluições sucessivas, uma vez que não foi encontrado descrito na literatura, método de neutralização química.

O Teste de Eficácia Conservante está descrito em diversos compêndios oficiais; neste trabalho, optou-se pelo método tradicional modificado, com análises nos tempos 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias, possibilitando a elaboração da curva de sobreviventes e calcular, se possível, o valor D (CURRY, 1993; GUIA..., 1998; ORTH, 1993; USP..., 1990).

O Teste de Eficácia Conservante foi realizado também em formulações controle, sem a presença de lactoferrina, uma vez que outros componentes ou as próprias, poderiam prejudicar a sobrevivência dos microrganismos, levando a erros na interpretação dos resultados, atribuindo-os equivocadamente à substância em estudo.

Para facilitar o entendimento da discussão, os resultados estão agrupados por microrganismo, o que possibilitou discutir as diferenças e semelhanças encontradas, uma vez que o delineamento proposto envolveu quatro formulações, três concentrações da lactoferrina e controle, cinco microrganismos e doze tempos.

A análise microbiológica dos resultados mostrou redução, em média, de 2 log de UFC/g, em 2h, o que não pode ser atribuído à presença da lactoferrina, porque a mesma não ocorreu somente na sua presença, mas também nas formulações controle, à exceção de *C. albicans*, no creme não-iônico. Este resultado sugere que os microrganismos passaram por uma situação de estresse ao serem introduzidos nas formulações, e não puderam ser recuperados no método de contagem em placa, uma vez que as metodologias para Teste de Eficácia Conservante não preconizam o enriquecimento da amostra para recuperação dos mesmos. Segundo Brannan (1997), esta passagem pelo enriquecimento não garante a recuperação dos microrganismos injuriados, pois o tempo de contato entre célula microbiana e caldo de enriquecimento poderia não ser suficiente para a necessária recuperação.

A atividade antimicrobiana da lactoferrina frente a *Candida albicans* foi observada no creme não-iônico e gel. A presença das diferentes concentrações da lactoferrina, no creme não-iônico, alterou o perfil de sobrevivência do fungo leveduriforme, em comparação com a formulação controle que, ao longo dos tempos de análise, não apresentou alteração significativa no número de UFC/g. No entanto, nota-se que, a partir de 48h, este número elevou-se, permanecendo estável nos tempos 21 e 28d.

O crescimento fúngico, no creme não-iônico, não foi observado a partir dos tempos 12h (1,0mg/g) e 6h (2,0 e 3,0mg/g). O controle apresentou média de 5,93 UFC/g e, as demais, 1,18; 0,82 e 0,80, respectivamente, para 1,0; 2,0 e 3,0mg/g de lactoferrina, mostrando comportamento dose-dependente, corroborando com resultados de Xu et al. (1999), que afirmaram ser a atividade da apo-lactoferrina dose-dependente, mas não tempo dependente.

No gel de hidroxietilcelulose, a partir de 12h, não foram observados, em todas as concentrações de lactoferrina, microrganismos sobreviventes, à exceção da formulação controle, que apresentou número de sobreviventes estável a partir de 2h. A análise das diferentes concentrações de lactoferrina, em função da média do log de UFC/g, permitiu observar que não ocorreram diferenças significativas entre elas, não sendo observado comportamento dose-dependente. Estes resultados ratificam estudos de Andersson et al. (2000) que demonstraram a grande inibição do crescimento da levedura frente a concentrações de lactoferrina maiores que 15µg/mL.

Na formulação do creme aniônico, o número de sobreviventes, nas diferentes concentrações de lactoferrina, foi maior do que na formulação controle, onde, na concentração 3,0mg/g, foi observada maior média do log de UFC/g, ao longo do período de análise. No gel-creme, em todas as concentrações, a *Candida albicans* apresentou padrões de sobrevivências semelhantes.

A ineficácia da lactoferrina frente a *C. albicans*, nas formulações do creme aniônico e gel-creme, pode ter sido provocada pela interação eletrostática entre a proteína carregada positivamente e a carga aniônica das duas formulações, diminuindo ou impedindo a sua interação com o microrganismo (NABULSI; HOLLEY, 2005; VIEJO-DÍAZ et al., 2005).

Além da menor atividade observada e, segundo Schaller et al. (2005), a *C. albicans*, através de sua ação proteolítica, pode ter utilizado a proteína como única fonte de nitrogênio, uma vez que a atividade *in vitro* também tem sido encontrada. Para desempenhá-la, a proteinase aspártica secretada (SAP), especialmente a SAP2, que demonstra maior atividade em pH próximo à neutralidade, pode ter hidrolisado a lactoferrina, bem como ter alterado seu próprio modo de ação durante tratamentos com antifúngicos. Niimi et al. (1997) citaram a N-acetilglucosaminidase como responsável pela quebra da glicoproteína, fornecendo moléculas de carbono como nutrientes.

A incorporação da lactoferrina, em todas as formulações e concentrações estudadas, não alterou significativamente o perfil de sobrevivência do *Aspergillus niger*.

Entretanto, é importante notar os aumentos de sobreviventes ocorridos em 21d e 28d, nas concentrações 1,0 e 3,0mg/g, para creme aniônico e gel-creme, respectivamente. De fato, poucos estudos até o momento, falam a respeito da atividade antimicrobiana da lactoferrina frente a fungos filamentosos. Embora não tenha havido alterações significativas no log de UFC/g, em função da concentração de lactoferrina, a sua presença pode ter sido útil como fonte nutricional, pois para se desenvolverem, os fungos necessitam de peptídeos e carboidratos (CALVO, 2002). No entanto, Yamauchi et al. (2000a), em estudo duplo-cego, observaram melhora do quadro clínico no tratamento de *tinea pedis*, utilizando, via oral, 600 ou 2000mg/dia de lactoferrina, durante 8 semanas, não tendo sido notadas diferenças dose-dependentes, entre os dois grupos.

O comportamento do *Staphylococcus aureus* foi considerado instável, nas formulações controle, pois seu crescimento não foi observado em todos os tempos de análise. No creme não-iônico, o crescimento foi notado até 14d, nas três concentrações; na formulação controle, o declínio da população foi observado até 48h e, a partir de 72h, o crescimento não mais foi observado. Por outro lado, o perfil de sobrevivência foi semelhante nas três concentrações de lactoferrina, com médias do log de UFC/g de 4,28; 4,29 e 4,22 para 1,0; 2,0 e 3,0mg/g, respectivamente, e 2,93 para a formulação controle. Importante notar que, as médias do log de UFC/g das formulações com lactoferrina foram maiores, em relação ao controle.

Na formulação controle do gel de hidroxietilcelulose, o crescimento de *S. aureus*, foi observado até 24h; após este período, não cresceu mais. A formulação contendo 1,0mg/g apresentou sobreviventes até 4h; nas demais, o crescimento foi observado até 2h. No gel-creme, os comportamentos da bactéria, nas diversas formulações, foram semelhantes até 48h; após este período, os perfis de sobrevivência oscilaram ao longo do tempo de análise.

Esta situação pode ter sido provocada pela diminuição da viabilidade da bactéria, em função do tempo de armazenamento em geladeira, pois as formulações do creme não-iônico e gel foram as últimas analisadas, e as possíveis condições de menor

oferta de nutrientes, no caso do gel, e nutrientes não facilmente acessíveis no gel-creme, por se tratar de um polímero sintético.

Somente no creme aniônico, o microrganismo sobreviveu até o final do período de análise. Os comportamentos não apresentaram significativas alterações, à exceção do tempo 72h, nas concentrações 2,0 e 3,0mg/g, onde não houve crescimento. Nos demais períodos, as médias dos log de UFC/g foram 5,22; 5,14; 4,90 e 4,98, respectivamente, para controle, 1,0; 2,0 e 3,0mg/g de lactoferrina. Entretanto, foi possível notar que a formulação controle apresentou menores oscilações, ao longo do período.

Ao analisar todas as concentrações da lactoferrina no creme aniônico, à exceção do tempo 72h, contendo 2,0 e 3,0mg/g, não se observaram alterações significativas no perfil de sobrevivência do *S. aureus*. Resultado semelhante da ineficácia *in vitro* da lactoferrina, foi observado por Bhimani, Vendrov e Furmanski (1999), para verificar a atividade bactericida. Por outro lado, os mesmos autores, em estudos *in vivo*, utilizando ratos com infecções provocadas no fígado, demonstraram que a lactoferrina foi eficiente frente ao microrganismo, com atividade máxima em doses diárias de 1,0mg da apolactoferrina (17% de saturação de ferro), sendo dose-dependente.

A incorporação da lactoferrina nas demais formulações desafiadas com *S. aureus*, exceto o gel, aumentou o tempo de vida dos microrganismos, se comparado com a formulação controle, fato explicado por Bhimani, Vendrov e Furmanski (1999), que afirmaram ser a lactoferrina, saturada de ferro, um potencializador da virulência do microrganismo.

Embora a lactoferrina bovina seja capaz de inibir a produção de β -lactamase, o *S. aureus* possui diferentes mecanismos de resistência frente aos peptídeos antimicrobianos, tais como modificação ou bloqueio do ácido teicóico, alteração da membrana citoplasmática, produção de proteases, entre outros (SAMUELSEN et al. (2005).

Segundo Fedtke, Götz e Peschel (2004), os microrganismos são capazes de modificar sua superfície celular, a fim de reduzir sua carga negativa, adquirindo proteção contra substâncias antimicrobianas catiônicas. O ácido teicóico é composto por ribitol e/ou grupos glicerolfosfato, que conferem propriedades aniônicas à membrana celular; a incorporação da D-alanina introduz grupos amino carregados positivamente, levando a uma neutralização parcial desta membrana, dificultando, conseqüentemente, a interação eletrostática entre o microrganismo e a substância antimicrobiana.

O crescimento da *E. coli* foi observado até 12h, nas formulações controle, 1,0 e 2,0mg/g, do creme não-iônico; após este período, a formação de colônias, não foi mais visualizada, exceto na concentração 1,0mg/g, onde se verificou recuperação do microrganismo em 7, 14 e 21d, perdendo sua viabilidade em 28d. A *E. coli*, na presença de 3,0mg/g, não foi observada a partir de 6h. Embora o microrganismo não tenha se mantido viável, na formulação controle, a atividade da lactoferrina foi dose-dependente.

A incorporação de 1,0mg/g de lactoferrina, no creme aniônico, não interferiu no perfil de crescimento da bactéria, em relação ao controle, as quais apresentaram médias do log de UFC/g semelhantes. Por outro lado, as concentrações 3,0 e 2,0mg/g apresentaram maiores médias de sobreviventes, 5,34 e 4,45, respectivamente, quando comparadas ao controle e 1,0 mg/g.

No controle do gel de hidroxietilcelulose, a bactéria foi observada até 7d. Na formulação contendo 1,0mg/g, de 12h até 14d e 28d, não foram detectados crescimentos microbianos; em 21d, os microrganismos se recuperaram. As que continham 2,0 e 3,0mg/g de lactoferrina, se apresentaram com características semelhantes, pois a sobrevivência dos microrganismos persistiu somente até 24h, não sendo observada recuperação até o final do período.

Na formulação gel-creme, as concentrações 1,0 e 3,0mg/g de lactoferrina, apresentaram maiores médias do log de UFC/g, 5,16 e 5,44, respectivamente, sendo que, em 2,0mg/g, o microrganismo não foi visualizado em 7 e 14d.

Segundo Naidu et al. (1993), a lactoferrina apresenta diferentes capacidades de ligação com o microrganismo, e sua concentração é ponto crítico no efeito antibacteriano, quando estudada em meios de crescimento, pois concentrações ótimas de lactoferrina podem ou não apresentar atividade frente a várias espécies. O seu excesso no meio pode afetar o equilíbrio na interação receptor-proteína, reversível e de baixa afinidade, fato que pode explicar a recuperação do microrganismo nos diferentes tempos de análise. Por outro lado, Venkitanarayanan, Zhao e Doyle (1999) sugeriram que as presenças de cálcio e magnésio também podem diminuir sua eficácia.

Nas formulações do creme não-iônico, aniônico e gel-creme, os perfis de sobrevivência da *P. aeruginosa* foram alterados na presença de lactoferrina, pois, quanto maior a concentração, maior a média do log de UFC/g de microrganismos.

A *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que vive ubiqüamente, sendo considerado um grande problema da indústria farmacêutica e cosmética por se tratar de um microrganismo de veiculação hídrica com facilidade de adaptação a ambientes estressantes (GOLDBERG; PIER, 1996; OLDAK; TRAFNY, 2005). Esta adaptação sugere que os mesmos têm estratégias moduladoras do metabolismo, permitindo sobrevivência em condições desfavoráveis (ORTH, 1993).

Na presença de lactoferrina, foi observado que a *P. aeruginosa* apresentou, como característica comum, pigmentação esverdeada (pioverdina) mais acentuada e diminuição no tamanho da colônia, nos cremes não-iônico, aniônico e gel-creme, o que segundo Orth (1993), pode ser ocasionada pela privação de nutrientes.

A maior produção de pioverdina, sintetizada por alguns microrganismos, pode estar relacionada à privação do ferro, considerada como um potente sideróforo, transportador de baixo peso molecular (BRAUN; KILLMANN, 1999; MEYER, 2000). A lactoferrina, na captação dos íons férricos disponíveis, pode ter estimulado a sua produção, necessário à sobrevivência do microrganismo, resultante da privação de ferro (ORTH, 1993).

Entretanto, notou-se que, houve um acréscimo na média do log de UFC/g de sobreviventes, por volta de 14d, 7d e 24h, no creme não-iônico, iônico e gel-creme, respectivamente. Tal situação, pode ter sido provocada pela ligação do ferro à lactoferrina, inicialmente quelado, bem como retirado dela própria, pois a mesma apresentou, segundo o fabricante, um índice de saturação, na ordem de 0,115mg/g, justificando o resultado de maior concentração de lactoferrina, maior média do log de UFC/g de sobreviventes, confirmando os resultados obtidos por Ward, Cunningham e Conneely (1997).

Entretanto, no gel de hidroxietilcelulose, diferentemente do ocorrido nas outras formulações, a presença da lactoferrina proporcionou diminuição dose-dependente nas médias dos log de UFC/g de sobreviventes. Este resultado pode ter ocorrido devido a menor disponibilidade de nutrientes, provocando danos na célula microbiana suficientes para impedirem o rearranjo do seu metabolismo, favorecendo a atividade antimicrobiana da lactoferrina.

À exceção da *C. albicans*, nas formulações do creme não-iônico e gel de hidroxietilcelulose, a lactoferrina bovina, utilizada neste trabalho, incorporada com finalidade conservante nas formulações semi-sólidas estudadas não se mostrou eficiente para cumprir com as exigências das normas oficiais existentes para os critérios de aceitação, muito embora outras condições experimentais devam ser estudadas, pois existem diversas situações que modificam sua eficiência, segundo dados da literatura, alguns a seguir apresentados.

A lactoferrina bovina utilizada neste trabalho, de acordo com laudo fornecido por Agri-Cell Company, apresentava 0,115mg/g de saturação de ferro e, segundo Bhirmani, Vendrov e Furmanski (1999); Clarke et al. (1999) e Tenovuo (2002), a saturação com este íon, pode diminuir sua atividade frente a diversos microrganismos.

De acordo com Vorland et al. (1999b) e Ye et al. (2000), a estabilidade de ligação com o íon é 300 vezes maior em pHs menores do que os utilizados nas formulações e, segundo Murdock e Matthews (2002), além do ferro, a presença de

cátions e osmolaridade dos meios de cultura podem interferir na atividade da lactoferrina.

Em função da diversidade científica e dos resultados observados neste trabalho, em estudos posteriores seria importante, além de avaliar a atividade antioxidante da lactoferrina, como sugerem Nielsen et al. (2004) e Ye e Singh (2005), analisar o sinergismo da mesma com outras substâncias antimicrobianas. Alkawash et al. (1999) observaram, *in vitro*, a diminuição da CIM (Concentração Inibitória Mínima) da doxiciclina após tratamento com lactoferrina. Leitch e Willcox (1999) observaram que a associação entre lactoferrina e lisozima foi importante, pois a primeira delas aumentou a permeabilidade da membrana celular, facilitando o acesso da lisozima no microrganismo. van der Strate et al. (2001) e Valenti et al. (2004) observaram o sinergismo entre a lactoferrina e antifúngicos tradicionais na inibição de *Candida* sp. Farnaud et al. (2004) utilizaram a atividade da permeabilização da membrana para aumentar a susceptibilidade dos microrganismos a antibióticos.

E finalmente, também avaliar o peptídeo lactoferricina como conservante em formulações semi-sólidas de uso tópico, pois, segundo Schibli, Hwang e Vogel (1999), é o maior responsável pela atividade da lactoferrina; Branen e Davidson (2000), afirmaram que o mesmo é 25 vezes mais efetivo. Aguilera et al. (1999), Branen e Davidson (2000), Haukland et al. (2001) e Chapple et al. (2004), propuseram, mediante estudos realizados, que a lactoferrina e a lactoferricina atuam, respectivamente, como bacteriostática e bactericida. Ainda, pensando em termos da relação estrutura-atividade, Sallmann et al. (1999), sugeriram que o tamanho da molécula da lactoferrina pode limitar a sua ligação à membrana externa dos microrganismos.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a lactoferrina bovina utilizada como conservante em formulações semi-sólidas para uso tópico, nas condições experimentais deste trabalho, permitiram inferir que:

7.1. A lactoferrina bovina não pode ser classificada como substância dotada de atividade conservante, pois não atendeu às exigências preconizadas em compêndios oficiais, frente aos microrganismos estudados.

7.2. A lactoferrina, embora não tenha atendido às exigências oficiais como conservante, mostrou-se efetiva frente à *Candida albicans*, nas formulações do creme não-iônico e gel de hidroxietilcelulose.

7.3. A lactoferrina não provocou alteração significativa nas estabilidades física e físico-química das formulações estudadas, resultado necessário para a busca de novos conservantes.

7.4. Finalmente, com os resultados obtidos no presente trabalho, seguramente, mantêm-se os caminhos para novas investigações científicas com a lactoferrina, especialmente aqueles visando a associações com outros conservantes, buscando sinergismo entre eles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AGUILERA, O. et al. Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes. **FEBS Letters**, v. 462, p. 273-277, 1999.
- AHEARN, D. G.; WILSON, L. A. Developments in industrial microbiology, v. 17, New York: Plenum Press, 1976. p. 23.
- ALKAWASH, M. et al. The effect of human lactoferrin on the MICs of doxycycline and rifampicin for *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 385-387, 1999.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmetics & Toiletries*, v. 15, n. 3, ed. port., p. 96-100, 2003.
- ANDERSSON, Y. et al. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. **Early Human Development**, v. 59, p. 95-105, 2000.
- ARNOLD, R. R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. **Infection and Immunity**, Jun., p. 893-898, 1980.
- ASHOUR, M. S. E.; HEFNAI, H. Microbial contamination of cosmetics and personal care items in Egypt. 1. Toothpaste and mouthwash. **Cosmetics & Toiletries**, v. 102, Dec., p. 61-68, 1987.
- AZUMA, M. et al. Antibacterial activity of multiple antigen peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. **J. Peptide Res.**, v. 54, p. 237-241, 1999.
- BAKER, E. N. et al. Three-dimensional structure of lactoferrin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 443, p. 1-14, 1998.
- BASKETTER, D. A. et al. Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides. **Contact Dermatitis**, v. 40, p. 150-154, 1999.
- BELLAMY, W. et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1121, p. 130-132, 1992.
- BERNE, B. et al. Adverse effects of cosmetics and toiletries reported to the Swedish Medical Products Agency 1989-1994. **Contact Dermatitis**, v. 34, n. 5, p. 359-362, 1996.

BHIMANI, R. S.; VENDROV, Y. and FURMANSKI, P. Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 135-144, 1999.

BRANEN J.; DAVIDSON, P. M. Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 233-237, 2000.

BRANNAN, D. K. (ed.). **Cosmetic microbiology**: a practical handbook. Washington: CRC Press, 1997. 323 p.

BRASIL. Resolução 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 setembro de 1999.

BRASIL. Resolução 79, de 28 de agosto de 2000. Estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, e outros com abrangência neste contexto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 agosto de 2000.

BRAUN, V.; KILLMANN, H. Bacterial solutions to the iron-supply problem. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, March, p. 104-109, 1999.

BROCK, J. Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? **Immunology Today**, v. 16, n. 9, p. 417-419, 1995.

BRUCH, C. W. objectionable microorganisms in nonsterile drugs and cosmetics. **Drug Cosmet. Ind.**, v. 111, n. 51, p. 146-151, 1972.

BURLIN, G. B. **Avaliação da eficácia e da estabilidade química de conservantes em uma formulação de gel hidrofílico contendo vitaminas A e E**. Ribeirão Preto, 2000. 95 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

CALVO, M. M.S. *In vitro* colonization of hydrophilic contact lenses by *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 6-9, 2002.

CHACRA, N. A. et al. Avaliação de sistema preservante por regressão linear. **Cosmetics & Toiletries**, v. 11, n. 2, ed. port., p. 44-48, 1999.

CHANTAYSAKORN, P. and RICHTER, R. L. Antimicrobial properties of pepsin-digested lactoferrin added to carrot juice and filtrates of carrot juice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 376-380, 2000.

CHAPPLE, D. S. et al. Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2190-2198, 2004.

CLARKE, J. et al. Evaluation of bovine lactoferrin as a topical therapy for chemotherapy-induced mucositis in the golden Syrian hamster. **Oral Oncology**, v. 35, p. 197-202, 1999.

COMMISSION Directive of September 3, EU Annex VI, Part 1, 1998, 36 p.

COSMETIC Ingredient Review Panel. Final report on the safety assessment for formaldehyde. Washington: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 1983.

CTFA survey: test methods companies use. **Cosmetics & Toiletries**, v. 105, Mar., p. 79-82, 1990.

CURRY, J. Thoughts on preservation testing of water-based products. **Cosmetics & Toiletries**, v. 102, Dec., p. 93-95, 1987.

CURRY, A. S. (ed.). **CTFA microbiology guidelines**. Washington, 1993.

DAVIS, H. M. Analysis of creams and lotions. In: SENZEL, A.J. (ed.). **Newburger's manual of cosmetic analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1977, cap. 4, p. 32.

DARBRE, P. D. Underarm cosmetics and breast cancer. **J. Appl. Toxicol.**, v. 23, p. 89-95, 2003.

DARBRE, P. D. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **J. Appl. Toxicol.**, v. 24, p. 5-13, 2004.

EIGENER, U. Application of a microbiological quality management (MQM) for cosmetics. **Cosmetics Technology**, v. 131, p. 2-11, 2005.

ELLISON III, R. T.; GIEHL, T. J. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **J. Clin. Invest.**, v. 88, Oct., p. 1080-1091, 1991.

EUROPEAN Economic Council. European Economic Community Directive of May 1982. Official J. Eur. Comm., 1982.

FARNAUD, S. et al. Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, p. 193-199, 2004.

FARRINGTON, J. K. et al. Ability of laboratory methods to predict in-use efficacy of antimicrobial preservatives in an experimental cosmetic. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 12, p. 4553-4558, 1994.

FAVERO, M. S. Products containing biocides: perceptions and realities. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 72S-77S, 2002.

FEDTKE, I.; GÖTZ, F.; PESCHEL, A. Bacterial evasion of innate host defenses - the *Staphylococcus aureus* lesson. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 294, p. 189-194, 2004.

FLYVHOLM, M. A.; MENNÉ, T. Allergic contact dermatitis from formaldehyde. A case study focusing on some sources of formaldehyde exposure. *Contact Dermatitis*, v. 27, p. 27-36, 1992.

FLYVHOLM, M. A. Preservatives in registered chemical products. *Contact Dermatitis*, v. 53, p. 27-32, 2005.

FRAGA, D. F. T. Preservação de cosméticos. *Cosmetics & Toiletries*, v. 11, n. 2, ed. port., p. 49-53, 1999.

FRANSWAY, A. F. The problem of preservation in the 1990s. Agents with preservative function independent of formaldehyde release. *Am. J. Contact Dermatology*, v. 2, p. 145-174, 1991.

GERBERICK, G. F. et al. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis*, v. 50, p. 274-288, 2004.

GIOVANNI, C. D. et al. Cosmetovigilance survey: are cosmetics considered safe by consumers? *Pharmacological Research*, v. 53, p. 16-21, 2006.

GOLDBERG, J. B.; PIER, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends in Microbiology*, v. 4, n. 12, Dec., p. 490-494, 1996.

GUIA de Estabilidade de Produtos Cosméticos. *Séries Temáticas - ANVISA*, v. 1, maio, 2004, 47 p.

GUIA ABC: controle microbiológico na indústria de produtos de H.P., cosméticos e perfumes. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 1998.

HARMSSEN, M. C. et al. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus

replication *in vitro*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, August, p. 380-388, 1995.

HAUKLAND, H. H. et al. The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. **FEBS Letters**, v. 508, p. 389-393, 2001.

HENDRIXSON, D. R. et al. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 607-617, 2003.

HERBERT, C.; RIETSCHER, R. L. Formaldehyde and formaldehyde releasers: how much avoidance of cross-reacting agents is required? **Contact Dermatitis**, v. 50, p. 371-373, 2004.

HOJEROVÁ, J. et al. Antimicrobial efficacy of some interesting preservatives for cosmetics. **International Journal for Applied Science**. Augsburg, v. 127, p. 9-15, Aug. 2001.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.**, v. 143, n. 12, p. 35-38, 72, 1988.

_____. Stability testing of emulsions, I. **Drug Cosmet. Ind.**, v. 142, n. 1, p. 27-28,30, 1993a.

_____. Stability testing of emulsions, II. **Drug Cosmet. Ind.**, v. 143, n. 2, p. 38,40, 42-43, 72 1993b.

INTROINI, C. Teoria e pratica del challenge test. **Boll. Chim. Farm.**, v. 124, p. 365-381, 1985.

IYER, S.; LÖNNERDAL, B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, p. 232-241, 1993.

JONES, E. M. et al. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 208-214, 1994.

KANYSHKOVA, T. et al. Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. **FEBS Letters**, v. 451, p. 235-237, May. 1999.

KANYSHKOVA, T. et al. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 3353-3361, 2003.

KIMURA, M. et al. Antimicrobial peptide of Korean native goat lactoferrin: identification of the part essential for this activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 268, p. 333-336, 2000.

KUIPERS, M. E. et al. Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Nov., p. 2635-2641, 1999.

LEITCH, E. C.; WILLCOX, M. D. P. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 867-871, 1999.

LEPPÄLÄ, A. P. et al. The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 540-545, 1999.

LEVAY, P. F.; VILJOEN, M. Lactoferrin: a general review. **Haematologica**, v. 80, p. 252-267, 1995.

LILLO, A.; CERNUDA, R.; BROCK, J. H. Interaction of lactoferrin with *Micrococcus* spp. and its role in antimicrobial activity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 443, p. 221-228, 1998.

LINDBERG, M. et al. Are adverse skin reactions to cosmetics underestimated in the clinical assessment of contact dermatitis? A prospective study among 1075 patients attending Swedish patch test clinics. **Acta Derm. Venerereol.**, v. 84, p. 291-295, 2004.

LÖNNERDAL, B.; IYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 15, p. 93-110, 1995.

MANN, D.; ROMM, E.; MIGLIORINI, M. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 38, p. 23661-23667, 1994.

MANOU, I. et al. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in tropically applied formulations under a challenge test. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 368-376, 1998.

MARKOWETZ, A. New aspects in the preservation of cosmetics. **Cosmetics**, v. 128, Jahr., p. 20-24, 2002.

MARKS, J. G. et al. North American contact dermatitis group patch-test results, 1996-1998. **Arch. Dermatol.**, v. 136, p. 272-273, 2000.

MARKS, J. G. et al. North american contact dermatitis group patch-test results, 1998-2000. **Am. J. Contact Dermatitis**, v. 14, p. 59-62, 2003.

MARTÍNEZ-GOMIS, J. et al. Effects of topical application of free and liposome-encapsulated lactoferrin and lactoperoxidase on oral microbiota and dental caries em rats. **Arch. Oral Biol.**, n.44, p.901-906, 1999.

McCANN, K. B. et al. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1026-1033, 2003.

MEHTA, S. S.; REDDY, B. S. Cosmetic dermatitis - current perspectives. **Int. J. Dermatol.**, v. 42, n. 7, p. 533-542, 2003.

MELONI, M.; BERARDESCA, E. The impact of COLIPA guidelines for assessment of skin compatibility on the cosmetic products. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 2, p. 65-68, 2001.

MENNÉ, T. Allergy to cosmetics and perfumes: will European legislation improve consumer safety? **Revue Française D'Allergologie et D'Immunologie Clinique**, v. 43, p. 227-228, 2003.

MEYER, J. M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. **Arch. Microbiol.**, v. 174, p. 135-142, 2000.

MORIISHI, K. et al. Inhibition of listeriolysin o-induced hemolysis by bovine lactoferrin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 22, Nov., p. 1167-1172, 1999.

MURDOCK, C. A.; MATTHEWS, K. R. Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 850-856, 2002.

NABULSI, A. A. A.; HOLLEY, R. A. Effect of bovine lactoferrin against *Carnobacterium viridans*. **Food Microbiology**, v. 22, p. 179-187, 2005.

NAIDU, S. S. et al. Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Feb., p. 240-245, 1993.

NIELSEN, N. et al. Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 7690-7699, 2004.

NIIMI, K. et al. Regulation of N-acetylglucosaminidase production in *Candida albicans*. **Arch. Microbiol.**, v. 168, p. 464-472, 1997.

NIKAWA, H. et al. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Archs Oral Biol.**, v. 38, n. 12, p. 1057-1063, 1993.

NIKAWA, H. et al. The effect of antifungal agents on the in vitro susceptibility of *Candida albicans* to apo-lactoferrin. **Archs Oral Biol.**, v. 39, n. 10, p. 921-923, 1994.

OHASHI, A. et al. New functions of lactoferrin and β -casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, p. 98-103, 2003.

OLDAK, E.; TRAFNY, E. A. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Aug., p. 3281-3288, 2005.

OLIVEIRA, I. R. et al. Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 03, p. 29-33, 2001.

ORTH, D. . **Handbook of cosmetic microbiology**. New York, Marcel Dekker, 1993.

ORTH, D. S.; STEINBERG, D. C. Fator segurança no teste de eficácia de preservante. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 15, n. 3, ed. port., mai./jun., p. 76-81, 2003.

ORTON, D. I.; WILKINSON, J. D. Cosmetic allergy: incidence, diagnosis, and management. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 5, n. 5, p. 327-337, 2004.

PEDERSEN, L. K. et al. Methylidibromoglutaronitrile in leave-on products elicits contact allergy at low concentration. **British Journal of Dermatology**, v. 151, p. 817-822, 2004.

PETSCHOW, B. W.; TALBOTT, R. D.; BATEMA, R. P. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium spp in vitro* is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 541-549, 1999.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Eficácia de conservantes. In: _____. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2003. cap. 7, p. 219-258.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**, 4. ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbekian, 1991.

RIBEIRO, A. M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 10, São Paulo, 1996. Anais. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia, 1996. p. 349-375.

RICCI, H. P. et al. En busca de una especificacion para dentifricios. Centro Nacional de Materiales Dentales. **Boletim Anual**, n. 5, ano V, Caracas, Venezuela, Dez., 1975.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics & Toiletries**, v. 8, n. 5, ed. port., p. 47-53. 1996.

RUSSELL, A D. Challenge testing: principles and practice. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 25, p. 147-153, 2003.

SALLMANN, F. R. et al. Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. **The Journal of biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16107-16114, 1999.

SAMUELSEN, O. et al. Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v. 579, p. 3421-3426, 2005.

SASSEVILLE, D. Hypersensitivity to preservatives. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 251-263, 2004.

SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365-377, 2005.

SCHNUCH, A. et al. Contact allergy to fragrances: frequencies of sensitization from 1996 to 2002. Results of the IVDK. **Contact Dermatitis**, v. 50, p. 65-76, 2004.

SEO, S. B. et al. Development of a natural preservative system using the mixture of chitosan-*Inula helenium* L. extract. **International Journal of Cosmetics Science**, v. 24, p. 195-206, 2002.

SHARMA, A. K. et al. Three-dimensional structure of mare diferric lactoferrin at 2.6 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 289, p. 303-317, 1998.

SHARMA, A. K. et al. Structure of mare apolactoferrin: the N and C lobes are in the closed form. **Acta Crystallographica**, D55, p. 1152-1157, 1999.

SHAW, D. J. Reologia. In: _____. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. 1970. p. 143-157.

SCHIBLI, D. J.; HWANG, P. M.; VOGEL, H. J. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. **FEBS Letters**, v. 446, p. 213-217, 1999.

SINGLETON, P.; SAINSBURY, D. **Dictionary of microbiology and molecular biology**. 2. ed. Wiley, 1996.

SONI, M. G. et al. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1335-1373, 2002.

SOSTED, H. et al. 55 cases of allergic reactions to hair dye: a descriptive, consumer complaint-based study. **Contact Dermatitis**, v. 47, p. 299-303, 2002.

STALLMANN, H. P. et al. Histatin and lactoferrin derived peptides: antimicrobial properties and effects on mammalian cells. **Peptides**, 2005. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 25/11/2005.

STERN, P.; VALENTOVÁ, H.; POKORNY, J. Rheological and textural characteristics of skin lotions. **International Journal for Applied Science**. Augsburg, v. 128, p. 34-37, Apr. 2002.

STEVANATO, M. C.B. **Índice de contaminação bacteriana e fúngica e alguns parâmetros físicos e físico-químicos de cremes adquiridos em farmácias de manipulação de Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto, 1999, 130 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SUZUKI, Y. A. et al. Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutr.**, v. 36, Feb., p. 190-199, 2003.

TANIDA, T. et al. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, p. 586-594, 2003.

TENOVUO, J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. **Oral Diseases**, v. 8, p. 23-29, 2002.

TISSIER, M. H.; LEPAGNOL, F. Cosmetovigilance: a French pharmacovigilance system for cosmetics developed by the French health products safety agency. A proposal for the future. **Therapie**, v. 57, n. 3, p. 273-282, 2002.

TOMITA, M. et al. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 4137-4142, 1991.

TORO, J. R.; ENGASSER, P. G.; MAIBACH, H. Cosmetic reactions. In: MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. (ed.). **Dermatotoxicology**. 5 ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap. 47, p. 607-642.

ULVATNE, H. et al. Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. **FEBS Letters**, v. 492, p. 62-65, 2001.

UNITED States Pharmacopeia. XXIII/NF - XVII. ed. p. 1488-1492, 1990.

VALENTI, P. et al. Lactoferrin functions: current status and perspectives. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, supplement 2, July, p. 127-129, 2004.

van der STRATE, B. W. A. et al. Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Research**, v. 52, p. 225-239, 2001.

VENKITANARAYANAN, K. S.; ZHAO, T. and DOYLE, M. P. Antibacterial effect of lactoferricin B on *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p. 747-759, 1999.

VIEJO-DÍAZ, M. et al. Different anti-*Candida* activities of two human lactoferrin-derived peptides, Lfpep and kaliocon-1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, July, p. 2583-2588, 2005.

VORLAND, L. H. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. **APMIS**, v. 107, p. 971-981, 1999.

VORLAND, L. H. et al. Initial binding sites of antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 31, p. 467-473, 1999a.

VORLAND, L.H. et al. Antibacterial effects of lactoferricin B. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 31, p. 179-184, 1999b.

XU, Y. Y. et al. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to lactoferrin. **Medical Mycology**, v. 37, p. 35-41, 1999.

WARD, P. P.; CUNNINGHAM, G. A.; CONNEELY, O. M. Commercial production of lactoferrin, a multifunctional iron-binding glycoprotein. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 14, Apr., p. 303-319, 1997.

WILKINSON, J. D. et al. Monitoring levels of preservative sensitivity in Europe: a 10-year overview (1991-2000). **Contact Dermatitis**, v. 46, p. 207-210, 2002.

WITTERN, A. et al. Stability testing of cosmetic emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v. 100, n. 10, p. 33-39, 1985.

YAMAUCHI, K. et al. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. **Infection and Immunity**, Feb., p. 719-728, 1993.

YAMAUCHI, K. et al. Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of *tinea pedis*. A placebo-controlled, double-blind study. **Mycoses**, v. 43, p. 197-200, 2000a.

YAMAUCHI, K. et al. 13-week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 503-512, 2000b.

YE, X. Y. et al. Ribonuclease, cell-free translation-inhibitory and superoxide radical scavenging activities of the iron-binding protein lactoferrin from bovine milk. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 235-241, 2000.

YE, A.; SINGH, H. Adsorption behaviour of lactoferrin in oil-in-water emulsions as influenced by interactions with β -lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2005, disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21/11/2005.

ZACHARIAE, C. et al. Allergic contact dermatitis from methyldibromo glutaronitrile - clinical cases from 2003. **Contact Dermatitis**, v. 52, p. 6-8, 2005.

* De acordo com:

DIRETRIZES PARA APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÕES E TESES DA USP: DOCUMENTO ELETRÔNICO E IMPRESSO. São Paulo, 2004.