



## Conservação de formulação tópica utilizando micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*

Preservation of topical formulation using mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus*

E. C. Martelli<sup>1</sup>; J. C. Da Silva<sup>1</sup>; J. Vieira<sup>1</sup>; R. S. Marquezoni<sup>1</sup>; L. O. Fariña<sup>2</sup>; A. B. Cruz<sup>3</sup>; R. F. Gandra<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa, Ensino e Extensão – LACEPE/ Laboratório de Micologia/ Hospital Universitário do Oeste do Paraná - Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, 85806-470 Cascavel-PR, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, 85819-110, Cascavel-PR, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Ensino em Ciências da Saúde, Núcleo de Investigações Químico e Farmacêutica/Laboratório de pesquisa em microbiologia/Universidade do Vale do Itajaí – Univali, 88302-202, Itajaí-SC, Brasil

\*rinaldo.gandra@unioeste.br

(Recebido em 06 de abril de 2022; aceito em 01 de setembro de 2022)

Após relatos de reações adversas e desregulação endócrina causada por alguns conservantes como os parabens, amplamente utilizados em formulações tópicas e medicamentos, a indústria cosmética e farmacêutica enfrenta a falta considerável de agentes antimicrobianos com menor toxicidade, desencadeando o interesse na busca pelo desenvolvimento de novos sistemas conservantes seguros e eficazes. Substâncias naturais com amplo espectro de atividade antimicrobiana são alternativas interessantes para a pesquisa de novos conservantes. As micocinas são substâncias naturais produzidas por leveduras killer, que possuem potencial de inibir bactérias e fungos com amplo espectro de ação, baixa toxicidade e baixa probabilidade de indução de resistência microbiana. O objetivo deste trabalho foi de verificar a atividade conservante de micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* quando incorporadas em gel dermatológico. Realizaram-se ensaios de determinação de  $\beta$ -glucanases, ensaio de microdiluição, *Challenge Test* para avaliar a eficácia de ação conservante, análise de estabilidade e teste de irritabilidade de membrana. O sobrenadante WA92 apresentou atividade de  $\beta$ -glucanases de 3,80 U/mg e inibição frente a todos os microrganismos padrão testados em microdiluição. No *Challenge Test*, os critérios de eficácia conservante foram cumpridos para bactérias, fungo filamentosos e leveduriforme. Os resultados compreenderam uma formulação gel estável e não irritante utilizando micocinas como conservante em diferentes concentrações, a avaliação de estabilidade por meio de viscosidade, densidade e pH e estimativa da capacidade conservante das micocinas, incluindo comparações com conservantes comumente utilizados foram apresentados neste estudo.

Palavras-chave: antimicrobiano, *Challenge Test*, conservante natural.

After reports of adverse reactions and endocrine disruption caused by some preservatives such as parabens, widely used in topical formulations and medicines, the cosmetic and pharmaceutical industry faces a considerable lack of additives with less toxicity, triggering interest in the search for the development of new preservative systems safe and effective. Natural substances with a broad spectrum of antimicrobial activity are interesting alternatives for the research of new preservatives. Mycocins are natural substances produced by killer yeasts. They have the potential to inhibit bacteria, filamentous fungi and yeast with a broad spectrum of action, low toxicity and low probability of inducing microbial resistance. This study aimed to verify the preservative activity of mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus* when incorporated into dermatological gels, stability of mycocins in the formulation and membrane irritation potential.  $\beta$ -glucanases determination assays,  $\beta$ -glucanase assay, microdilution, Challenge Test to evaluate the effectiveness of preservative action, stability tests and membran irritability assay in organotypic model. The WA92 supernatant showed  $\beta$ -glucanase activity of 3.80 U/mg. In the microdilution assay, all standard microorganisms tested were sensitive to WA92 mycocins at their maximum concentration of 3.80 U/mg. In the Challenge Test, the preservative efficacy criteria were met for bacteria, filamentous fungus and yeast. The results comprised a stable and non-irritating gel formulation using mycocins as a preservative at different concentrations, evaluation of stability through viscosity, density and pH and estimation of the preservative capacity of mycocins including comparisons with commonly used preservatives were showed in this study.

Keywords: antimicrobial, Challenge Test, natural preservative.

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos cosméticos com água em sua composição são os mais propensos à contaminação microbiana. As alternativas de boas práticas de manipulação e controle microbiológico de matérias-primas não são suficientes para impedir o desenvolvimento de microrganismos na formulação. Os microrganismos contaminantes mais frequentes em cosméticos compreendem a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, como também outras espécies de bactérias, fungos e leveduras. Por esse motivo, a preservação do produto é garantida a partir de estratégias de adição de componentes antimicrobianos sintéticos ou naturais e até mesmo multifuncionais [1].

Conservantes ou sistemas conservantes são agentes antimicrobianos adicionados em formulações não-estéreis com o objetivo de impedir o desenvolvimento e multiplicação de microrganismos infecciosos que podem colocar em risco a integridade da saúde humana e também a estabilidade da formulação [2, 3]. Os conservantes são utilizados em concentrações mínimas, a fim de minimizar os possíveis efeitos de toxicidade ao organismo humano. Essa pequena quantidade pode ser responsável pela indução da resistência, levando a uma tolerância dos microrganismos contaminantes de produtos cosméticos [1]; além disso, são responsáveis por desencadear reações alérgicas nos consumidores [3].

Parabenos são uma das classes de conservantes de maior atribuição industrial [4]. No início de sua utilização, foram declarados seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA), no entanto, com o decorrer dos anos, problemas de alta citotoxicidade foram expostos [5], como atividade de desregulação endócrina em testes *in vitro* e *in vivo* [6], bem como a presença da forma não metabolizada de parabenos no tecido respiratório, sugerindo que estes poderiam induzir o desenvolvimento de câncer de mama [7]. Assim, em 2010, a *Scientific Society on Consumer Safety* declarou novos limites de concentração de propilparabeno e butilparabeno que não deveriam exceder 0,14%, pois considerou que estes teriam um “baixo potencial de modificação endócrina” [1, 8].

As micocinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, produzidos por alguns tipos de leveduras. Demonstram amplo espectro de inibição frente a bactérias e fungos, baixa probabilidade de indução à resistência e não são consideradas hemolíticas [9-15]. O potencial de inibição abrangente das micocinas produzidas pelas leveduras encorajou sua aplicação industrial, especialmente na área de fermentação e conservação de alimentos, no tratamento pesticida pós colheita, como também na área clínica, abrangendo o desenvolvimento de medicamentos e vacinas por apresentarem baixa resistência antimicrobiana e segurança ao organismo humano [12, 16-18]. Uma tendência atual na conservação de cosméticos é evitar o uso de substâncias químicas, deixando os pesquisadores em busca de alternativas aos agentes antimicrobianos [19].

*Wickerhamomyces anomalus* é uma das leveduras produtoras de micocinas, considerada segura para indivíduos humanos saudáveis, segundo os padrões da Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos (*European Food Safety Authority*); *W. anomalus* obteve *qualis* 1 em nível de biossegurança, obtendo status de *Qualified Presumption of Safety* [20, 21]. No que se refere à aplicação industrial, a levedura *W. anomalus* possui vasto potencial biotecnológico entre a indústria; em fermentações, é utilizada como biocontrole por competição com leveduras e fungos indesejáveis, sendo essa sua aplicação mais estudada [12, 22]. Assim, as micocinas produzidas por *W. anomalus* são consideradas substâncias naturais de baixa toxicidade em células humanas, sendo fortes candidatas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos com grande potencial de aplicação e interesse para a indústria farmacêutica [15, 23, 24].

Diante da preocupação em relação aos riscos que os conservantes sintéticos podem causar à integridade da saúde humana e a busca por sistemas conservantes mais seguros, eficazes e de origem natural, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação conservante de micocinas presentes no sobrenadante de culturas de *Wickerhamomyces anomalus* WA92 incorporado em gel dermatológico, analisando a eficácia da ação conservante, irritabilidade de membrana e estabilidade da formulação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*

A levedura utilizada foi molecularmente identificada como *Wickerhamomyces anomalus* WA92 e sua respectiva sequência está depositada no genbank (número de acesso: KT580796 - Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), sendo anteriormente coletada às margens do Lago de Itaipu, localizado no estado do Paraná, Brasil, e passou por testes de triagem para verificação de produção de micocinas. Atualmente, faz parte da micoteca do laboratório de micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE), vinculado ao Hospital Universitário do Oeste do Paraná.

Previamente à produção das micocinas, a cepa WA92 foi reativada por inoculação em meio ágar sabouraud modificado (ágar 2%, peptona 1%, glicose 2%, ácido cítrico 1,92% e fosfato de potássio dibásico 3,48%) pH  $4,7 \pm 2^\circ$  e incubadas a 32°C durante 48 horas. A cepa reativada foi inoculada em frascos de Roux com 200 mL de caldo sabouraud modificado (1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico) pH 4,7 e incubados a 25°C por 5 dias. Após este período, o caldo foi centrifugado a 6000 rpm/10 min, obtendo o sobrenadante que foi esterilizado por membrana filtrante 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenado a 4°C [15, 23].

### 2.2 Determinação $\beta$ -Glucanase pelo método da Laminarina

A determinação de  $\beta$ -glucanases presentes no filtrado do sobrenadante WA92 contendo as micocinas foi realizada de acordo com Miller (1959) [25] com algumas adaptações, utilizando laminarina 1% (obtida de *Laminaria digitata*) em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 e curva padrão de glicose. A reação foi preparada utilizando 62,5  $\mu\text{L}$  da amostra de sobrenadante WA92 e 125  $\mu\text{L}$  de laminarina. Incubou-se a solução a 37°C por 10 minutos. Após este período, 100  $\mu\text{L}$  da solução foram adicionados a 100  $\mu\text{L}$  de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para parar a reação. Para o branco, foi utilizada a mesma solução do teste, sem a laminarina. Em seguida, as soluções foram incubadas em água fervente por 5 minutos com consequente adição de 500  $\mu\text{L}$  de água. A leitura foi realizada a 550 nm em espectrofotômetro. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto de reação, sendo definida como U/min/mL, conforme as condições descritas.

A quantificação de proteínas foi realizada a partir do método baseado na absorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 proposto por Bradford (1976) [26]. Para a preparação da reação, misturou-se 1 mL do Reagente Bradford com 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada cepa. Deixou-se a mistura em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, leu-se em espectrofotômetro a 595 nm. Além disso, foi realizada curva padrão a cada determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford, utilizando curva padrão de soro albumina bovino (BSA), sendo a equação da reta utilizada para o cálculo da concentração total de proteínas em mg/mL. A atividade específica de  $\beta$ -glucanases foi calculada dividindo a concentração de atividade enzimática pela concentração de proteínas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 2.3 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

Para os testes de microdiluição, utilizaram-se os métodos M07-A10, M38-A3 e M27-A3 - *Clinical and Laboratory Standards Institute* para bactérias, fungo filamentosos e leveduriformes, respectivamente, com algumas adaptações. Os microrganismos padrão teste utilizados foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404). Para o preparo do inóculo bacteriano, cada microrganismo padrão foi semeado em ágar mueller-hinton (MH) 35°C/18-24h, as colônias foram transferidas para uma solução de NaCl 0,9% ajustado em espectrofotômetro a 520nm, obtendo concentração de  $1,5 \times 10^8$  células/mL. O inóculo de levedura foi cultivado em ágar sabouraud dextrose (SD) 32°C/48h, suspendeu-se em solução de NaCl 0,9% ajustado em espectrofotômetro 530nm, obtendo-se a concentração de  $1,5 \times 10^4$  células/mL. O

fungo filamentoso foi cultivado em ágar SD em temperatura ambiente durante 7 dias. O inóculo foi preparado adicionando-se 10mL de solução NaCl 0,9% com 1 gota de Tween 20. A solução resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de fundo cônico estéril; aguardou-se 10 minutos para a sedimentação de partículas, a suspensão homogênea superior foi ajustada para uma densidade óptica de 0,069-0,11 (transmitância de 80-82%) a 625nm [27-29].

Utilizaram-se microplacas contendo 96 poços, dispostas em colunas (enumeradas de 1 a 12) e linhas (com letras alfabéticas, de A a G). Os inóculos de microrganismos padrão foram ajustados à concentração de  $10^3$  UFC/mL, as soluções foram homogeneizadas em 10 mL de caldo Mueller Hinton (MH) e distribuídas (100  $\mu$ L) nas colunas. O sobrenadante contendo as micocinas foram diluídas em água destilada estéril e adicionados aos poços da linha B a F (100  $\mu$ L), resultando nas seguintes concentrações de  $\beta$ -glucanase: 0,24; 0,48; 0,95; 1,90 e 3,80 U/mg. As leituras foram realizadas em 24 e 48 horas, de modo que a última diluição onde havia inibição do crescimento microbiano foi tomada como resultado, em comparação com os controles positivo e negativo. Alíquotas de 10  $\mu$ L foram extraídas dos poços-resultado e semeadas em ágar SD e ágar nutriente (AN) para confirmar a completa inibição. O teste foi realizado em duplicata [27-29].

## 2.4 Formulação

Inicialmente, duas formulações de gel Natrosol foram preparadas: uma com conservantes (metil e propilparabenos) e outra sem conservantes. A partir da formulação sem conservantes, incorporaram-se as micocinas presentes no sobrenadante de cultura WA92 em concentrações de 3% (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases) e 4% (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases) até completa homogeneização. Dessa forma, considerou-se a formulação com conservantes como gel controle positivo (gel C+), a formulação sem conservantes gel controle negativo (gel C-) e as formulações testes contendo micocinas presentes no sobrenadante de cultura WA92 nas concentrações de 11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases (gel T1) e 15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases (gel T2). Os componentes da formulação e concentrações estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Componentes da base gel e concentrações.

Gel C+	Gel C-	Gel T1	Gel T2
Natrosol 2%	Natrosol 2%	Natrosol 2%	Natrosol 2%
Propilenoglicol 5%	Propilenoglicol 5%	Propilenoglicol 5%	Propilenoglicol 5%
EDTA 0,1%	Edta 0,1%	Edta 0,1%	Edta 0,1%
Nipagin 0,1%	-	Sobrenadante Wa92 3%	Sobrenadante Wa92 4%
Nipazol 0,1%	-	-	-
Água qsp 100mL	Água qsp 100mL	Água qsp 100mL	Água qsp 100mL

Gel C+: com conservantes; Gel C-: sem conservantes; Gel T1: 11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases; Gel T2: 15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases

## 2.5 Challenge Test

As formulações gel T1, gel T2, gel C+ e gel C- foram desafiadas introduzindo 200  $\mu$ L da suspensão contendo  $10^6$  UFC/ml (bactérias) e  $10^5$  UFC/ml (fungos) de cada microrganismo padrão teste, homogeneizadas e mantidas a 22,5°C. O número de células viáveis nas formulações foi determinado pelo método de plaqueamento aos 0, 7, 14 e 28 dias. Para este fim, 1g de cada formulação foi transferida para 99 ml de Diluente Universal (fosfato de potássio monobásico 3,6%, fosfato dissódico di-hidratado 7,2%, cloreto de sódio 4,3%, peptona de carne 1,0%, lecitina de soja 3,0% e tween 80 30,0%) pH 6,8, fornecendo uma diluição de  $10^{-2}$  que foi posteriormente diluída para  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Das suspensões preparadas, 100  $\mu$ L foram inoculados em placas com ágar tripton de soja (TSA) e SD para bactérias e fungos, respectivamente. As placas contendo as bactérias e fungos foram incubadas a 35°C e 25°C, respectivamente. O teste foi conduzido em

duplicata. Da contagem de colônias, foi possível calcular a redução log:  $\log_{10}\text{UFC mL}^{-1}$  no tempo zero -  $\log_{10}\text{ UFC mL}^{-1}$  em um dado tempo. Os resultados foram expressos como  $\log\text{ UFC/mL}$  [2].

## 2.6 Estabilidade da formulação

As formulações testes e seus controles foram submetidos aos testes de Triagem Preliminar, Estabilidade Acelerada, Estabilidade Normal e *Shelf life*. Os parâmetros avaliados foram: características organolépticas (aspecto, cor e odor) e características físico-químicas (pH, viscosidade e densidade).

### 2.6.1 Avaliação das Características Organolépticas - Aspecto

Alterações nas características ‘macroscópicas’ da amostra em estudo foram observadas visualmente e comparadas com as características da amostra de padrão gel C+, gel C- e gel T1 e T2 armazenadas em temperatura ambiente, a fim de verificar se ocorreram alterações do tipo: turvação, separação de fases ou precipitação. O aspecto foi descrito como: fluído ou viscoso, homogêneo ou heterogêneo, transparente ou opaco. As amostras foram classificadas segundo os seguintes critérios: normal, sem alteração; levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo; separado, precipitado ou turvo [30].

### 2.6.2 Cor

Na análise visual, a cor da amostra foi comparada com a cor do padrão armazenado em frasco da mesma especificação, sob condições de luz ‘branca’ natural. A amostra do produto foi classificada segundo os seguintes critérios: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada [30].

### 2.6.3 Odor

As amostras e os padrões de referência, acondicionados no mesmo material de embalagem, tiveram os referidos odores comparados diretamente pelo olfato. As amostras foram classificadas segundo os seguintes critérios: normal; sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada [30].

## 2.7 Avaliação das características físico-químicas

### 2.7.1 Determinação do valor de pH

A determinação do valor de pH foi realizada através de uma dispersão aquosa 1:10 (m/v) utilizando pHmetro recém calibrado [30].

### 2.7.2 Determinação da viscosidade

As viscosidades das formulações foram medidas utilizando o Viscotester VT-04E com rotor tamanho 1 em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . A resistência ao movimento do rotor causada pela viscosidade foi medida em dPascal.  $\text{s}^{-1}$  (dPA-s<sup>-1</sup>). As formulações foram classificadas segundo os seguintes critérios: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada. Foram admitidas pequenas variações, desde que não comprometessem a percepção visual das amostras [30].

### 2.7.3 Determinação da Densidade

A determinação da densidade foi realizada em picnômetro metálico. Pesou-se o picnômetro vazio (M0), em seguida, foi preenchido completamente com água destilada, pesou-se novamente (M1). Após, o picnômetro com a amostra foi pesado (M2) [31]. A densidade foi expressa pela média de duas determinações e calculada segundo a equação a seguir:

$$d = \frac{M2 - M0}{M1 - M0}$$

Em que:

$d$  = densidade

M0 = massa do picnômetro vazio, em gramas

M1 = massa do picnômetro com água purificada, em gramas

M2 = massa do picnômetro com a amostra, em gramas

## 2.8 Teste de Triagem Preliminar

### 2.8.1 Centrifugação

Para a execução do teste, aproximadamente 5g de cada formulação gel C+, gel C- e gel T1 e T2 foram submetidos à centrifugação durante 30min, em temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). Ao final, foram avaliados de forma visual aspectos de instabilidade [31].

### 2.8.2 Estresse térmico

Nesse teste, 5g de cada uma das amostras gel T1, gel T2, gel C+ e gel C- foram colocadas em banho maria em temperaturas entre 30 a  $80^\circ\text{C}$  em intervalos de  $10^\circ\text{C}$ , mantidos 30min em cada temperatura [32-33].

## 2.9 Teste de Estabilidade Acelerada

### 2.9.1 Ciclo gelo/degelo

As formulações gel C+, gel C- e gel T1 e T2 foram submetidas a ciclos de 24 horas a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  e 24 horas a  $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ , realizados durante 12 dias (6 ciclos) consecutivos. Os parâmetros avaliados foram: características organolépticas (aspecto, cor e odor) e características físico-químicas (pH, viscosidade e densidade) [31].

## 2.10 Teste de Estabilidade Normal

### 2.10.1 Estufa, geladeira e exposição à luz solar

As amostras gel C+, gel C- e gel T1 e T2 foram submetidas em diferentes condições de armazenamento, a fim de avaliar o efeito sobre as formulações. As amostras foram submetidas a aquecimento em estufa a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , resfriamento em geladeira a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e exposição à luz solar. As formulações foram avaliadas no tempo 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Os parâmetros avaliados foram: características organolépticas (aspecto, cor e odor) e características físico-químicas (pH, viscosidade e densidade) [31].

## 2.11 Teste de Prateleira

No teste de prateleira, conhecido também como *shelf life*, as formulações gel C+, gel C- e gel T1 e T2 foram avaliadas em condições normais de armazenamento a 25°C durante um período de 3 meses. Inicialmente, as amostras foram avaliadas no tempo 0, 7, 15 e, a partir de 30 dias, foram avaliadas mensalmente. Os parâmetros avaliados foram: características organolépticas (aspecto, cor e odor) e características físico-químicas (pH, viscosidade e densidade) [31].

## 2.12 Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET-CAM

Para a execução do ensaio HET-CAM, ovos fecundados de galinha caipira foram incubados durante um período de 10 dias a 37°C. Realizou-se um pequeno orifício na parte superior da casca, cortando-se circularmente, expondo a primeira membrana esbranquiçada que, com auxílio de bisturi e pinça, foi removida para ter acesso à membrana cório-alantoide (CAM). As membranas foram avaliadas, a fim de verificar possíveis danos, ovos com ausência de embrião, ou de respiração e mobilidade foram rejeitados do experimento [34-37].

Na sequência, 300 µL de cada formulação gel foram aplicadas com o auxílio de micropipeta sobre a superfície da membrana cório-alantoide. Aguardaram-se 20s de período de contato; a formulação foi removida com solução salina (NaCl 0,9%) e a membrana (CAM) foi observada durante 5 minutos. Como controles do teste, utilizou-se solução salina como negativo e solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N para positivo, representando uma substância altamente irritante para a membrana e evidenciando os possíveis efeitos irritantes: hiperemia, hemorragia e coagulação [34,36-38]. Pontuações foram atribuídas a cada efeito observado no tempo em segundos, conforme a Tabela 2 e, em seguida, a classificação final do potencial irritante foi considerada conforme a Tabela 3.

Tabela 2: Pontuações atribuídas às alterações de irritação evidenciadas na membrana corio-alantoide em função do tempo.

Reação de irritação	Tempo		
	T ≤ 30s	30s ≥ T ≤ 2min	2min ≥ T ≤ 5min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: *Journal Officiel de la Republique Française (1996)*.

Tabela 3: Classificação final do potencial irritante no HET-CAM conforme pontuação atribuída em relação às reações de irritação.

Índice	Categorias
N < 1	Praticamente não irritante
1 ≤ N ≤ 5	Ligeiramente irritante
5 ≤ N ≤ 9	Moderadamente irritante
N ≥ 9	Irritante

Fonte: Adaptado de *Journal Officiel de la Republique Française (1996)*.

## 2.13 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva simples expressados por intermédio de gráficos e tabelas utilizando os softwares Microsoft Excel® e Word®.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Determinação da atividade de $\beta$ -glucanases

Os resultados de atividade específica de  $\beta$ -glucanases obtidos para *W. anomalus* WA92 foram de 3,80 U/mg. Esses resultados foram superiores aos de Lima et al. (2013) [39], que obtiveram a quantidade de 0,071 U/mg, e de Calazans et al. (2021) [40], que relataram atividade de 0,40 U/mg em micocinas de *W. anomalus*. Em contrapartida, Rosseto et al. (2022) [41] referiram atividade de 2,47 U/mg em micocinas de *W. anomalus*. Essa diferença pode estar relacionada às condições de cultivo, tipo de cepa e otimização da forma de cultivo, temperatura, pH e densidade do inóculo. De acordo com Bieleki e Galas (1991) [42] e Bauermeister et al. (2010) [43], pode haver inibição da produção da enzima por alguns microrganismos por excesso de glicose ou outra fonte facilmente acessível.

#### 3.2 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

Os testes de microdiluição foram baseados na concentração de  $\beta$ -glucanases presentes no sobrenadante de cultura WA92. O sobrenadante foi testado frente a susceptibilidade dos 5 microrganismos padrão: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404). Todos os microrganismos padrão testados foram sensíveis às micocinas de WA92 em concentração de 3,80 U/mg. *E. coli* e *A. niger* foram inibidos na concentração de 1,90 U/mg, *P. aeruginosa* 0,95 U/mg, *S. aureus* 0,48 U/mg e *C. albicans* 0,24 U/mg. Os resultados de susceptibilidade dos microrganismos padrão estão representados na Figura 1.

Vários estudos na literatura corroboram com a inibição dos microrganismos testados neste trabalho. A ação antimicrobiana das micocinas em testes *in vitro* é bem documentada, logo, as micocinas apresentam características interessantes para o estudo de aplicação conservante devido às suas propriedades e amplo espectro de ação. Paris et al. (2016) [15] verificaram que as micocinas produzidas por *W. anomalus* apresentaram ação antifúngica frente a *C. albicans* isoladas de sangue em 100% das 30 cepas testadas. Essa ação também foi relatada por Sawant et al. (1988) [44], que descreveram que as micocinas produzidas por *Pichia Anomala* foram capazes de inibir cepas de *C. albicans*. A susceptibilidade de *S. aureus* foi descrita por Calazans et al. (2021) [40], que verificaram que micocinas produzidas por *W. anomalus* apresentaram atividades inibitórias em 100% das cepas de *S. aureus* coagulase positiva isoladas de carnes. Chen et al. (2015) [45] relataram a ação de micocinas produzidas por duas linhagens de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, e relataram atividade frente a isolados de *E. coli*. Passoth et al. (2011) [22] testaram inóculos íntegros de *H. anomala* contra 13 espécies de enterobactérias, ao longo dos dias de tratamento, todas as espécies testadas, inclusive *E. coli*, foram reduzidas em valor abaixo do seu nível de detecção. Segundo Bajaj et al. (2013) [13], as micocinas RY55 produzidas por *Pichia kudriavzevii* mostraram exercer atividade inibitória sobre várias bactérias patogênicas de importância clínica e saúde humana, dentre elas: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes*. *Pichia anomala* foi testada em ágar de forma íntegra, apresentando forte atividade inibitória frente a alguns fungos, dentre eles, *Aspergillus candidus* e *Penicillium roqueforti* [46].

### Concentração de $\beta$ -glucanases para inibição dos microrganismos padrão

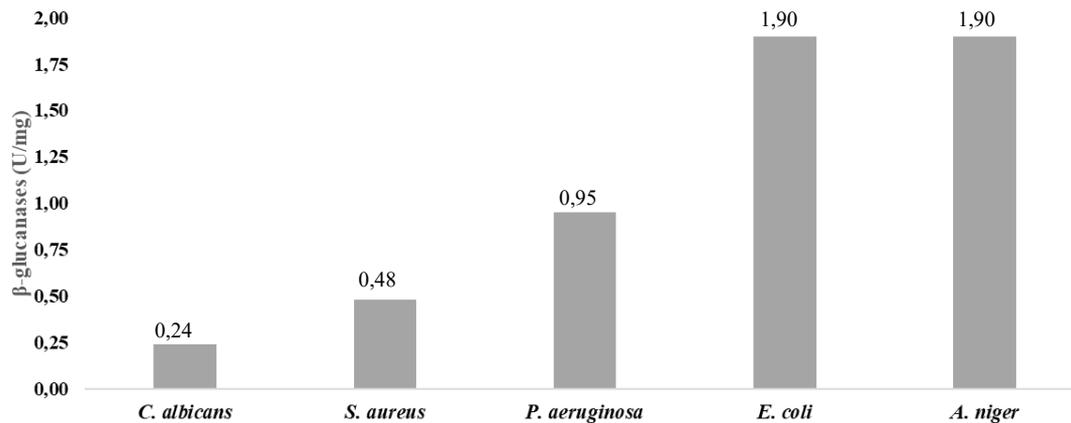


Figura 1: Resultado do teste de microdiluição utilizando o sobrenadante de *Wickerhamomyces anomalous* WA92 em suas respectivas concentrações capazes de inibir completamente cada microrganismo padrão teste no tempo de 24h e 48h.

### 3.3 Challenge test

O teste do desafio conservante realizado nas formulações conservadas com micocinas gel T1 e gel T2 alcançou os critérios de redução logarítmica estabelecidos para *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) dentro de 14 dias. As cepas de *A. niger* (ATCC 16404) e *C. albicans* (ATCC 10231) não apresentaram aumento em relação à contagem inicial em 7, 14 e 28 dias, seguindo os critérios estipulados. Tanto a concentração de  $\beta$ -glucanases de 11,4 U/mg quanto a concentração de 15,2 U/mg cumpriram as especificações de eficácia conservante nas formulações, sendo que a menor concentração foi suficiente para conter a multiplicação microbiana no produto. Os resultados das contagens UFC/mL em função do tempo em redução logarítmica são expressos na Figura 2.

Hernandes et al. (2017) [47] avaliaram a eficácia microbiana do óleo essencial de *Lipia organoides* em diferentes preparações: xarope, shampoo, creme e suco de laranja; observaram que o óleo essencial teve ação inibitória e atingiu os critérios para a formulação de xarope, shampoo e suco de laranja, enquanto, para a formulação de creme, o óleo teve ação conservante apenas para fungos. Esses resultados demonstram como uma substância pode variar sua atividade de conservação, dependendo da forma de apresentação do produto, o que destaca a importância da avaliação da eficácia do conservante adicionado à formulação final escolhida [48]. Óleos essenciais e extratos vegetais testados *in vitro* por Herman et al. (2013) [49] apresentaram uma potente inibição microbiana. Em outro experimento, Herman et al. (2014) [50] incorporaram os extratos vegetais e óleos essenciais testados no estudo anterior em uma emulsão que foi avaliada frente a bactérias da flora da pele de voluntários e obtiveram resultados de inibição microbiana promissores com o óleo de canela em concentração de 2,5%. Ostrosky et al. (2011) [51] relataram a ação do extrato de *Rubus rosaefolius* como conservante em duas formulações tópicas, emulsão e gel, que atingiram os critérios para *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *Burkholderia cepacia* (ATCC 25416), *S. aureus* (ATCC 6538) e *E. coli* (ATCC 10536), no entanto, não demonstraram atividade sobre fungos.

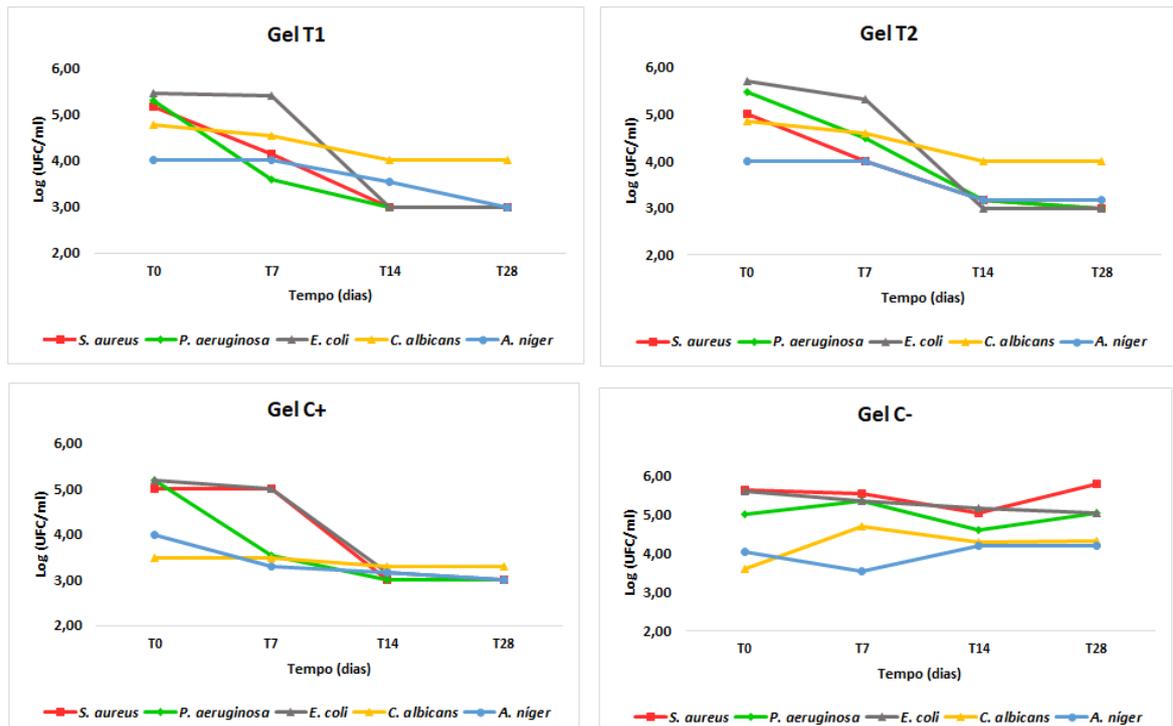


Figura 2: Redução logarítmica dos microrganismos padrão (Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Candida albicans, Aspergillus niger) no Teste do Desafio Conservante (Challenge Test). gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases) e gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases) utilizando-se micocinas de *Wickerhamomyces anomalus*, gel C+ (com conservante) e Gel C- (sem conservante).

Os critérios para eficácia microbiana variam de acordo com cada categoria de produto. De acordo com a Farmacopeia Brasileira [2], a formulação gel de uso tópico se enquadra como o produto de categoria 2 (produtos de uso tópico, constituídos de base, ou veículo aquoso). Portanto, o critério baseia-se na redução de 2 log no número de UFC/mL inicialmente inoculados para bactérias no 14º dia e, no 28º dia, a contagem não deve aumentar em relação ao 14º dia. Já para bolores e leveduras, não deve haver aumento no número de UFC/mL inicialmente inoculados no 14º e 28º dias. Os quesitos para a eficácia do conservante são cumpridos se seguirem aos critérios estabelecidos para cada categoria de produto [2].

### 3.4 Teste de triagem preliminar

Nesse ensaio, o produto avaliado é colocado frente a condições extremas de temperatura, a fim de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados seguindo as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar o prazo de validade do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações [31].

#### 3.4.1 Centrifugação

Após o ciclo de 30 minutos, todas as formulações, incluindo o gel T1 e T2, mantiveram as características normais: incolor/levemente amarelado, homogêneo, transparente e com odor característico. Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, Brasil (2004) [31], após a centrifugação, o produto deve permanecer estável, sem quaisquer sinais de instabilidade. Caso

contrário, qualquer sinal de alteração indica que o produto necessita de reformulação. Se aprovado nesse teste, a formulação pode ser submetida aos próximos testes de estabilidade.

### 3.4.2 Estresse térmico

No teste de estresse térmico, cuja temperatura inicial foi de 40°C, aumentando-se progressivamente até 80°C, mantidos durante 30 minutos em cada temperatura, a viscosidade das formulações gel T1 e T2 e de ambos gel C+ e C- foi alterada a partir da temperatura a 50°C, definido como “levemente modificado” (LM). Em 70°C, houve alterações mais bruscas da viscosidade, atribuindo a característica de “modificado” (M) para todas as formulações. O ensaio em questão permitiu estabelecer a temperatura de armazenamento da formulação testada, ou seja, sua melhor estabilidade foi até 50°C. Assim, deduziu-se que não seria necessário fazer uma reformulação, visto que, dificilmente, quando utilizado pelo consumidor, o produto será exposto a mais de 35°C.

## 3.5 Teste de Estabilidade Acelerada

Condições extremas de temperatura foram aplicadas com o objetivo de acelerar possíveis sinais de instabilidade entre os componentes da formulação [31]. A multiplicação de microrganismos nos produtos pode ocasionar alteração em propriedades químicas ou físicas, separação de fases, descoloração ou mudança no pH [52].

### 3.5.1 Ciclo Gelo/Degelo

O pH inicial do gel T1 foi de 5,8, o gel T2 apresentou pH 5,7, enquanto o gel C+ e C- apresentaram ambos pH de 6,0. Isso se deve ao fato de que as micocinas possuem característica ácida, aproximadamente pH 4,7 [15, 24, 53] e sua incorporação desencadeou uma pequena variação de pH na formulação quando comparada aos controles (Figura 3). Durante este estudo, o pH evidenciou variações mínimas de acordo com o esperado. Após o 7º dia, houve uma leve modificação no odor em ambas as formulações gel T1 e gel T2. Todas as formulações apresentaram viscosidades de 100 dPA-s<sup>-1</sup> sem alterações ao longo dos dias.

Segundo Brasil (2004) [31], nos estudos de estabilidade, pequenas variações de pH são permitidas, desde que não ultrapassem 10% dos resultados. O pH da derme está entre 5-6 em condições normais, valores que podem variar conforme a raça, tom ou cor da pele, exposição à luz solar e a doenças. O pH de uma formulação tópica deve estar de acordo com o pH do tecido cutâneo, para que o produto seja bem aceito pelo tecido [54]. Os valores de pH obtidos para as formulações gel T1 e gel T2 estiveram de acordo com o pH normal da pele. As variações das características organolépticas foram mínimas e permaneceram dentro do esperado.

A densidade das formulações manteve-se dentro dos valores preconizados, sendo que os coeficientes de variação para gel T1 (0,88%), gel T2 (0,62%), gel C+ (0,67%) e gel C- (0,60%) foram ínfimos, demonstrando homogeneidade nos resultados (Figura 4). A densidade relativa usualmente adotada é definida como a relação entre a massa de uma substância ao ar a 20°C e a massa de igual volume de água na mesma temperatura. Para líquidos ou semissólidos, a densidade pode indicar a incorporação de ar ou a perda de ingredientes voláteis [55]. De acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2008), a densidade de produtos semissólidos deve manter-se entre 0,95-1,05 g/cm<sup>3</sup>.

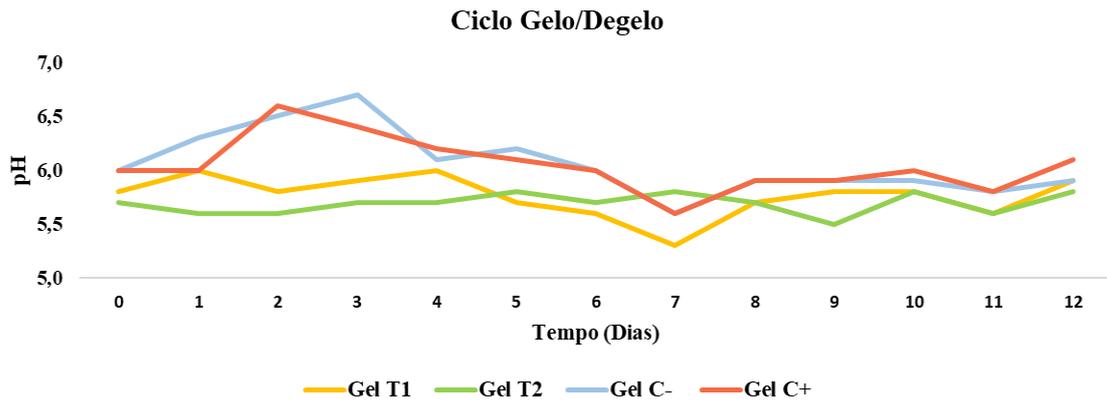


Figura 3: Determinação do pH no ciclo Gelo/Degelo em função do tempo (dias) das formulações gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel C+ (com conservante) e gel C- (sem conservante).

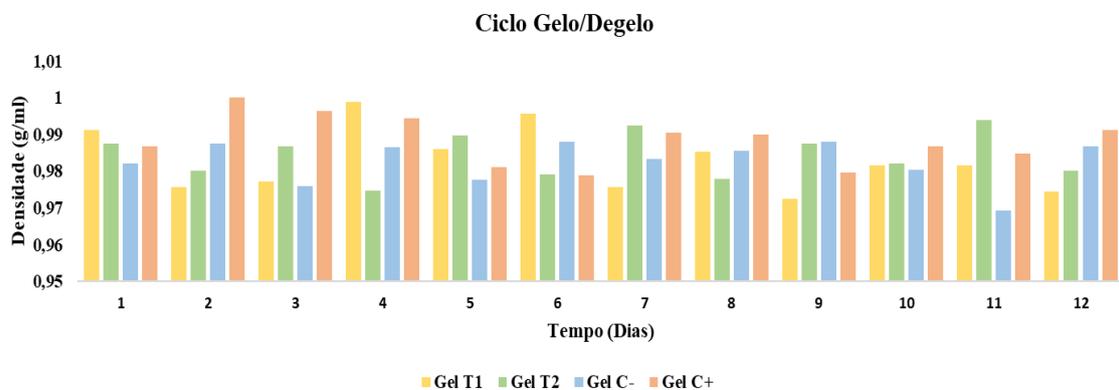


Figura 4: Determinação da densidade relativa no ciclo Gelo/Degelo em função do tempo (dias) do gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel C+ (com conservante) e gel C- (sem conservante).

### 3.6 Teste de Estabilidade Normal

#### 3.6.1 Estufa, geladeira e exposição à luz solar

As amostras submetidas a condições de aquecimento em estufa, resfriamento em geladeira e exposição à luz solar apresentaram densidade estável dentro dos padrões estabelecidos, retratando coeficientes de variação em todas as condições sempre menor que 1% (Figura 5). No que se refere ao pH, em todas as condições submetidas não houve variação maior ou menor que 10% em relação a todas as formulações teste e controles. Contudo, no teste de exposição à luz solar, alterações de odor e viscosidade diminuída foram notáveis em todas as amostras a partir de 15 dias. O teste de estabilidade em luz solar prevê se o produto é sensível ou não à luz solar. Conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, os produtos devem permanecer estáveis por, no mínimo, 15 dias em exposição à luz solar. Ainda, consideram-se aceitáveis pequenas alterações para produtos expostos a altas temperaturas, podendo alterar significativamente a cor e o odor da formulação e levar à degradação de ingredientes. Nessas condições, as alterações físico-químicas são frequentes e até mesmo esperadas, sendo que os resultados obtidos devem ser avaliados [31].

O gel T1 e T2 apresentaram valores de pH conforme a faixa de estabilidade da pele e estabilidade das formulações (Figura 6). O pH ideal para uma formulação é estabelecido de acordo com o pH de estabilidade dos princípios ativos utilizados, como também a tolerância da pele [56]. O teste de Estabilidade Normal objetiva fornecer dados a fim de prever se o produto permanecerá

estável de acordo com o período de análise, auxiliando na determinação de sua estabilidade, tempo de validade e compatibilidade com o material de acondicionamento [31].

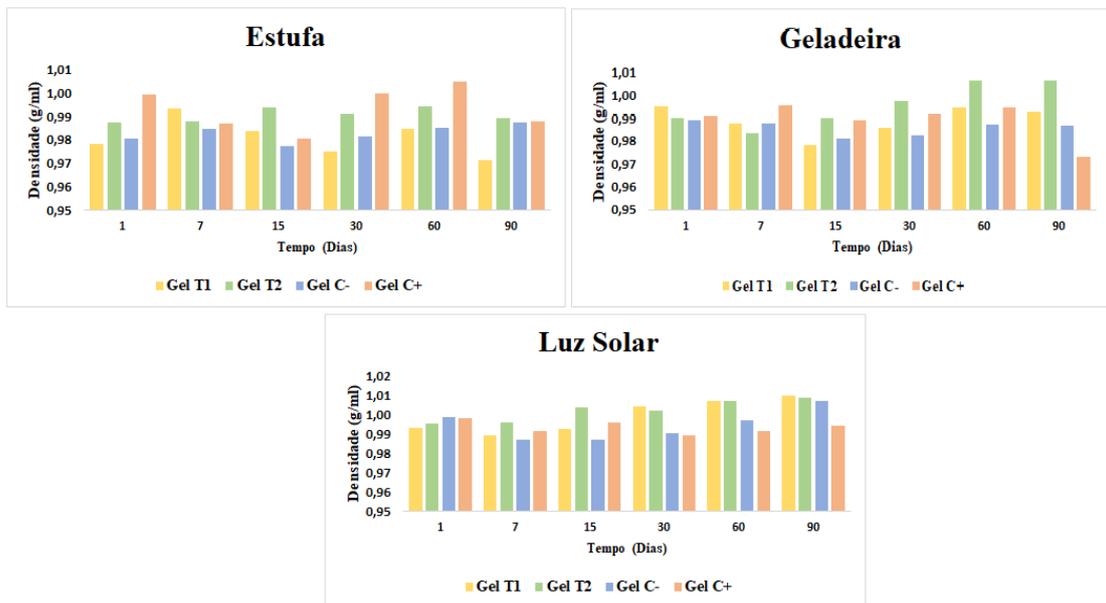


Figura 5: Determinação da densidade relativa no Teste de Estabilidade Normal em relação às diferentes condições de armazenamento (estufa, geladeira e luz solar) em função do tempo (dias) referente às formulações gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel C+ (com conservante) e gel C- (sem conservante).

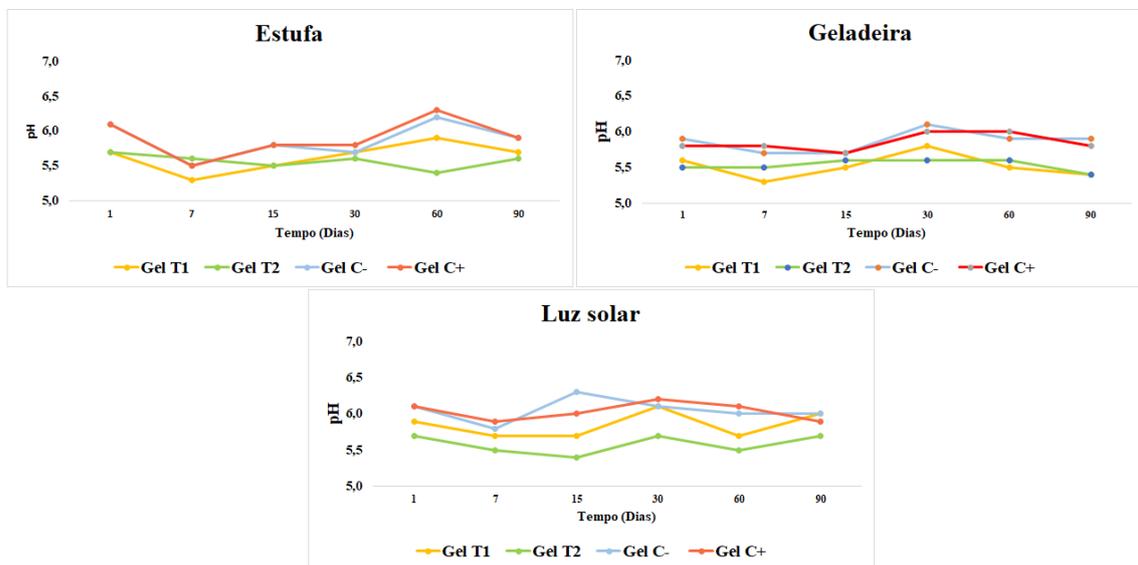


Figura 6: Determinação do pH no Teste de Estabilidade Normal em relação às diferentes condições de armazenamento (estufa, geladeira e luz solar) em função do tempo (dias) referente às formulações gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel C+ (com conservante) e gel C- (sem conservante).

### 3.7 Teste de Prateleira

Durante o teste de prateleira, as formulações se mantiveram estáveis, sem alterações de suas características físico-químicas (pH, densidade e viscosidade) e organolépticas (cor, odor e

aspecto) (Figuras 7 e 8). O *shelf life* tem por finalidade validar os limites de estabilidade, avaliando o comportamento do produto em condições normais de armazenamento [31].

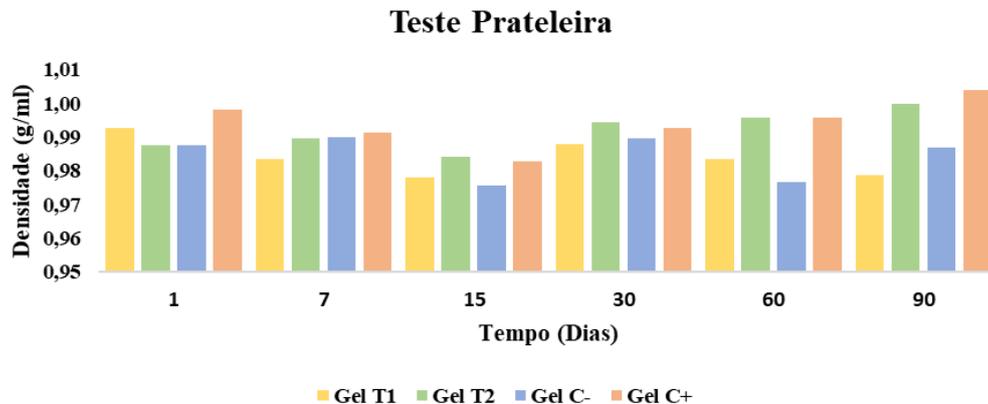


Figura 7: Determinação da densidade relativa no Teste de Prateleira em condições normais de armazenamento (25°C) em função do tempo (dias) referente às formulações gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel C+ (com conservante) e gel C- (sem conservante).

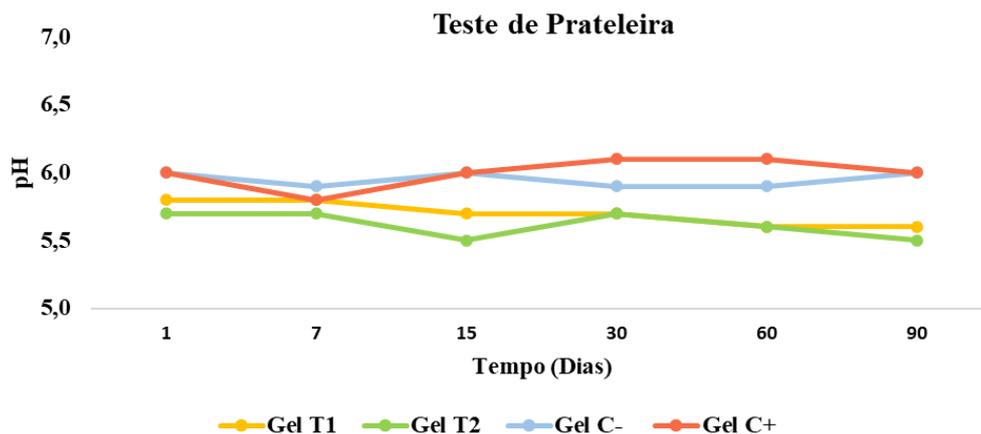


Figura 8: Determinação do pH no Teste de Prateleira em condições normais de armazenamento (25°C) em função do tempo (dias) referente às formulações gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases), gel C+ (com conservante) e gel C- (sem conservante).

Tendo em vista os aspectos físico-químicos e organolépticos mensurados nos Testes de Estabilidade, de forma geral, constatou-se que as formulações incorporadas com micocinas (gel T1 e gel T2) apresentaram a melhor estabilidade em condições normais de armazenamento a 25°C, sem alterações de cor, odor e aspecto, como também variações mínimas de pH, densidade e viscosidade. Dentre as condições extremas de armazenamento, houve maiores variações das formulações quando expostas a temperaturas elevadas, alterando o odor e viscosidade, no entanto, com os limites em conformidade com a literatura.

### 3.8 Teste em Membrana Cório-Alantoide de Ovo Embrionado de Galinha (HET-CAM)

Neste ensaio, as formulações gel T1 e T2 não apresentaram sinais de irritação na membrana em nenhuma de suas concentrações, como também nos controles gel C- e gel C+, sendo classificados como formulações não irritantes (Figura 7). A irritação da membrana cório-alatoide foi ponderada mediante avaliação visual através do surgimento de hiperemia, hemorragia e coagulação. Ao final, uma pontuação foi obtida e analisada através de uma escala que variou de

praticamente não irritante até irritante, logo, a formulação foi classificada conforme o nível de irritação visual.

No estudo envolvendo micocinas produzidas por *W. anomalus*, Rosseto et al. (2022) [41] avaliaram o potencial de irritação do sobrenadante contendo micocinas de forma pura em HET-CAM, classificando-a como segura e não irritante. Madariaga et al. (2006) [57] avaliaram o potencial irritante de cremes cosméticos incorporados com extrato alcoólico de própolis, aloe e vera e camomila a 5% no teste HET-CAM, os quais foram classificados como não irritantes por não apresentarem nenhum sinal de irritabilidade na membrana. Um estudo envolvendo células epiteliais de córnea humana foi desenvolvido para avaliar a citotoxicidade e irritação ocular de vários medicamentos oftálmicos e excipientes de colírios. Dentre as substâncias testadas, o metilparabeno não apresentou reação de toxicidade às células, mesmo após 60 minutos de exposição [58]. Diante disso, assim como o metilparabeno comumente utilizado em diversos produtos, as micocinas, quando incorporadas em formulação, podem ser consideradas não irritantes para a membrana ocular.

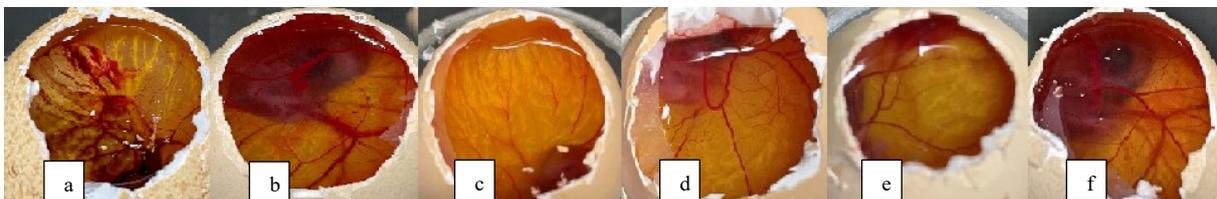


Figura 9: Teste de irritabilidade de membrana (HET-CAM). Controle Positivo (a) membrana altamente irritada após aplicação de NaOH (0,1 N), Controle Negativo (b) membrana íntegra, com aplicação de solução salina (NaCl 0,9%), gel T1 (11,4 U/mg  $\beta$ -glucanases) (c) gel T2 (15,2 U/mg  $\beta$ -glucanases) (d) gel C+ (com conservante) (e) gel C- (sem conservante) (f), respectivamente com membranas íntegras sem alterações. Todas as imagens foram capturadas ao final do teste com tempo de 5 minutos.

No atual momento, a indústria cosmética se depara com a falta considerável de conservantes menos tóxicos. Em decorrência disso, há um interesse considerável no desenvolvimento de novos sistemas conservantes seguros e eficazes. Substâncias com amplo espectro de atividade antimicrobiana e de baixa toxicidade, visando maior perfil de segurança, como extratos de plantas, óleos essenciais e as micocinas, são alternativas futuras interessantes. Nesse cenário, a utilização de substâncias bioativas de origem natural, de baixa toxicidade e resistência microbiana representa uma atitude inovadora, em que componentes sintéticos são substituídos por naturais, apresentando fundamental relevância no desenvolvimento de novos insumos; ademais, constitui também uma atitude sustentável.

#### 4. CONCLUSÃO

As micocinas presentes no sobrenadante de cultura de *Wickerhamomyces anomalus* WA92 mostraram atividade inibitória sobre os microrganismos padrão testados em microdiluição. Quando incorporadas à formulação gel em diferentes concentrações gel T1 (11,4 U/mg) e gel T2 (15,2 U/mg) apresentaram eficácia conservante frente a bactérias, fungo filamentosos e levedura em ambas as concentrações. Em relação aos testes de estabilidade, as formulações incorporadas com micocinas atenderam aos critérios preconizados, mostrando-se estáveis em diferentes condições de armazenamento. Ainda, no teste de irritabilidade de membrana, as formulações testes foram classificadas como não irritantes. Os resultados descritos sugerem que as micocinas produzidas por *W. anomalus* sejam uma substância com ação antimicrobiana promissora e segura para o desenvolvimento de novos sistemas conservantes em formulações.

## 5. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Halla N, Fernandes IP, Heleno SA, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules*. 2018;23(7):1-41. doi: 10.3390/molecules23071571
2. Brasil Farmacopeia Brasileira. v 1. 6. ed. Brasília (DF): ANVISA; 2019.
3. Herman A. Antimicrobial ingredients as preservative booster and components of self-preserving cosmetic products. *Curr Microbiol*. 2019;76(6):744-54. doi: 10.1007/s00284-018-1492-2
4. Fransway AF, Fransway PJ, Belsito DV, Yiannias JA. Paraben toxicology. *Dermatitis*. 2019;30(1):32-45. doi: 10.1097/DER.0000000000000428
5. Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Górska M, Jabłońska E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;474:238-51. doi: 10.1016/j.mce.2018.03.014
6. Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol*. 2008;27(Jul):511-8. doi: 10.1002/jat.1358
7. Dagher Z, Borgie M, Magdalou J, Chahine R, Greige-Gerges H. P-Hydroxybenzoate esters metabolism in MCF7 breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(11):4109-14. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.013
8. Scientific Committees SCCS. Opinion on parabens. on Consumer (SCCS) [Internet]. Safety, Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS); 2010 [citado em 8 ago 2020]. Disponível em: [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_041.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf)
9. Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol*. 1983 May;17(5):774-80. doi: 10.1128/jcm.17.5.774-780.1983
10. Izgü F, Altınbay D, Türeli AE. In vitro activity of panomycocin, a novel exo- $\beta$ -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. *Mycoses*. 2007;50(1):31-4. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01303.x
11. Izgu DA, Kepekci RA, Izgu F. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo- $\beta$ -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2011;99(1):85-91. doi: 10.1007/s10482-010-9527-0
12. Muccilli S, Wemhoff S, Restuccia C, Meinhardt F. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast*. 2013 Jan;30(1):33-43.
13. Bajaj BK, Raina S, Singh S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J Basic Microbiol*. 2013;53(8):645-56. doi: 10.1002/jobm.201200187
14. Seddik HA, Ceugniz A, Bendali F, Cudenneq B, Drider D. Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-albicans *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. 2016;198(1):71-81. doi: 10.1007/s00203-015-1152-x
15. Paris AP, Persel C, Serafin CF, Simão RCG, Gandra RF. Susceptibility of *Candida albicans* isolated from blood to *Wickerhamomyces anomalus* mycocins. *Curr Microbiol*. 2016;73(6):878-84. doi: 10.1007/s00284-016-1135-4
16. Giovati L, Santinoli C, Ferrari E, Ciociola T, Martin E, Bandi C, et al. Candidacidal activity of a novel killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against fluconazole-susceptible and -resistant strains. *Toxins (Basel)*. 2018;10(2):1-11. doi: 10.3390/toxins10020068
17. Guo F-J, Ma Y, Xu H-M, Wang X-H, Chi Z-M. A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013 Apr;103(4):737-46. doi: 10.1007/s10482-012-9855-3
18. Lowes KF, Shearman CA, Payne J, MacKenzie D, Archer DB, Merry RJ, et al. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(3):1066-76. doi: 10.1128/aem.66.3.1066-1076.2000
19. Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I, Musolino AD, Scuderi F, Pizzimenti F, et al. Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. *J Appl Microbiol*. 2004;97(2):395-401. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02319.x

20. Kurtzman CP. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2011;99(1):13-23. doi: 10.1007/s10482-010-9505-6
21. Muccilli S, Wemhoff S, Restuccia R, Meinhardt F. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in. *Yeast.* 2012;(November 2012):191-8. doi: 10.1002/yea.1578
22. Passoth V, Olstorpe M, Schnürer J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2011;99(1):121-5. doi: 10.1007/s10482-010-9508-3
23. Junges DSB, Delabeneta MF, Rosseto LRB, Nascimento BL, Paris AP, Persel C, et al. Antibiotic Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Ecol.* 2020;80(2):278-85. doi: 10.1007/s00248-020-01495-9
24. Nascimento BL, Delabeneta MF, Rosseto LRB, Junges DSB, Paris P, Persel C, et al. Yeast Mycocins: a great potential for application in health. *FEMS Yeast Res.* 2020;20(3):foaa016. doi: 10.1093/femsyr/foaa016
25. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426-8. doi: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May;72(1-2):248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). M27-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard—Second edition serving the world's medical science community through voluntary consensus. Wayne (US): NCCLS; 2008.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M27-A3: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard—Third Edition. Wayne (US): CLSI; 2017.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A10: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. Wayne (US): CLSI; 2018.
30. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos: Uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos [Internet]. Brasília (DF): ANVISA; 2008. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-controle-de-qualidade-de-produtos-cosmeticos.pdf/view>
31. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de estabilidade de produtos cosméticos - Séries temáticas. Vol. 1 [Internet]. Brasília (DF): ANVISA; 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf>
32. Idson B. Stability testing of emulsions - Part I. *Drug Cosmet Ind.* 1993;151:27-30.
33. Idson B. Stability testing of emulsions – Part II. *Drug Cosmet Ind.* 1993;152:38-40.
34. Française JOR. Arrêté du 27 décembre 1996 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officiel d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de po. *Journal officiel "Lois et Décrets"*. 1996;14866:19137-8.
35. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). ICCVAM test method evaluation report: *In vitro* ocular toxicity test methods for identifying severe irritants and corrosives. United States: National Institute of Environmental Health Sciences; 2006.
36. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, De Silva O. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicol Vitro.* 1999;13(2):375-84. doi: 10.1016/s0887-2333(98)00091-5
37. Vinardell MP, García L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. *Toxicol Vitro.* 2000;14(6):551-5. doi: 10.1016/s0887-2333(00)00050-3
38. Vinardell MP, Mitjans M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents. *Toxicol Vitro.* 2006;20(6):1066-70. doi: 10.1016/j.tiv.2005.11.004
39. Lima JR, Gondim DMF, Oliveira JTA, Oliveira FSA, Gonçalves LRB, Viana FMP. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol Technol.* 2013;83:58-64. doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.03.014

40. Calazans GF, Silva JC, Delabeneta MF, Paris AP, Yassuda Filho P, Auler ME, et al. Antimicrobial activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. *Food Sci Technol*. 2021;41(2):388-94. doi: 10.1590/fst.39319
41. Rosseto LR, Martelli EC, Da Silva JC, Nascimento BL, Junges DSB, Delabeneta MF, et al. Susceptibility of *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretion in front of the mycocins of *Wickerhamomyces anomalus*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2022;14(3):595-601. doi: 10.1007/s12602-022-09940-6
42. Bielecki S, Galas E. Microbial p-glucanases different from cellulases. *Biotechnology*. 1991;10(4):275-304. doi: 10.3109/07388559109038212
43. Bauermeister A, Rezende MI, Giese EC, Dekker RFH, Barbosa AM. Fungal B-1,3-glucanases: production and biotechnological applications. *Semin Ciências Exatas e Tecnológicas*. 2010;31:75-86. doi: 10.5433/1679-0375.2010v31n2p75
44. Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG. Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54(5):1099-103. doi: 10.1128/aem.54.5.1099-1103.1988
45. Chen Y, Aorigele C, Wang C, Simujide H, Yang S. Screening and extracting mycocin secreted by yeast isolated from koumiss and their antibacterial effect. *J Food Nutr Res*. 2015;3(1):52-6. doi: 10.12691/jfnr-3-1-9
46. Petersson S, Schnurer J. Erratum: Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(4):1677. doi: 10.1128/aem.61.3.1027-1032.1995
47. Hernandez C, Pina ES, Taleb-Contini SH, Bertoni BW, Cestari IM, Espanha LG, et al. Lippia organoides essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *J Appl Microbiol*. 2017;122(4):900-10. doi: 10.1111/jam.13398
48. Muyima NYO, Zulu G, Bhengu T, Popplewell D. The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in a aqueous cream formulation. *Flavour Fragr J*. 2002;17(4):258-66. doi: 10.1002/ffj.1093
49. Herman A, Herman AP, Domagalska BW, Młynarczyk A. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. *Indian J Microbiol*. 2013;53(2):232-7. doi: 10.1007/s12088-012-0329-0
50. Herman A. Comparison of antimicrobial activity of essential oils, plant extracts and methylparaben in cosmetic emulsions: 2 months study. *Indian J Microbiol*. 2014;54(3):361-4. doi: 10.1007/s12088-014-0454-z
51. Ostrosky EA, Marcondes EMC, Nishikawa SO, Lopes PS, Varca GHC, Pinto TJA, et al. *Rubus rosaefolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(2):732-7. doi: 10.1208/s12249-011-9635-9
52. Patrone V, Campana R, Vittoria E, Baffone W. In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*. 2010;60(4):237-41. doi: 10.1007/s00284-009-9531-7
53. Junges DSB, Delabeneta MF, Rosseto LRB, Nascimento BL, Paris AP, Persel C, et al. Antibiotic activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Ecol*. 2020;80(2):278-85. doi: 10.1007/s00248-020-01495-9
54. Yorgancioglu A, Bayramoglu EE. Production of cosmetic purpose collagen containing antimicrobial emulsion with certain essential oils. *Ind Crops Prod*. 2013;44:378-82. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.11.013
55. Melo CAS, Domingues RJ, De Lima AB. *Elaboração de géis e análise de estabilidade de medicamentos*. Belém (PA): EDUEPA; 2018.
56. Silva JA, Santana DP, Bedor DGCFB, Lira AAM, Lira AAM. Estudo da liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-ike. *Quim Nov*. 2009;32(6):1389-93. doi: 10.1590/S0100-40422009000600005
57. Madariaga YG, Alfonso OC, Sánchez C. Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método in vitro en sustitución de la prueba en conejos. *REDVET Rev Electrónica Vet*. 2006;VII(3):1-7.
58. Saarinen-Savolainen, PJT, Araki-Sasaki K, Watanabe H, Urtti A. Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharm Res*. 1988 Aug;15(8):1275-80. doi: 10.1023/A:1011956327987