



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

REGINARA TEIXEIRA DA SILVA

**APLICAÇÃO DE LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto EM
FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS**

Londrina
2020

REGINARA TEIXEIRA DA SILVA

**APLICAÇÃO DE LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto EM
FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr^a Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Co-orientadora: Prof. Dr^a Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R335 Silva, Reginara Teixeira da.

Aplicação de levana de *Bacillus subtilis natto* em formulações cosmecêuticas / Reginara Teixeira da Silva. - Londrina, 2020.
81 f.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Coorientador: Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Levana - Tese. 2. Biocosméticos - Tese. 3. Princípios ativos - Tese. 4. Óleo de canela e amêndoas - Tese. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone . II. Lonni, Audrey Alesandra Stinghen Garcia . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

REGINARA TEIXEIRA DA SILVA

**APLICAÇÃO DE LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto EM
FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr^a. Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a. Fabiana Guillen Moreira Gasparin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a Cristiani Baldo da Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua presença constante em minha vida, na qual me proporciona grandes vitórias e bênçãos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia por me propiciar um ensino de qualidade e subsídio para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha professora e orientadora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi por todo aprendizado, apoio e dedicação constante na elaboração deste trabalho. Sua contribuição no meu crescimento profissional foi enorme, serei sempre grata pela oportunidade.

A professora Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, pela sua contribuição no desenvolvimento e realização desta pesquisa, sem o seu apoio seria impossível.

Ao professor Ulisses de Pádua pela parceria e disponibilização do seu laboratório durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Reginaldo Silva e Iracema Teixeira por todo esforço, cuidado, amor e dedicação que tiveram comigo todos esses anos e as minhas irmãs Regiane Silva e Maria Clara Silva, pelo apoio e companheirismo durante essa jornada.

Ao meu namorado Maxwell Wesley e minha melhor amiga Kellyane Karen, por sempre estarem presentes na minha vida, obrigada pelo incentivo e companheirismo.

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Amanda Hipólito, Gabrielly Bersaneti, Talita Caretta e Victória Akemi, todas tiveram uma contribuição muito significativa na minha vida.

Sou grata pelo apoio constante do Nelson Rodriguez, Brain Bigotto, Nathália Ramos, Eduarda Mendes e Júlia Klarosk.

Agradeço também as pessoas maravilhosas que conheci durante o mestrado Alejandra Giraldo, Flávia Bender, Janaína Mantovan, Nilton Hernandez, Paloma Ferrari e Letícia Bossa, lembrarei especialmente de cada uma.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu respeito e gratidão.

SILVA, Reginara Teixeira da. **Aplicação de levana de *Bacillus subtilis* natto em formulações cosmecêuticas.** 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A incorporação de moléculas naturais bioativas em formulações cosmecêuticas é uma tendência real do mercado de produtos cosméticos. A levana apresenta propriedades hidratante e antioxidante e os óleos de canela e amêndoas apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e hidratantes que potencializam sua aplicação na área. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver novas formulações cosmecêuticas a base de levana produzida por *Bacillus subtilis* natto acrescidas do óleo essencial de canela e óleo de amêndoas. A produção de levana por *Bacillus subtilis* natto atingiu $94,62 \text{ g L}^{-1}$, com uma produtividade de $3,94 \text{ g / L.h}^{-1}$ utilizando 400 g L^{-1} de sacarose em 24 horas. A levana e o óleo essencial de canela (10 mg mL^{-1}) foram avaliados quanto à atividade antioxidante, retenção de umidade e atividade antimicrobiana pela concentração inibitória mínima. Os resultados para atividade antioxidante foram 58 % e 21 %, respectivamente. A retenção de umidade da levana foi de 92% após 96 h e a concentração inibitória mínima do óleo de canela foi de 1 mg mL^{-1} para todos os patógenos testados. A partir desses resultados foram desenvolvidas formulações em gel aniônico com levana a 1 % e óleo de canela a 0.5 %, 1% e 2 %, que apresentaram boa estabilidade por 15 dias, pH compatível com a pele, atividade antioxidante de 54 % e com atividade antimicrobiana para os patógenos testados. Uma segunda formulação cosmecêutica do tipo emulsão óleo/água multifuncional foi também desenvolvida para aplicação facial. Esta foi avaliada por planejamento de mistura com as variáveis levana e os óleos canela e amêndoas, onde os resultados definiram a formulação ideal com 75% de levana, sem adição de óleo de canela e 25% de óleo de amêndoas. A ação antioxidante máxima foi de 72 % e a capacidade hidratante foi de 100,3 %. A levana e o óleo de amêndoas mostraram forte potencial de aplicação como ingredientes ativos de formulações cosmecêuticas, mantendo estabilidade e biocompatibilidade com a formulação desenvolvida durante 90 dias.

Palavras-chave: Moléculas Bioativas. Antioxidante. Antimicrobiana. Hidratante. Cosméticos.

SILVA, Reginara Teixeira da. **Application of Levan of *Bacillus subtilis* natto in cosmeceutical formulations.** 2019. 81 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The incorporation of bioactive natural molecules in cosmeceutical formulations is a trend of cosmetic products market. Levan has moisturizing and antioxidant properties and cinnamon and almond oils have antioxidant, antimicrobial and moisturizing properties that enhance their application in the area. Thus, this work aimed at developing new levana-based cosmeceutical formulations produced by *Bacillus subtilis* natto plus cinnamon and almond oil. Levana production by *Bacillus subtilis* natto reached 94.62 g L^{-1} , with a yield of $3.94 \text{ g / L.h}^{-1}$ using 400 g L^{-1} sucrose within 24 hours. Levan and cinnamon essential oil (10 mg mL^{-1}) were evaluated for antioxidant activity, moisture retention and antimicrobial activity by minimum inhibitory concentration. Results for antioxidant activity were 58% and 21%, respectively. Levan moisture retention was 92% after 96 h and the minimum inhibitory concentration of cinnamon oil was 1 mg mL^{-1} for all pathogens tested. From these results anionic gel formulations with 1% levan and 0.5 %, 1 % and 2 % cinnamon oil, were developed, which presented good stability for 15 days, skin compatible pH, 54% antioxidant activity and antimicrobial activity for the pathogens tested. A second multifunctional oil/water emulsion cosmeceutical formulation has also been developed for facial application. This was evaluated by planning the mixture with levana and cinnamon and almond oils where the results defined the ideal formulation with 75% levan, without added cinnamon oil and 25% almond oil. The maximum antioxidant action was 72% and the hydrating capacity was 100.3%. Levan and almond oil showed strong application potential as active ingredients of cosmetic formulations, maintaining stability and biocompatibility with the formulation developed for 90 days.

Key-words: Bioactive molecules. Antioxidant. Antimicrobial. Moisturizer. Cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura linear de levana contendo as ligações principais do tipo β - (2,6) e suas ramificações unidas por ligações β -(2,1).....	14
Figura 2 – Reações catalisadas pela levanasacarase	15
Figura 3 – Delineamento simplex-centroide para misturas de três componentes.....	27
Figura 4 – Planejamento de misturas simplex-centroide da formulação em creme	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de levana por diferentes microrganismos e suas respectivas condições de cultivo	17
Tabela 2 – Polímeros naturais, semi-sintéticos e sintéticos empregados em formulações em géis	24
Tabela 3 – Formulação base do tipo emulsão (O/A).....	32
Tabela 4 – Formulações de gel aniônico 1, 2 e 3 com levana (1,0 g) e óleo de canela (0,5; 1 e 2)	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	LEVANA: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOSSÍNTESE	14
3.2	PRODUÇÃO DE LEVANA E MICRORGANISMOS PRODUTORES	16
3.3	PROPRIEDADES DA LEVANA PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS	18
3.3.1	Capacidade de Retenção de Umidade (Hidratação)	18
3.3.2	Atividade Antioxidante	19
3.3.3	Atividade Anti-inflamatória	20
3.3.4	Solubilidade	21
3.4	PROPRIEDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E FIXOS EM FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS	22
3.5	FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS CUTÂNEAS	23
3.5.1	Creme	23
3.5.2	Gel	24
3.6	CARACTERIZAÇÕES DE FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS	25
3.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA MISTURAS SIMPLEX-CENTROIDE	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NAS FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS	28
4.2	MICRORGANISMO E PRESERVAÇÃO	28
4.3	INÓCULO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA	28
4.4	PRODUÇÃO DE LEVANA POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NATTO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LEVANASACARASE.....	29
4.5	SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA LEVANA	29
4.6	CARACTERIZAÇÕES DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS ATIVOS (LEVANA E ÓLEO DE CANELA)	30

4.6.1	Atividade Antioxidante	30
4.6.2	Atividade Antimicrobiana	30
4.6.3	Capacidade de Retenção de Umidade (Hidratação) da Levana	31
4.7	FORMULAÇÕES COSMÉTICAS.....	31
4.7.1	Formulação Tipo Emulsão em Água/Óleo	31
4.7.2	Formulação Gel Aniônico	33
4.8	CARACTERIZAÇÕES DAS FORMULAÇÕES DO TIPO EMULSÃO EM ÓLEO/ÁGUA (O/A).....	34
4.8.1	Análises de Estabilidade e Espalhabilidade	34
4.8.2	Análises Físico-químicas	35
4.8.3	Atividade Antioxidante	35
4.8.4	Capacidade de Retenção de Umidade (Hidratação)	35
4.8.5	Propriedades Organolépticas	35
4.9	CARACTERIZAÇÕES DAS FORMULAÇÕES EM GEL ANIÔNICO.....	36
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	PATENTE	37
5.2	CAPÍTULO DE LIVRO	38
5.3	ARTIGO 1	39
5.4	ARTIGO 2	53
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos obteve aumento de 1,5% entre janeiro e julho de 2019, em comparação com o resultado registrado no mesmo período do ano passado, de acordo com os dados divulgados pela Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC). Além disso, a ABIHPEC tem abordado questões ligadas à biotecnologia e química verde, reconhecendo a grande importância da produção de matérias-primas que visem à sustentabilidade do processo produtivo e garantam a biodiversidade do planeta.

Dessa forma, a demanda por ingredientes naturais e bioativos na indústria cosmética é crescente. Segundo a Londres Future Market Insights (FMI), esse crescimento se deve principalmente pela constante preocupação do consumidor em relação aos efeitos colaterais de produtos químicos em cosméticos, a disseminação de conhecimento sobre os benefícios dos ingredientes naturais e aumento do consumismo ético.

Aplicações de biomoléculas, não apenas de processos extrativos, mas também de outras fontes, como processos biotecnológicos, são extremamente importantes em processos industriais modernos. Logo, os exopolissacarídeos microbianos recebem grande destaque neste setor, pois se tratam de biomoléculas com várias funções para aplicações em formulações cosmeceúticas, dentre as funções incluem como estabilizadores de emulsão que impedem a coalescência das gotículas de óleo e a separação de ingredientes, formador de filme, aglutinante e agente de aumento de viscosidade.

A levana é um exopolissacarídeo que apresenta propriedades biológicas relevantes para sua aplicação como ingrediente ativo em formulações cosmeceúticas, incluindo ação antioxidante, clareadora, anti-inflamatória e hidratante. Na sua estrutura a levana é composta principalmente por monômeros de frutoses, unidos por ligações glicosídicas β -(2,6) e ramificações com ligações β -(2,1).

A levana é produzida por diversos microrganismos, incluindo *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus licheniformis*, *Brachybacterium phenoliresistens*, *Brenneria goodwinii*, *Halomonas smyrnensis*, *Lactobacillus reuteri*, *Pseudomonas fluorescens* *Zymomonas mobilis*. Sua síntese ocorre principalmente pela ação da enzima extracelular levanasacarase (E.C.2.4.1.10), que hidrolisa a

sacarose em glicose e frutose e posteriormente, polimeriza a frutose em levana.

Apesar da levana apresentar excelentes propriedades biológicas, a associação de outros princípios ativos no mesmo sistema representa inovação na cosmetologia, pois o aumento da ação bioativa é uma condição obrigatória para projetar novas formulações cosméticas.

Os óleos essenciais apresentam amplo reconhecimento na indústria cosmética por seus efeitos benéficos. São compostos promissores para estudos de associação em formulações cosmecêuticas, oferecendo múltiplas vantagens, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e grande potencial como princípio ativo. Dentre eles, o óleo de amêndoa e óleo essencial de canela são excelentes candidatos. O óleo de amêndoa por apresentar propriedades relevantes como, atividade antioxidante, hidratante, fotoprotetora e emoliente e o óleo de canela por demonstrar alto potencial antimicrobiano, efeitos antioxidante, anti-inflamatório e atuar como conservante natural, substituindo conservantes sintéticos como o metilparabeno.

Considerando as propriedades biológicas da levana de *Bacillus subtilis* natto e a busca por novas moléculas bioativas, que agreguem valores ao produto final, esta pesquisa propôs estudar as propriedades dermocosméticas da levana e do óleo essencial de canela para desenvolver novas formulações cosmecêuticas sustentáveis, com alta propriedade antioxidante, hidratante e antimicrobiana, além de ser um produto sustentável.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades biológicas da levana produzida por *Bacillus subtilis* natto e do óleo essencial de canela e desenvolver formulações cosmecêuticas multifuncionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

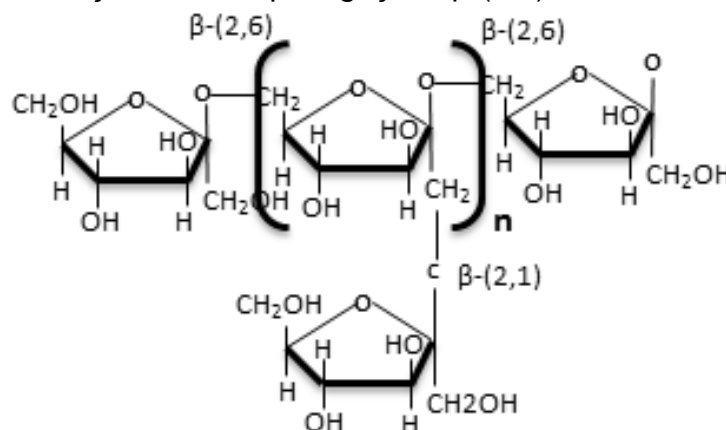
- Produzir a levana por *Bacillus subtilis* natto;
- Testar as propriedades antioxidante, antimicrobiana e retenção de umidade da levana;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de canela;
- Desenvolver e caracterizar formulações cosmecêuticas em gel aniônico com adição de levana e óleo de canela;
- Desenvolver por planejamento de misturas e caracterizar as formulações cosmecêuticas em emulsão óleo água, com adição de levana, óleo de canela e óleo de amêndoas;
- Avaliar a estabilidade das formulações cosmecêuticas por 90 dias em diferentes condições de exposição.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEVANA: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOSÍNTESE

Levana é um polissacarídeo extracelular formado principalmente por monômeros de frutose, onde sua estrutura química foi determinada pela primeira vez em 1990, pelos pesquisadores Simms, Boyko e Edwards, que com base nas pesquisas feitas com a levana produzida por *Streptococcus salivarius* SS2, concluíram que esta é constituída por uma cadeia principal de resíduos de β -D-frutofuranosídeos unidos por ligações β -(2,6) e ramificações com ligações β -(2,1), conforme pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Estrutura linear de levana contendo as ligações principais do tipo β -(2,6) e suas ramificações unidas por ligações β -(2,1).



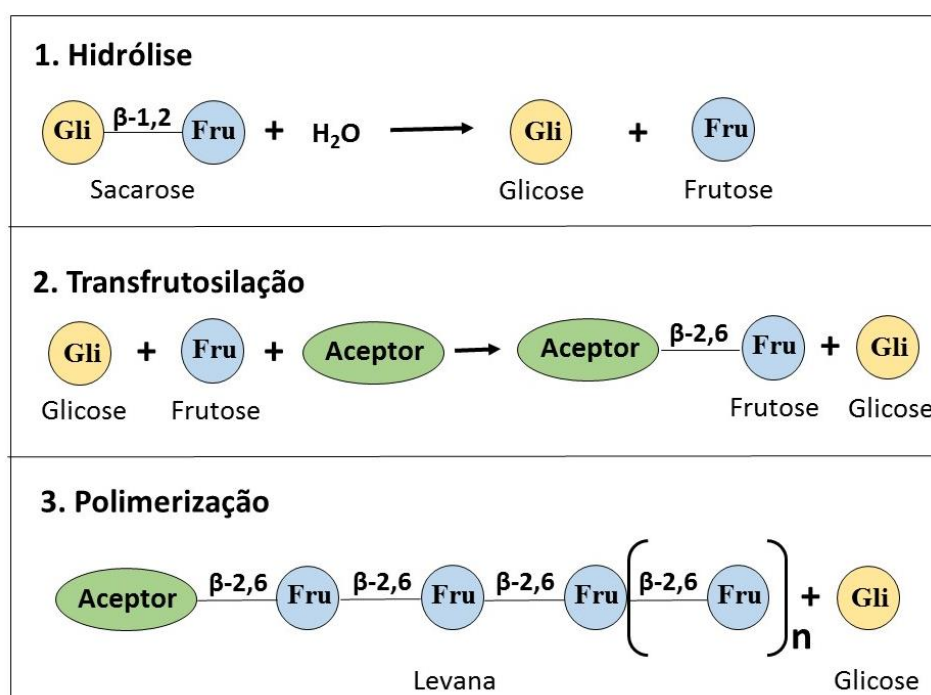
Fonte: (Silva et al. 2019).

A levana é produzida por uma ampla gama de microrganismos e em algumas plantas como reservatório de carboidratos (BANGUELA et al., 2011). Em geral, as plantas produzem levanas de baixo peso molecular, enquanto os microrganismos produzem levanas de alto peso molecular (CHIDAMBARAM et al., 2019). Levanas de origem microbiana geralmente apresentam uma massa molecular de 10^7 Dalton, correspondente a aproximadamente 60.000 unidades de frutose unidas por ligações β -(2,6) (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2005; GU, et al., 2017).

A biosíntese da levana ocorre principalmente pela

levanasacarase (E.C. 2.4.1.10), uma enzima multifuncional, possuindo atividade de: (1) hidrólise (quebra da molécula de sacarose em: glicose e frutose na ligação β -1,2), (2) transfrutossilacção (transferência do grupo frutossil para uma molécula aceptora) e (3) polimerização (síntese das frutanas, como frutooligossacarídeos e levana) (LI et al., 2015), conforme demonstrado na Figura 2. Na reacção de transfrutossilacção realizada pela levanasacarase, há uma variedade de aceptores do resíduo frutossil, resultante da hidrólise da sacarose, incluindo glicose, sacarose e frutanas (MARTINEZ-FLEITES et al., 2005). A levanasacarase pertence ao grupo das hidrolases glicosídicas na família 68, podendo também ser classificada como uma frutossiltransferase (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2005; GU, et al., 2017).

Figura 2. Reações catalisadas pela levanasacarase



Na natureza, a levana foi encontrado muitas vezes associados a outros exopolissacarídeos, fazendo parte de biofilme de espécies do solo, como *Bacillus subtilis*. A levana tem uma função que protege os microrganismos da dessecação à medida que o nível da água muda, também auxilia na fixação das células em um ambiente favorável, evitando que a comunidade fique exposta a organismos predadores (DOGSA et al., 2013). Como papel secundário, mas não menos importante, a levana nos biofilmes também constitui um reservatório de nutrientes extracelulares que pode ser

usado como fonte alternativa de carbono, em condições precárias de glicose (ONER, HERNÁNDEZ, COMBIE, 2016).

3.2 PRODUÇÃO DE LEVANA E MICRORGANISMOS PRODUTORES

Em relação a produção de levana, a quantidade produzida pelos microrganismos está intimamente relacionada com as condições específicas de crescimento celular e com a composição do meio de cultura (SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011). Normalmente, é produzida direto pelo microrganismo via fermentação ou pela enzima isolada, na maioria dos casos utilizando a sacarose, xaropes ou melaço como substrato. O seu peso molecular, grau de polimerização e a ramificação da unidade de repetição podem variar conforme a fonte de produção e outros parâmetros utilizados (TOMULESCU et al., 2016; ONER, HERNÁNDEZ, COMBIE, 2016).

Segundo os estudos de Shih; Hih; Yu (2005), Lu et al. (2014), Zhang et al. (2014) e Bersaneti et al. (2017), os fatores que mais influenciam na produção de levana, são a fonte de carbono e a sua concentração, temperatura, pH, tempo, fonte de nitrogênio, a presença de sais no meio, agitação e aeração.

Para a produção de levana é necessária uma fonte de carbono, sendo a sacarose a mais empregada na maioria das produções, sempre em altas concentrações (300 a 500 g L⁻¹), para obter boa produtividade e com características de alto peso molecular. Destacando que a sacarose tem baixos efeitos inibidores contra a levanasacarase, aumentando assim a possibilidade de alcançar altos rendimentos de polissacarídeos (SRIKANTH et al., 2015a).

Quando a síntese de levana for por atividade enzimática (*in vitro*), o pH ideal é 6,0 ou outro próximo da neutralidade e a temperatura varia entre 35 °C a 40 °C (ZHANG et al., 2014; LU et al., 2014; LIU et al., 2017; BERSANETI et al., 2017; KIRTEL et al., 2018; NI et al., 2018). Porém, quando a produção de levana for através de microrganismos, as condições de fermentação empregadas são de grande importância para se obter as características do produto desejado. A Tabela 1 descreve os diferentes microrganismos produtores, as condições de produção e a concentração obtida de levana.

Tabela 1. Produção de levana por diferentes microrganismos e suas respectivas condições de cultivo

Microrganismos	Condições	Levana (g L⁻¹)	Referência
<i>Zymomonas mobilis</i>	pH 6,0-7,0; 30 °C; 200 rpm; 200 g L ⁻¹ sacarose; 72 h	85,4	Ernandes et al. (2011)
<i>Bacillus subtilis</i> natto	pH 7; 37 °C; 150 rpm; 400 g L ⁻¹ sacarose; 16 h	111,6	Santos et al. (2013)
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	pH 6,0; 37 °C; 300 g L ⁻¹ sacarose; 16 h	100,0	Zhang et al. (2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Meio sólido com 20 g L ⁻¹ sacarose, 120 h	4,5	Taguett et al., (2015)
<i>Halomonas smyrnensis</i>	pH 7,0; 37 °C; 200 rpm; 50 g L ⁻¹ sacarose, 150 h	8,84	Sarilmiser et al. (2015)
<i>Brenneria goodwinii</i>	pH 6,0; 35 °C; 500 g L ⁻¹ de sacarose, 12 h	185,0	Liu et al. (2017)
<i>Brachybacterium phenoliresistens</i>	pH 7,8; 30 °C; 150 rpm; 300 g L ⁻¹ sacarose, 72 h	7,97	Moussa et al. (2017)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	pH 6,0; 35 °C; 500 g L ⁻¹ sacarose, 12 h	183,0	Ni et al. (2018)
<i>Bacillus licheniformis</i>	pH 7,0; 37 °C; meio a base de melaço de beterraba com adição de 200 g L ⁻¹ sacarose, 48 h	53,2	Gojgic-Cvijovic et al. (2019)

Após a produção da levana são necessárias as etapas de purificação e caracterização para possível aplicação, assim, vários métodos têm sido desenvolvidos para obter os exopolissacarídeos mais puros. As técnicas de extração devem ser testadas e otimizadas de acordo com o objetivo final, seja ela qualitativa ou quantitativa. A purificação de exopolissacarídeos do extrato bruto (meio fermentado) pode ser feita por cromatografia de troca aniônica DEAE-52 e Sephadex G-100 (RAHI et al., 2018) ou ainda ser fracionada com uma coluna de Q-Sepharose de fluxo rápido, dentre muitas outras técnicas (PRATHYUSHA, SHEELA, BRAMHACHARI, 2018).

Para a caracterização geral dos exopolissacarídeos, as

propriedades químicas, físicas e biológicas devem ser conhecidas para futuras aplicações. Uma técnica comumente utilizada é a análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) empregada para examinar a estrutura básica dos exopolissacarídeos. Para definir o peso molecular tem sido usada a cromatografia de permeação em gel (GPC) e análise de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) (SONG et al., 2011). Pela metodologia de ressonância magnética nuclear (RMN) é possível observar onde cada carbono/hidrogênio estão posicionados, auxiliando na caracterização. Também na etapa de caracterização a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de força atômica (AFM) (SLETMOEN et al., 2003) são técnicas frequentemente empregadas. A associação dessas tecnologias tem possibilitado a identificação e caracterização das biomoléculas de interesse industrial.

3.3 PROPRIEDADES DA LEVANA PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS

Suas atividades biológicas na pele incluem efeitos de proliferação celular, hidratação e alívio da irritação (KIM et al., 2003), efeitos de clareamento (FURUKAWA; TSUBOI, 2006), atividade anti-inflamatória e antioxidante (KANG et al., 2009; SRIKANTH et al., 2015a; Domżał-Kędzia et al., 2019). A levana também apresenta uma boa capacidade de retenção de umidade (Domżał-Kędzia et al., 2019), biocompatibilidade, biodegradabilidade e alta solubilidade em diferentes solventes. Desta forma, representa uma alternativa na aplicação em cosméticos, principalmente no tratamento para retardar o envelhecimento facial, tratando rugas e linhas de expressão.

Dessa forma, a levana apresenta alto potencial como ingrediente ativo a ser aplicado em formulações cosmeceúticas e farmacêuticas. No entanto, apesar de apresentar muitas propriedades que a revelam como um ótimo exopolissacarídeo de aplicação em produtos cosméticos, a sua utilização, nesta área, ainda é pouco descrita na literatura.

3.3.1 Capacidade de Retenção de Umidade (Hidratação)

A pele é um órgão vital para o organismo humano, sendo

considerado um revestimento complexo e composto essencialmente por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, além do sistema celular. Este complexo forma uma “barreira cutânea” como uma ferramenta de proteção do nosso corpo e apresenta como funções: prevenção de entrada de microrganismos e substâncias químicas, resistência às forças mecânicas, proteção contra radiação ultravioleta, descamação progressiva (renovação celular), controle da perda de água transepidérmica e retenção de água intraepidérmica. Assim, o termo hidratação se refere ao mecanismo da epiderme em reter água, sobretudo no estrato córneo, bem como evitar a perda de água para o meio externo, de modo que a sua taxa de evaporação sempre se mantenha num nível normal (OLIVEIRA, 2009)

O conteúdo aquoso do estrato córneo é um dos mais importantes parâmetros na avaliação da função barreira, além da chamada perda transepidérmica de água (OLIVEIRA, 2009). O que faz a pele permanecer saudável, macia, com flexibilidade e elasticidade é o equilíbrio que existe no mecanismo de sua hidratação, na capacidade que o organismo tem de promover a renovação celular e nas substâncias que compõem a epiderme.

Kim et al. (2005) verificaram o efeito hidratante de levana avaliando a perda de água transepidérmica e o conteúdo de água na pele, usando um vapômetro e um corneômetro (modelo CM825), respectivamente. Os resultados desses testes para a levana aplicado à pele foram comparados com os resultados de 0,2% de ácido hialurônico e água destilada. De acordo com a análise estatística dos dados, houve uma diminuição significativa na perda de água da pele resultante da aplicação de levana e ácido hialurônico. Os resultados do teor de água na pele usando um corneômetro mostraram a mesma tendência de diminuição da perda de água. Com base nesses dados, os autores concluíram que a levana apresenta um efeito hidratante substancial (KIM et al., 2005; KANG et al., 2009).

Segundo Yoo et al. (2004) e Calazans et al. (2000) a levana como componente ativo em produtos cosméticos demonstra exercer excelentes efeitos sobre a pele como: suavização, melhora da proliferação celular, hidratação e alívio da irritação.

3.3.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante de levana tem sido estudada para a sua aplicação industrial. Abdel-Fattah et al. (2012) avaliaram o efeito antioxidante de levana produzida por *Bacillus subtilis* NRC1aza, por meio do método de 1,1-difenil-2-piocril-hidrazil (DPPH), constatando uma alta atividade antioxidante do polímero. Liu et al. (2012) também verificaram a atividade antioxidante em levanas com diferentes pesos moleculares, produzidas pela bactéria endofítica *Paenibacillus polymyxa* EJS-3, os autores concluíram que todas as amostras testadas apresentaram boa atividade antioxidante.

Srikanth et al. (2015b) avaliaram a capacidade antioxidante de levana produzida por *Acetobacter xylinum* NCIM2526, utilizando também o método do DPPH, e concluíram que a levana isolada pode ser empregada como um forte antioxidante para aplicações farmacêuticas e biomédicas. Levanas de *B. subtilis* HMNIG-2 e *B. subtilis* MENO2 foram avaliadas pelo método do DPPH e demonstraram atividades de 48% e 40% respectivamente na concentração de 3 mg mL⁻¹ (HAMDY et al. 2017)

Celligoi et al. (2018) desenvolveram a patente (BR 10 2018 069609 2) do preparo de uma nova formulação biocsmética facial com a levana sintetizada pela levanasacarase do *Bacillus subtilis*. A levana foi incorporada em uma formulação biocsmética a base de ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer. Na formulação cosmecêutica foi comprovada alta atividade antioxidante (aproximadamente 60 %) fornecida pela levana.

3.3.3 Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória da levana obtida de várias fontes também já foi relatada. Tal propriedade é importante para aplicações na indústria farmacêutica, que apresenta atualmente uma grande demanda por produtos com essas características. Com o intuito de examinar a natureza anti-inflamatória de levana obtida de *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, Srikanth et al. (2015b) realizaram um ensaio anti-inflamatório *in vitro* utilizando o método de desnaturação da proteína albumina do soro bovino (BSA) e o diclofenaco de

sódio como padrão. O fármaco padrão utilizado para o ensaio, mostrou um efeito inibitório na desnaturação da BSA de 100 % na concentração de 0,25 mg/mL e para levana foi observado uma atividade anti-inflamatória de 71,18 % na mesma concentração. Dessa forma, os autores consideraram a levana produzida por *A. xylinum* um eficiente agente anti-inflamatório.

Kim et al. (2005) também avaliaram o efeito anti-inflamatório de levana, no entanto, utilizaram um método diferente de Srikanth et al. (2015a). Os autores usaram uma pele bioartificial tridimensional contendo queratinócitos e fibroblastos humanos para testar a atividade anti-inflamatória de levana. Depois de induzir uma irritação primária na pele bioartificial, aplicaram 0,01 mg/mL e 0,05 mg/mL de solução levana, e subsequentemente foi medida, a quantidade de interleucina (IL-1 α), mediador pró-inflamatório durante o transporte do sinal intercelular secretada. A pele bioartificial tratada com 0,01 mg/mL e 0,05 mg/mL de levana exibiu quantidade reduzida de IL-1 α , em comparação à pele não tratada com levana. Diante disso, os resultados observados pelos autores, sugerem que a levana exerce um efeito anti-inflamatório na pele irritada. No entanto, o mecanismo deste fenômeno não é claro. Apesar da levana testada possuir alto peso molecular, ela consegue proporcionar uma proliferação celular e efeitos anti-inflamatórios. Isto pode ser atribuído à sua capacidade de penetração, que é devido a distribuição de tamanho de partícula menor (170 a 300 nm), quando comparada com a de outros polissacarídeos (KANG et al, 2009).

3.3.4 Solubilidade

Os exopolissacarídeos tem sua solubilidade relacionada com o peso molecular e ramificações, que geralmente apresentam grupos carregados (ALMEIDA, 2015). Levana é solúvel tanto em água como em óleo devido suas ligações β (2 \rightarrow 6). No entanto, a sua solubilidade em água é diferenciada, apresentando baixa solubilidade em água gelada e alta solubilidade em água quente (SRIKANTH et al., 2015a).

As soluções de levana em água normalmente permanecem líquidas em temperatura ambiente, enquanto concentrações semelhantes de outros polissacarídeos formam pastas ou géis espessos. Como muitos

polissacarídeos, a levana não é solúvel na maioria dos solventes orgânicos, como metanol, acetona, etanol, n-propanol, metiletilcetona, isopropanol, lactato de etila, tolueno, sendo o dimetilsulfóxido (DMSO) uma exceção (MANANDHAR; VIDHATE; SOUZA, 2009).

Devido as propriedades de solubilidade e baixa viscosidade intrínseca deste polímero, estudos recentes estão explorando uma nova aplicação de levana como hidrogéis solúveis em água, que estão ganhando destaque nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticas (OSMAN et al., 2017; PENG et al., 2018).

3.4 PROPRIEDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E FIXOS EM FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS

Os óleos fixos são amplamente reconhecidos por seus efeitos benéficos na indústria cosmética, oferecendo múltiplas vantagens, como propriedades antioxidantes, nutracêuticas, antienvhecimento, anti-inflamatórias, antimicrobianas e emolientes (LACATUSU et al., 2018). Além disso, quando incorporados em formulações cosmecêuticas, impedem a perda da água através da pele. Isso acontece devido a capacidade desses compostos de formarem uma camada protetora na epiderme (ZIELIŃSKA; NOWAK, 2014).

O óleo de amêndoas por exemplo, é usado na indústria de cosméticos em cremes para a pele e produtos antienvhecimento, devido as suas propriedades como emoliente, hidratante e antioxidante (AHMAD, 2010). Também foi relatado o efeito fotoprotetor do óleo de amêndoas, Sultana et al. (2007) observaram que após alterações visíveis na pele de camundongos, provocadas por exposição à radiação ultravioleta (UV), os resultados dos testes bioquímicos, estimativa da glutatona e peroxidação lipídica mostraram que o óleo de amêndoa reduzia o efeito do fotoenvhecimento induzido pela luz UV na pele. Além disso, os estudos histopatológicos também indicaram um efeito fotoprotetor do óleo de amêndoa na pele após a exposição aos raios UV.

Os óleos essenciais também apresentam excelente biodegradabilidade, biocompatibilidade e grande potencial como princípio ativo, agindo como antimicrobianos e antioxidantes (XU et al., 2019).

O óleo essencial de canela, geralmente reconhecido como seguro (GRAS), tem recebido muita atenção devido ao seu melhor desempenho sensorial e capacidade antimicrobiana (PANDEY, JAGTAP, POLSHETTIWAR, 2011; HERMAN et al., 2013; ZHANG et al., 2016; VAHEDIKIA et al., 2019; XU et al., 2019).

Avaliando a capacidade antimicrobiana de extratos vegetais (*Matricaria chamomilla*, *Aloe vera*, *Calendula officinalis*) e óleos essenciais (*Lavandula officinallis*, *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum zeylanicum*) comparados com o metilparabeno, Herman et al. (2013) relataram que os óleos essenciais apresentaram maior atividade inibitória contra bactérias e leveduras do que os extratos vegetais e o metilparabeno. Sendo o óleo de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) o inibidor mais potente do crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* após 28 dias de incubação.

Devido a atividade antimicrobiana do óleo de canela agregado as formulações cosmeceúticas (benéficas ao consumidor), pode atuar também como conservante natural, garantindo a inibição microbiológica do produto cosmético sob seu uso e armazenamento. Assim conservantes sintéticos como o metilparabeno podem ser substituídos (HERMAN et al., 2013).

3.5 FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS CUTÂNEAS

As preparações semi-sólidas cutâneas são formuladas de modo a promoverem a liberação local ou transdérmica das substâncias ativas incorporadas. Podem ser de vários tipos, incluindo as pomadas, cremes, géis, pastas, cataplasma e emplastos medicamentosos. Devido às suas características de fácil espalhabilidade e alta estabilidade, os cremes e os géis constituem os sistemas semi-sólidos mais utilizados na produção de produtos cosméticos (OLIVEIRA, 2009).

3.5.1 Creme

Entre as diferentes formas farmacêuticas semi-sólidas disponíveis no mercado, as formulações em creme continuam recebendo atenção crescente como sistemas lucrativos para a liberação de drogas e

agentes cosméticos ativos à pele. São descritos como sistemas bifásicos, constituídos por dois líquidos imiscíveis, onde um é disperso uniformemente pelo outro para formar emulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (SIMÕES; VEIGA; VITORINO, 2019).

O processo de fabricação de formulações em creme geralmente começa com a preparação de duas fases separadas: a fase oleosa e a fase aquosa. Em seguida, as duas fases são misturadas para formar a emulsão (COSTA; SANTOS, 2017).

A composição de uma emulsão afeta muito suas propriedades físicas que, por sua vez, afetam o comportamento do produto durante a fabricação, embalagem e aplicação (DUBUISSON et al., 2018). As formulações de creme básico com função de hidratação da pele são tipicamente compostas por ingredientes simples, como emolientes (10 a 40%), umectantes (1 a 5%), espessantes (0,1 a 0,5%), emulsificantes (1 a 6%), estabilizadores (0,01-0,2%), conservantes (0,01-0,5%) e neutralizadores (0,01-0,05%) (CHENG et al., 2009). Ingredientes ativos biológicos, como antioxidantes, antimicrobianos e clareadores também podem ser incorporados para agregar algum valor ao produto. Além disso, o uso de fragrâncias e corantes pode tornar o produto mais atraente para o consumidor (COSTA; SANTOS, 2017).

3.5.2 Gel

Os géis são obtidos pelas misturas de materiais naturais ou sintéticos na água ou mistura de solventes, em um processo chamado geleificação. Normalmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros naturais, semi-sintéticos e sintéticos (Tabela 2) que, quando dispersos em um meio aquoso doam viscosidade à preparação (PERES; DIAS, 2011).

Tabela 2. Polímeros naturais, semi-sintéticos e sintéticos empregados em formulação gel

Naturais	Semi-sintético	Sintético
Caseína	Metilcelulose	Carbômero (Carbopol®)
Gelatina	Hidroxietilcelulose	Co-polímero do ácido sulfônico acrilóil-dimetil-taurato (Aristoflex®)
Goma guar	Hidroxipropilmetilcelulose	Polivinilpirrolidona (PVP)
Amido	Carboximetilcelulose	Carboxivinílicos

Os géis têm sido muito utilizados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois têm boa espalhabilidade, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis ou lipossomas (AMIRALIAN; FERNANDES, 2018). Além disso, as formulações em gel são muito bem aceitas pelo consumidor devido ao seu aspecto transparente, na maioria das vezes, e à sua facilidade de aplicação. São bem tolerados, facilmente laváveis e produzem uma sensação de frescor sobre a pele (OLIVEIRA, 2009).

Os géis de Aristoflex® apresentam boas características físicas e mecânicas e constituem uma base dermatológica eficiente para a incorporação de moléculas bioativas (OLIVEIRA, 2009; KÜLKAMP-GUERREIRO et al., 2012). Apresentam carga aniônica e excelentes características de estabilidade para uma faixa de pH entre 4 e 9. São transparentes e incolores, conferindo uma agradável sensação à pele, sem o toque pegajoso dos polímeros tradicionais (OLIVEIRA, 2009).

3.6 CARACTERIZAÇÕES DE FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS

Em geral, o desenvolvimento de uma formulação deve levar em consideração o tipo, a finalidade do uso e a compatibilidade entre os ingredientes utilizados simultaneamente, o que, como um todo, leva à necessidade de estudos de estabilidade e segurança (GARBOSSA; CAMPOS, 2016).

Cada componente, ativo ou não, pode afetar na estabilidade do produto. Conforme a origem, as alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por fatores externos (temperatura, tempo, umidade, material de acondicionamento, microrganismos, vibração, luz e oxigênio), ou intrínsecas, quando determinadas por fatores inerentes à formulação, como incompatibilidade química envolvendo o pH, reações de óxido-redução, reações de hidrólise e interações entre os ingredientes da formulação e o material de acondicionamento (ANVISA, 2004).

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos após a fabricação envolvem a análise de vários fatores, como separação de fases, variação físico-químicas (pH e densidade), propriedades organolépticas e reológicas e monitoramento microbiológico (ANVISA, 2004). Normalmente a

avaliação de separação de fases é feita em centrífuga 3000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente (ANCHISI et al., 2001; GARBOSSA, CAMPOS, 2016).

As propriedades organolépticas geralmente são avaliadas pelo aspecto, cor e odor, e abrangem a medição, interpretação e compreensão das respostas humanas às propriedades do produto detectadas pelos sentidos (DAUDT et al., 2015).

As características reológicas das formulações também fornecem informações valiosas sobre propriedades de estabilidade, consistência e capacidade de expansão a longo prazo (MILAN et al., 2007). Além disso, o estudo da estabilidade de produtos cosméticos, contribui para: orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado; fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade e fornecer informações para a sua confirmação; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (ANVISA, 2004).

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA MISTURAS SIMPLEX-CENTROIDE

O conceito de experimentos para mistura e sua análise foram introduzidos pela primeira vez por Scheffe em 1958. Com base nesses experimentos, alguns métodos de projeto de mistura modificados foram desenvolvidos, incluindo o método simplex-centroide. Esse método de delineamento é comumente aplicado em formulações de produtos industriais, por exemplo, processamento de alimentos, formulações químicas, fibras têxteis e medicamentos (JIAO et al., 2018).

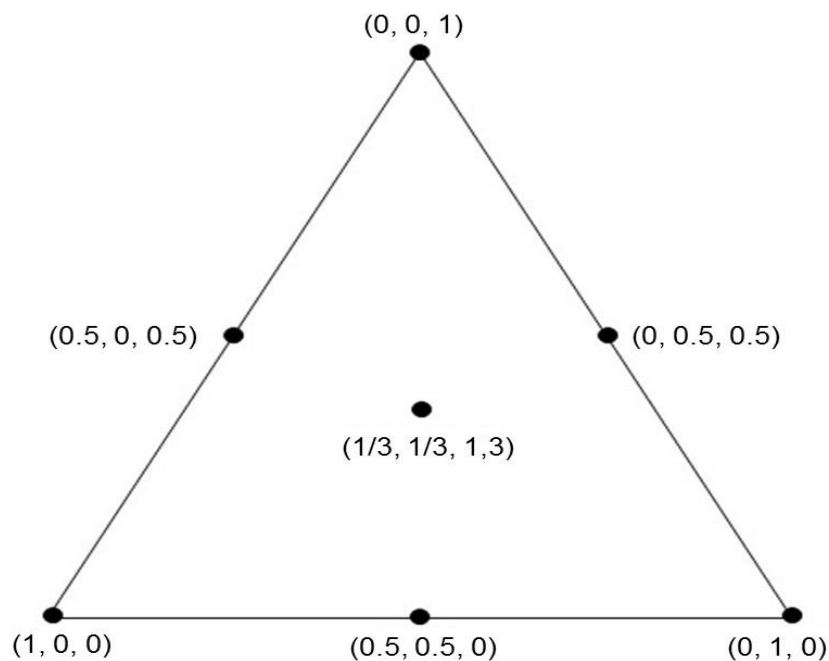
O espaço experimental do simplex-centroide, consiste em diferentes pontos distribuídos sobre um triângulo equilátero, representando as proporções dos materiais utilizados, onde estas, devem estar entre 0 e 1 e a soma da proporção de todos os componentes da mistura deve ser igual a 1 ou 100% (DIAS et al., 2019).

Se a mistura for composta por três componentes, o delineamento simplex-centroide é construído para formar um triângulo com pontos de dados localizados nas três vértices (componentes puros), três pontos

médios laterais (misturas binárias dos componentes) e um ponto central (mistura ternária dos componentes), totalizando sete experimentos (JIAO et al., 2018).

As sete execuções do planejamento simplex-centroide de três componentes são: $(1, 0, 0)$, $(0, 1, 0)$, $(0, 0, 1)$, $(0.5, 0.5, 0)$, $(0.5, 0, 0.5)$, $(0, 0.5, 0.5)$ e $(1/3, 1/3, 1/3)$, conforme mostrado na Figura 3. Dessa forma, o desenho de misturas simplex-centroide possibilita a obtenção de formulações com um número exato de experimentos, possibilitando a escolha da melhor condição para uma dada resposta através de variações na formulação de componentes específicos (MORAES FILHO et al., 2018).

Figura 3. Delineamento simplex-centroide para misturas de três componentes



Além da restrição de que a soma dos componentes variáveis deve ser igual a 100% numa experiência de mistura, restrições adicionais, tais como a determinação de limites superiores ou inferiores de cada componente também podem ser aplicadas (JIAO et al., 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NAS FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS

Para o desenvolvimento das formulações cosmecêuticas em gel aniônico e emulsão óleo/água foram utilizados os ingredientes: glicerina (Anidrol), álcool cetílico (Infinity pharma), álcool estearílico (All chemistry), Álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE (Infinity pharma), monoestearato de gliceril (Aqia), olivem 1000 (Biovital), oleato de decila (Galena), blend de conservante (Via farma), ciclometicone (Galena), Aristoflex® AVC (Pharma special) óleo essencial de canela (Laszlo) e óleo de amêndoas (Galena).

4.2 MICRORGANISMO E PRESERVAÇÃO

O *Bacillus subtilis* natto foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina – PR e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia - Campinas SP. O microrganismo foi preservado em meio contendo (g L^{-1}): peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20, mantido a 4 °C em câmara refrigerada. O repique ocorriam a cada quarenta e cinco dias.

4.3 INÓCULO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

Para a obtenção do inóculo foi utilizado o meio em (g L^{-1}): sacarose comercial 100; extrato de levedura 2; KH_2PO_4 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1; MgSO_4 ($7\text{H}_2\text{O}$) 0,5 (CALAZANS et al., 2000). O inóculo foi preparado em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio, incubado a 150 rpm, 24 h a 37 °C.

Posteriormente, os cultivos foram interrompidos por centrifugação (9000 rpm, 15 min a 4 °C), onde a biomassa obtida após a centrifugação foi lavada com água destilada e ressuspensa em solução salina cloreto de sódio (NaCl 0,9 %). Uma alíquota de 1 mL foi submetida a diluições seriadas para obter leituras de 0,2 a 0,8 de absorvância em $\lambda = 600 \text{ nm}$. Paralelamente, 3 alíquotas de 1 mL foram distribuídas em cadinhos, previamente tarados, e levados à estufa (70 °C), até atingir peso constante. Em

seguida, os dados foram plotados em um gráfico relacionando a absorvância (abs) e peso seco (g L^{-1}). Dessa forma, o inóculo foi padronizado em $0,2 \text{ g L}^{-1}$ para a processo fermentativo.

4.4 PRODUÇÃO DE LEVANA POR *BACILLUS SUBTILIS* NATTO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LEVANASACARASE

A produção de levana por *B. subtilis* natto foi no meio contendo (g L^{-1}): sacarose 400, extrato de levedura 2, KH_2PO_4 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 0,6, MnSO_4 0.2, citrato de amônio 0.25 (BERSANETI et al., 2017). Foi utilizado $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo em frascos de Erlenmeyer (2 L) contendo 500 mL de meio, em pH 7,0, 150 rpm, 37 °C por 24 h (BERSANETI, 2016). O cultivo foi interrompido por centrifugação a 9000 rpm, 15 min a 4°C. A levana foi obtida a partir do sobrenadante e a atividade da levanasacarase estimada por meio dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise da sacarose, em um ensaio reacional contendo 250 μL de sobrenadante, 250 μL de sacarose (1 M) e 500 μL de tampão de acetato (pH 5,0), incubada a 30 °C durante 30 min (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999). Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944) e uma unidade de atividade (U) foi expressa pela quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μg de açúcares redutores em 1 minuto, nas condições do ensaio.

4.5 SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LEVANA

Após a interrupção do cultivo, a separação de levana do sobrenadante ocorreu por precipitação em etanol absoluto, na proporção de 1:1,5 (sobrenadante : etanol), com predominância de levanas altas massas (PORRAS-DOMINGUES et al., 2015). Posteriormente, foram mantidas em repouso por 12 horas a 4°C e centrifugadas em 9000 rpm por 20 minutos, sendo o etanol descartado e evaporado das amostras. Em seguida, a levana precipitada foi dialisada contra água destilada por 48 horas, posteriormente liofilizada.

Para a quantificação da levana, essa foi submetida à hidrólise

ácida com HCl 0,1 M durante 1 h, a 100° C (VIKARI; GISLER, 1986). Posteriormente, a solução foi neutralizada com NaOH 1 M e a frutose resultante foi quantificada através de açúcares redutores segundo Somogyi (1952) e Nelson (1944).

4.6 CARACTERIZAÇÕES DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS ATIVOS (LEVANA E ÓLEO DE CANELA)

4.6.1. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante da levana e do óleo de canela foi determinada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme descrito por Srikanth et al. (2015b), nas concentrações de 1; 2; 4; 5; 8 e 10 mg mL⁻¹, uma solução de ácido ascórbico foi utilizada como padrão avaliada nas mesmas concentrações (SPAGNOL et al., 2019). A mistura reacional era composta por 1 mL da solução teste e 0,3 mL da solução de DPPH, incubada em ambiente escuro por 30 min em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda=517$ nm. Para o branco, foi utilizado 1 mL da amostra e 0,3 mL de etanol. O controle foi utilizado 1 mL de etanol e 0,3 mL da solução de DPPH. A taxa de inibição (%) do radical livre foi calculada conforme a equação 1:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs.do controle} - \text{Abs.da amostra})}{\text{Abs.do controle}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

4.6.2. Atividade Antimicrobiana

Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* para o teste de atividade antimicrobiana, por meio da técnica de antibiograma segundo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). As cepas bacterianas foram replicadas em 2 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37° C até atingir turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de *MacFarland* (1,5x10⁸ UFC/mL). Em seguida, alíquotas foram plaqueadas por

swab em meio ágar Müeller-Hinton. Discos contendo 15 µL dos ativos levana (10 mg mL⁻¹) e óleo de canela puro foram dispostos na placa e incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antibacteriana foi avaliada pela presença de halos de inibição (Bauer et al., 1966).

Também foi avaliada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de canela, onde, em microplacas, foram adicionados 100 µL do inóculo (1,5x10⁸ UFC/mL) diluídos em caldo BHI e 100 µL de diferentes concentrações do óleo, incubadas a 37 °C por 24 h. Uma coluna de poços foi utilizada como controle de crescimento, adicionando 100 µL do inóculo e 100 µL de BHI, e outro como controle de esterilidade do meio de cultura, adicionando apenas 200 µL de BHI. A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a menor concentração do óleo de canela testada, capaz de impedir o crescimento microbiano (CLSI, 2012).

4.6.3. Capacidade de Retenção de Umidade (Hidratação) da Levana

Para determinar a capacidade de retenção de umidade da levana foi utilizada 100 mg de levana produzida, do padrão de levana comercial de *Erwinia herbícola* (Sigma) e da glicerina (Shi et al., 2010). As amostras foram secas a 100 °C por 4 h. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de água e homogeneizado, colocados em dessecador de umidade selado com solução saturada de K₂CO₃ (43% umidade relativa - UR) em temperatura ambiente, durante 96 h (Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2013). A capacidade de retenção de umidade (Ru) foi avaliada pela percentagem de água residual nas amostras, calculado pela equação 2:

$$Ru (\%) = \frac{P_t}{P_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde, P₀ é o peso da água destilada adicionada as amostras e P_t é o peso da água após 96 h.

4.7 FORMULAÇÕES COSMECÊUTICAS

4.7.1 Formulação Tipo Emulsão em Óleo/Água (O/A)

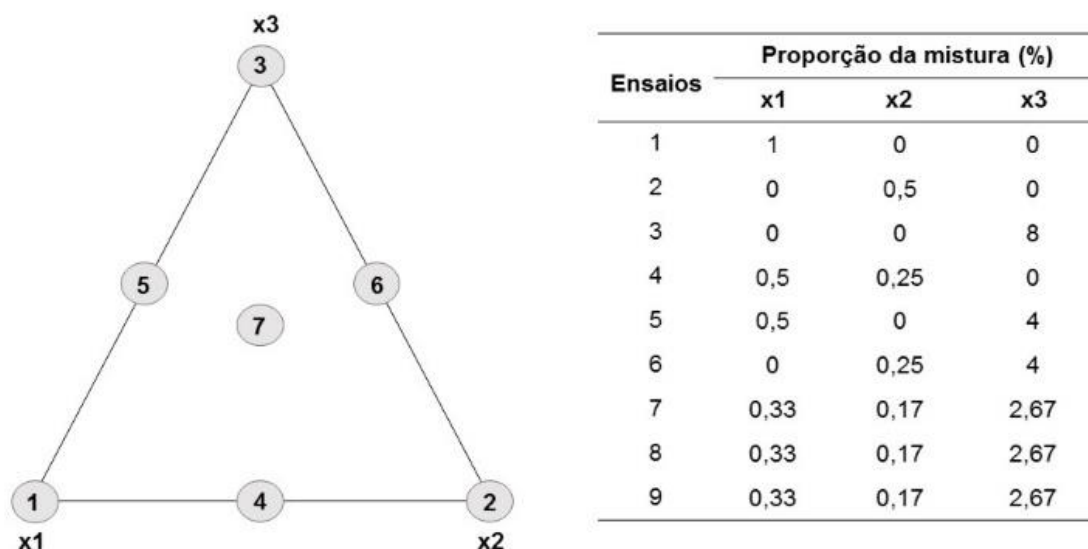
A formulação em emulsão foi desenvolvida com os componentes citados na Tabela 3. Para o preparo as fases 1 e 2 foram aquecidas simultaneamente até atingirem a temperatura de 75 °C. Posteriormente, a fase 2 foi vertida sobre a 1. Em seguida, as fases 3 e 4 foram adicionadas na temperatura inferior a 40 °C, sob agitação.

Tabela 3. Formulação base do tipo emulsão óleo/água (O/A)

Fases	Componentes	Concentração / 100 mL
1	Água destilada	72,3 mL
1	Glicerina	3,0 g
2	Álcool cetílico	4,0 g
2	Álcool estearílico	3,8 g
2	Álcool cetosteárico etoxilado 20 OE	3,0 g
2	Monoestearato de glicerila (MEG)	2,0 g
2	Olivem 1000	5,0 g
2	Cetiol V (Oleato de decila)	5,0 g
3	Phenogard	0,4 mL
4	Silicone volátil DC 245	1,5 mL

Para estudar as melhores concentrações dos princípios ativos (levana, óleo de canela e de amêndoa) foi utilizado um planejamento de misturas simplex-centroide com as três variáveis, sendo: x1 - Levana; x2 - Óleo essencial de canela; x3 - Óleo de amêndoas, nas concentrações máximas de 1%, 0,5% e 8%, respectivamente. As proporções dos ativos nas formulações cosmeceúticas estão apresentados na Figura 4, os pontos 1, 2 e 3 (vértices triangulares) correspondem aos componentes puros. Os pontos 4, 5 e 6 representam as misturas binárias de dois ingredientes e o ponto 7 (o centro do triângulo) corresponde a mistura ternária de três ingredientes. Os pontos 8 e 9 são as repetições do ponto central. Após preparadas, os pH das formulações foram ajustados dentro da faixa de 4,5 a 5,5 (pH médio da pele) com solução de ácido cítrico. A resposta avaliada pelo planejamento foi a viscosidade.

Figura 4. Planejamento de misturas simplex-centroide para o desenvolvimento da emulsão óleo/água com as proporções dos ativos Levana (x1); Óleo essencial de canela (x2) e Óleo de amêndoas (x3)



4.7.2 Formulação Gel Aniônico

Foram preparadas três formulações em gel aniônico com os componentes da Tabela 4. Inicialmente foram misturadas água e glicerina e aquecidas a 70 °C. Em seguida o Aristoflex® foi pulverizado sobre a mistura aquecida que estava sendo homogeneizada com o auxílio de agitador mecânico, até a formação do gel. Após o preparo dos géis foram incorporados os princípios ativos: levana 1,0 g (baseado na atividade antioxidante) e óleo essencial de canela em 0,5; 1 e 2 mL (5, 10 e 20 vezes acima da concentração inibitória mínima).

Tabela 4. Formulações de gel aniônico com levana (1,0 g) e óleo de canela (0,5; 1 e 2 mL)

Componentes	Concentração / 100 mL		
	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
Aristoflex®	2,0 g	2,0 g	2,0 g
Glicerina	2,0 g	2,0 g	2,0 g
Silicone volátil DC 245	1,0 g	1,0 g	1,0 g
Levana	1,0 g	1,0 g	1,0 g
Óleo de canela	0,5 mL	1 mL	2 mL
Água	93,5 mL	93 mL	93 mL

4.8 CARACTERIZAÇÕES DAS FORMULAÇÕES DO TIPO EMULSÃO EM ÓLEO/ÁGUA (O/A)

A formulação selecionada pelo planejamento foi caracterizada por 90 dias nas condições de exposição: temperatura alta (37 ± 2 °C), temperatura baixa (5 ± 2 °C), com exposição indireta ou direta à radiação luminosa e em temperatura ambiente (28 ± 2 °C). Cada formulação (100 g) foi exposta as diferentes condições (ANVISA, 2004).

Os parâmetros analisados foram estabilidade e espalhabilidade, propriedades físico-químicas, atividade antioxidante, capacidade de retenção de umidade (hidratação) e propriedades organolépticas nos tempos de 2, 30, 60 e 90 dias.

4.8.1 Análises de Estabilidade e Espalhabilidade

A estabilidade das formulações cosmeceúticas foram determinadas pelos testes de separação de fases e espalhabilidade. Para verificar se houve a separação de fases das formulações, foi utilizado o método de centrifugação (3000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente), com cinco gramas da formulação. O resultado foi observado por visualização macroscópica, após a centrifugação e 24 h de repouso. Os resultados foram dados como: N (normal, ou seja, sem separação de fases), SF (separação de fases ou coalescência) ou CR (cremeado) (ANVISA, 2004).

Para o teste de espalhabilidade, foram utilizadas placas de vidro sob papel milimetrado, cujo diâmetros perpendiculares formados por 1 g da amostra, foram medidos para determinar a superfície abrangente, em temperatura de 25 ± 2 °C (BORGHETTI; KNORST, 2006). Este método foi repetido utilizando pesos pré-determinados (2, 4 e 10 g) em intervalos de um minuto, Os cálculos seguiram a equação:

$$E_i = \frac{(d^2 \cdot \pi)}{4} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

E_i : Espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado (mm^2); d : Diâmetro médio em milímetro (mm).

4.8.2 Análises Físico-químicas

As características físico-químicas avaliadas neste trabalho, incluem o pH, densidade e viscosidade.

O pH foi por pHmetro digital em temperatura ambiente nas amostras diluídas em água destilada 1:10 (V / V) (GARBOSSA; CAMPOS, 2016).

A densidade (d) foi avaliada utilizando um picnômetro de vidro com volume de 10 mL em 20 °C, sendo utilizada como padrão a densidade da água. O picnômetro vazio foi pesado (M_0), em seguida foram adicionadas até transbordar, secadas e pesadas a água destilada (M_1) e posteriormente as formulações (M_2) (ANVISA, 2007). Para o cálculo foi utilizado a equação 5:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \quad (\text{Eq. 5})$$

A viscosidade foi avaliada por viscosímetro rotacional digital modelo Marte MDV-8. No qual, foram utilizados 200 g das amostras dispostas em um recipiente cilíndrico totalmente preenchido, neste foi imerso o spindle adequado de número 4 com velocidades de 0,3; 0,6; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 rpm, em 25 °C (ANVISA, 2007).

4.8.3 Atividade Antioxidante e Capacidade de Retenção de Umidade (Hidratação)

A atividade antioxidante das formulações foi avaliada em triplicata pela técnica do DPPH na concentração de 2,5 mg mL⁻¹, conforme Srikanth et al. (2015b) e a capacidade de retenção de umidade de acordo com Zhang et al. (2012) e Zhao et al. (2013), utilizando 1 g da formulação (triplicata).

4.8.5 Propriedades Organolépticas

As propriedades organolépticas de cor e odor foram avaliadas no tempo inicial e final. A cor através da análise visual (luz branca) e o odor

utilizando o olfato. Os resultados foram interpretados como: normal, levemente modificada, modificada e intensamente modificada (ANVISA, 2004).

4.9 CARACTERIZAÇÕES DAS FORMULAÇÕES EM GEL ANIÔNICO

As formulações em gel passaram por condições desestabilizadoras visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade, sendo submetidas a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento. Ciclos de 24 horas a 45 ± 2 °C, e 24 horas a 5 ± 2 °C, durante 15 dias (7 ciclos) (ANVISA, 2004). Durante esse período, as formulações foram avaliadas quanto a estabilidade, pH e propriedades organolépticas (cor e odor).

A estabilidade foi verificada pelo teste de separação de fases, utilizando o método de centrifugação (5 g de amostra, 3000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente) (ANVISA, 2004).

O pH foi medido nas amostras diluídas 1:10 (V / V) em água destilada em temperatura ambiente (Garbossa; Campos, 2016). O aspecto e a cor foram averiguados através da análise visual, em luz branca. A análise de odor pelo olfato (ANVISA, 2004).

Também foram avaliadas as atividades antioxidante e antimicrobiana. A atividade antioxidante na concentração de 20 mg mL^{-1} conforme a técnica descrita por Srikanth et al. (2015) e a atividade antimicrobiana foi de acordo com as normas do CLSI (2012), utilizando as cepas *S. aureus*, *Staphylococcus* spp, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Bauer et al., 1966). A esterilidade das formulações cosmecêuticas foram avaliadas em placas de ágar sangue por 48 h em 37 °C.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do delineamento de misturas simplex-centroide foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão utilizando o software Statistica versão 7.0.

Gráficos de contorno e de otimização de respostas foram gerados a partir dos dados de viscosidade. O modelo foi validado usando o teste t, onde o valor da melhor resposta dos experimentos foi comparado com as respostas apresentadas pela formulação cosmecêutica otimizada (estimadas pelo modelo).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de patente, capítulo de livro e artigos científicos.

5.1 PATENTE

Título: “Biocosmético facial multifuncional de levana e óleo de canela”

Autores: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Reginara Teixeira da Silva, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni, Ulisses de Pádua Pereira, Gabrielly Terassi Bersaneti, Briani Gisele Bigotto, Roberta Torres Chideroli, Nathalia Ramos Domingos e Júlia Klarosk Helenas.

Protocolada em: 06/ 11/ 2019

Resumo: A invenção se baseia em uma nova formulação cosmética facial multifuncional, com levana e óleo essencial de canela, como ingredientes ativos. Esse novo cosmético tem propriedades antioxidante, hidratante e antimicrobiana, em um único produto. Os efeitos antioxidante e hidratante serão dados pela levana, que irão auxiliar no processo de antienvhecimento da pele e atuando na eliminação de radicais livres. A atividade antimicrobiana será dada pelo óleo essencial de canela, que auxilia no tratamento de infecções e processos inflamatórios da pele além de ser conservante natural do biocosmético. Assim poderia dispensar o uso de compostos sintéticos, como os parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno e benzilparabeno) e fenoxietanol. A levana foi produzida por um microrganismo do gênero *Bacillus* (GRAS), um processo eficiente, sustentável e economicamente viável. Esse cosmético multifuncional vem em resposta às buscas da indústria de cosméticos e dos desejos dos consumidores, um único produto com diferentes propriedades para a saúde da pele. Os testes realizados nesta formulação facial demonstraram alta estabilidade, boa espalhabilidade e propriedades bioativas antioxidante e antimicrobiana.

5.2 CAPÍTULO DE LIVRO

Título do livro: A Produção do Conhecimento nas Ciências Biológicas

Título do capítulo: Produção de levana e sua aplicação em cosméticos

Autores: Reginara Teixeira da Silva, Gabrielly Terassi Bersaneti, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Publicado em: Atena Editora, 2019.

DOI: 10.22533/at.ed.7911925044

Link: <https://www.atenaeditora.com.br/wp-content/uploads/2019/04/E-book-A-Producao-do-Conhecimento-nas-Ciencias-Biologicas.pdf>

Resumo: Atualmente, o Brasil ocupa a 4^a posição no ranking mundial no consumo de cosméticos o que demonstra a grande procura por produtos principalmente os formulados com ingredientes bioativos, que não tragam danos ao meio ambiente e que confirmam efeitos benéficos à saúde da pele dos consumidores. Com o surgimento de novas matérias-primas a levana é uma biomolécula que tem sido estudada, por apresentar propriedades industrialmente

importantes, como capacidade de retenção de água, atividade antioxidante, anti-inflamatória, além de poder ser aplicada como estabilizante e espessante, o que à torna gradativamente competitiva quando comparada com moléculas sintéticas. A levana é um exopolissacarídeo de frutose produzida com substratos de baixo custo e apresenta aplicações industriais nos setores de cosméticos, farmacêutico, nanotecnologia, alimentos, entre outros. Sendo assim, o objetivo desta revisão é descrever a produção microbiana do polissacarídeo levana e a inovação de aplicação em cosméticos.

5.3 ARTIGO 1 (ACEITO NA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT)

Propriedades biológicas da levana de *Bacillus subtilis* natto e do óleo essencial de canela para aplicação em formulações cosmecêuticas**Biological properties of levan *Bacillus subtilis* natto and cinnamon essential oil for application in cosmeceutical formulations**

Reginara Teixeira da Silva^a, Gabrielly Terassi Bersaneti ^a, Roberta Torres Chideroli ^b, Ulisses de Pádua Pereira ^b, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni^c; Briani Gisele Bigotto^c; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi ^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, ^bDepartment of Preventive Veterinary Medicine, ^c Department of Pharmaceutical Sciences, Londrina State University- Paraná, Brazil

Resumo

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, Londrina State University, Londrina, Brazil.
E-mail address: macelligoi@uel.br

A levana e o óleo essencial de canela são princípios ativos que apresentam grande potencial de aplicação em produtos cosméticos por serem moléculas naturais com propriedades biológicas relevantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar as propriedades antioxidante, hidratante e antimicrobiana da levana de *Bacillus subtilis* natto e do óleo essencial de canela e desenvolver de um cosmético multifuncional. As formulações cosmeceúticas foram desenvolvidas a base de ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer, contendo levana a 1 % e óleo de canela a 0.5 %, 1% e 2 %. Os ativos levana e o óleo de canela apresentaram atividade antioxidante máxima de 58 % e 21 % respectivamente na concentração de 1 % (10 mg mL⁻¹). A levana demonstrou alta capacidade de hidratação de 92 % e o óleo essencial de canela com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A incorporação de 1% de levana nas formulações garantiu as atividades antioxidante e hidratante e com a associação do óleo de canela acrescentou atividade antimicrobiana. As formulações cosmeceúticas mostraram boa estabilidade por 15 dias, sendo assim a associação da levana e do óleo de canela resultou em um cosmético multifuncional.

Palavras-chave: Levana; Cosméticos; Antioxidante; Antimicrobiano; Óleo De Canela.

Abstract

Levan and cinnamon essential oil are active additives with high potential to application in cosmetic products to be natural molecules and present relevant biological properties. The aim of this study was to evaluate the antioxidant, moisturizing and antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* natto levan and cinnamon essential oil to develop a multifunctional cosmetic. Cosmeceutical formulations were made based on ammonium acryloyldimethyltaurate / VP copolymer with levan at 1% and cinnamon oil at 0.5%, 1% and 2%. Levan and cinnamon oil showed a maximum antioxidant activity of 58% and 21% respectively at a concentration of 1% (10 mg mL⁻¹). Levan presented moisturizing capacity of 92% and the cinnamon essential oil showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Levan incorporated at 1% in the formulations guaranteed the antioxidant and moisturizing activities and with the association of cinnamon oil added the antimicrobial activity. Cosmeceutical formulations showed good stability for 15 days, thus the combination of levan and cinnamon oil resulted in a multifunctional cosmetic.

Keywords: Levan; Cosmetics; Antioxidant; Antimicrobial; Cinnamon Oil.

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde da pele, principalmente em relação à sua aparência e ao envelhecimento, vem refletindo em uma grande demanda por novos produtos cosméticos, principalmente de origem natural, pois causam menos efeitos colaterais e não provocam danos ao meio ambiente (Morone et al., 2019).

Polissacarídeos possuem propriedades que os tornam adequados para uso em aplicações cosméticas. Em estudo realizado por Domżał-Kędzia et al. (2019) a levana de *Bacillus subtilis* demonstrou grande potencial pelas suas propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante, capacidade de retenção de umidade, com citotoxicidade e atividade hemolítica baixa, podendo ser aplicada como princípio ativo, sem apresentar riscos à saúde dos consumidores. As propriedades da levana como atividades de proliferação celular, hidratação e alívio da irritação (Kim et al., 2003), efeito clareador da pele (Furukawa; Tsuboi, 2006) e atividade anti-inflamatória (Srikanth et al., 2015) tem sido descritas.

A levana sintetizada pela levanasacarase de *B. subtilis* foi incorporada como princípio ativo de formulação biocosmética facial a base de ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer. Os resultados demonstraram alta atividade antioxidante, sendo 3,6 vezes maior do que à atividade da formulação base, onde o biocosmético permaneceu estável por 15 dias e a espalhabilidade do produto aumentou com a adição de levana (Celligoi et al., 2018).

Apesar da levana apresentar excelentes propriedades dermocosméticas, a associação de princípios ativos no mesmo sistema de entrega representa inovação na cosmetologia, pois aumenta a ação bioativa pré-existente, podendo ainda agregar novas propriedades ao produto (Lacatusu et al., 2018).

Os óleos essenciais são componentes naturais, com excelente potencial como princípio ativo, agindo como antimicrobianos e antioxidantes (Xu et al., 2019) e apresentam grande biodegradabilidade, biocompatibilidade o que podem ser agregados a outros compostos, como a levana, potencializando as propriedades do produto.

O óleo essencial de canela exibe uma variedade de atividades biológicas benéficas comprovadas, como ação antimicrobiana, antioxidante, atividades antitumorais e anti-inflamatórias (Nabavi et al., 2015; Ribeiro-Santos et al., 2017; Chuesiang et al., 2019). No entanto, a aplicação do óleo essencial de canela em formulações cosmeceúticas e/ou biomédicas é devido principalmente à sua alta eficiência na inibição do crescimento microbiano (Pandey et al., 2011; Herman et al., 2013; Zhang et al., 2016; Chuesiang et al., 2019; Vahedikia et al., 2019; Xu et al., 2019).

Formulações do tipo hidrogel contendo óleo essencial de canela, revelaram uma excelente atividade antibacteriana a longo prazo contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Wang et al., 2018). A atividade antifúngica de nanoemulsões

acrescidas de óleo essencial de canela também atuam na inibição de *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides* (Pongsumpun; Iwamoto; Siripatrawan et al., 2019).

Diante disso, o trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidante, hidratante e antimicrobiana da levana produzida por *B. subtilis* e do óleo essencial de canela para desenvolver uma formulação cosmeceutica multifuncional.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção da levana por *Bacillus subtilis* natto

A levana foi produzida por *Bacillus subtilis* natto em meio de fermentação em (g L^{-1}): sacarose, 400; extrato de levedura, 2; KH_2PO_4 , 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0,6; MnSO_4 , 0,2; citrato de amônio, 0,25 (Bersaneti et al., 2017). As fermentações foram em frascos de Erlenmeyer de 2 L com 500 mL do meio, pH 7,0, 150 rpm, 37 °C, durante 24 h (Bersaneti, 2016). As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9000 rpm por 15 min a 4 °C, do sobrenadante foi precipitada a levana com etanol absoluto (1:1,5 v/v) (sobrenadante: etanol) por 12 horas a 4°C e centrifugada a 9000 rpm por 20 minutos, predominando levana de alta massa (Viikari; Gisler, 1986). A levana foi dialisada contra água destilada por 48 h e liofilizada.

2.2. Atividades biológicas dos princípios ativos

2.2.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da levana e do óleo de canela foram testadas nas concentrações de 1; 2; 4; 5; 8 e 10 mg mL^{-1} (solubilizadas em dimetilsulfóxido - DMSO) pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrito por Srikanth et al. (2015). A mistura reacional foi composta por 1 mL das diferentes concentrações e 0,3 mL da solução de DPPH, incubada em ambiente escuro por 30 min em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda=517$ nm. Para os brancos, foram utilizados 1 mL de levana ou 1 mL de óleo de canela e 0,3 mL de etanol. O controle foi 1 mL de etanol e 0,3 mL da solução de DPPH. A solução de ácido ascórbico foi utilizada como padrão (Spagnol et al., 2019). A taxa de inibição foi calculada pela equação 1.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs.do controle} - \text{Abs.da amostra})}{\text{Abs.do controle}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

2.2.2. Atividade antimicrobiana

As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram utilizadas, seguindo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). As cepas bacterianas foram repicadas em 2 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37° C até atingir turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de *MacFarland* ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, alíquotas foram plaqueadas por swab em meio ágar Müeller-Hinton. Discos contendo 15 µL dos ativos levana (10 mg mL^{-1}) e óleo de canela puro foram dispostos na placa e incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antibacteriana foi avaliada pela presença ou ausência de halos de inibição (Bauer et al., 1966) e posteriormente determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com as normas do CLSI (2012).

2.2.3. Retenção de umidade (hidratação)

A levana de *B. subtilis*, os padrões de levana de *Erwinia herbícola* (Sigma) e a glicerina (Shi et al., 2010) foram secos em estufa a 100 °C por 4 h (100 mg). Posteriormente, foram adicionados 1 mL de água, homogeneizado e levados ao dessecador com solução saturada de K_2CO_3 (43% umidade relativa - UR), temperatura ambiente durante 96 h (Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2013). A capacidade de retenção de umidade (Ru) foi calculada pela equação 2:

$$\text{Ru (\%)} = \frac{\text{Pt}}{\text{P0}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde, P0 é o peso da água destilada adicionada as amostras e Pt é o peso da água após os tempos testados.

2.3. Preparo das formulações cosmecêuticas

Os ingredientes para as formulações cosmecêuticas: Ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer (Pharma Special), Glycerin (Anidrol), Cyclomethicone (Galena Química e Farmacêutica Ltda) e Cinnamomum Cassia oil (Laszlo).

As formulações em gel aniônico foram preparadas com a base de ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer (Aristoflex®) (2,0 g), Glycerin (2,0 g) e Cyclomethicone (1,0 g). A concentração de levana utilizada foi definida de acordo com

a resposta antioxidante e a concentração do óleo essencial de canela foi utilizada 5, 10 e 20 vezes acima da CIM.

Para o preparo da formulação foram misturadas água e glicerina e aquecidas a 70 °C. Em seguida o Aristoflex® foi pulverizado sobre essa mistura (homogeneizada por agitador mecânico) até a formação do gel, em seguida adicionado o cyclomethicone em temperatura inferior a 40 °C e a levana e o óleo essencial de canela foram incorporados ao gel.

2.4. Caracterização das formulações cosmecêuticas

2.4.1. Estabilidade preliminar

As amostras passaram por condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade, sendo submetidas a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento. Ciclos de 24 horas a 45 ± 2 °C, e 24 horas a 5 ± 2 °C, durante 15 dias (7 ciclos) (Brasil, 2004). Durante esse período, as formulações cosmecêuticas foram avaliadas quanto a estabilidade, pH e propriedades organolépticas (aspecto, cor e odor).

A estabilidade foi verificada pelo teste de separação de fases, utilizando o método de centrifugação (5 g de amostra, 3000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente). O resultado foi observado por visualização macroscópica, após a centrifugação e 24 h de repouso, sendo interpretados como: normal (sem separação de fases), separação de fases ou coalescência e cremeado (Brasil, 2004).

O pH foi medido nas amostras diluídas 1:10 (V / V) em água destilada em temperatura ambiente (Garbossa; Campos, 2016). O aspecto e a cor foram averiguados através da análise visual, em luz branca. A análise de odor pelo olfato (Brasil, 2004).

2.4.2. Propriedades biológicas

A atividade antioxidante foi avaliada nas formulações cosmecêuticas (20 mg mL^{-1}) conforme a técnica descrita por Srikanth et al. (2015) e a atividade antimicrobiana foi de acordo com as normas do CLSI (2012) utilizando as cepas *S. aureus*, *Staphylococcus* spp, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Bauer et al., 1966). A esterilidade das formulações cosmecêuticas foram avaliadas em placas de ágar sangue por 48 h em 37 °C.

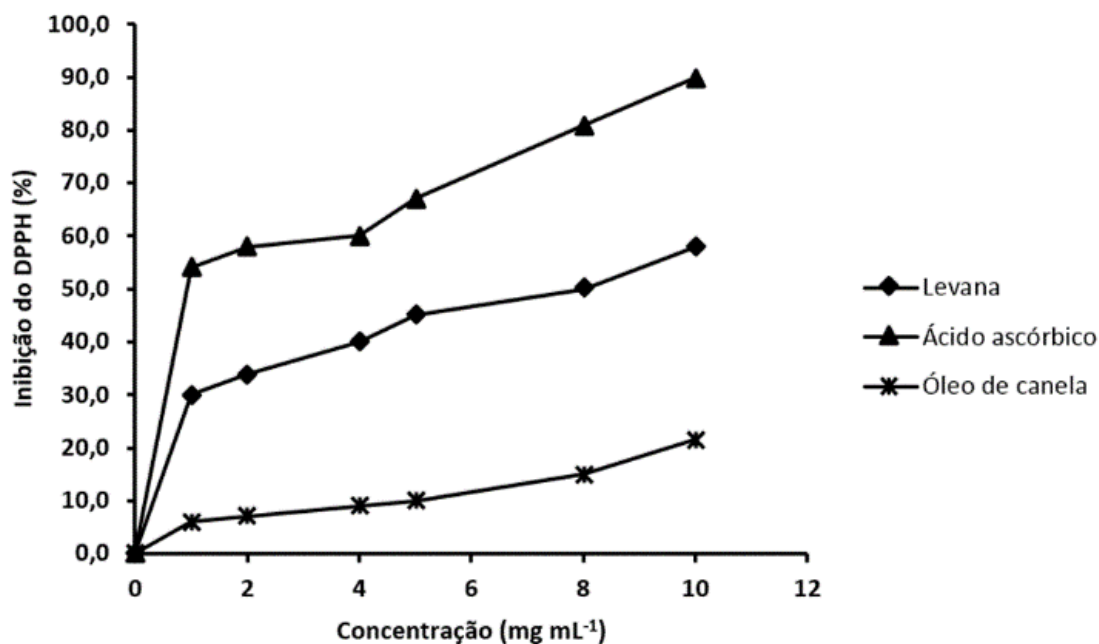
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividades biológicas dos princípios ativos

3.1.1. Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante da levana e óleo de canela comparado ao padrão de ácido ascórbico estão apresentados na Figura 1. A atividade aumentou com o aumento da concentração dos ativos.

Figura 1. Atividade de eliminação do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) da levana, padrão de ácido ascórbico, e óleo essencial de canela



A levana de *B. subtilis* natto demonstrou um aumento da atividade antioxidante com o aumento da até 10 mg mL⁻¹ onde a inibição foi de 58 %. A atividade antioxidante da levana já foi descrita por Liu et al. (2012), Srikanth et al. (2015), Domżał-Kędzia et al. (2019) e Taylan, Yilmaz e Dertli (2019).

Levanas de *B. subtilis* HMNIG-2 e *B. subtilis* MENO2 foram avaliadas pelo método do DPPH e demonstraram atividades de 48% e 40% respectivamente na concentração de 3 mg mL⁻¹ (Hamdy et al. 2017b), resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

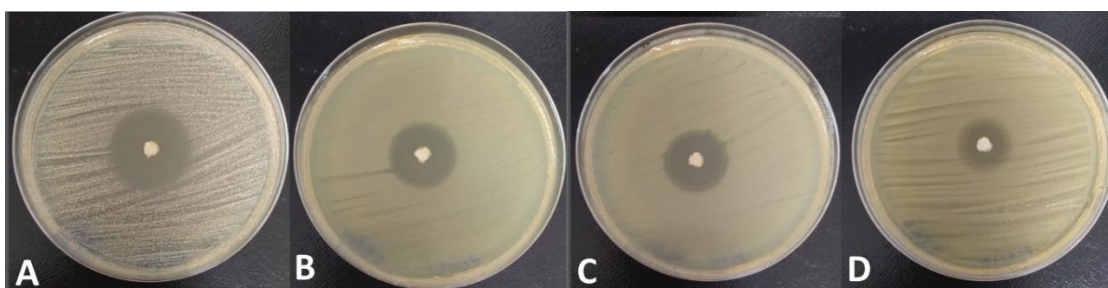
O óleo essencial de canela apresentou atividade antioxidante máxima de 21 % na concentração de 10 mg mL⁻¹, assim a associação dos ativos pode potencializar a ação. Os autores Moarefian et al. (2011), Subki et al. (2013) e El amrani et al. (2019) relatam a eliminação de radicais livres pela ação do óleo essencial de canela. Segundo Nurdjannah et al. (2012) essa ação se deve aos principais componentes do óleo o

eugenol e o acetato de eugenil.

3.1.2 Atividade antimicrobiana

O óleo essencial de canela mostrou atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas (Figura 2). Os halos de inibição foram de 32, 30, 29 e 21 mm (incluindo 5 mm do diâmetro do disco) para *Staphylococcus* spp (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (C) e *P. aeruginosa* (D) respectivamente.

Figura 2. Halos de inibição para *Staphylococcus* spp (A), *Escherichia coli* (B), *Staphylococcus aureus* (C) e *Pseudomonas aeruginosa* (D) frente ao óleo essencial de canela puro.



Os resultados aqui encontrados são semelhantes aos de Herman et al. (2013) que utilizando óleo essencial de canela, verificaram os halos de inibição de 44, 32 e 24 mm para *S. aureus*, *E. coli*, e *P. aeruginosa*, respectivamente.

A concentração inibitória mínima do óleo de canela foi de 1 mg mL^{-1} para todos os patógenos testados, resultados semelhantes aos de Zhang et al. (2016).

A concentração de levana testada (10 mg mL^{-1}) não apresentou atividade antimicrobiana contra os patógenos multirresistentes utilizados. Em concentrações maiores de 200 mg mL^{-1} e 300 mg mL^{-1} existem relatos que a levana de *Bacillus* sp. apresentou ação antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Asperigillus niger* (Hamdy et al., 2017a).

3.1.3. Retenção de umidade (Hidratação)

A capacidade de retenção de umidade (%) da levana produzida de *B. subtilis*, *Erwinia herbícola* (padrão) e a glicerina (padrão umectante) foram 92, 90 e 94%, respectivamente, em 96 h. Com base nesses resultados pode-se afirmar que em 43% (UR), a levana de *B. subtilis* retém uma grande quantidade de água em suas ligações de hidrogênio conforme citado por Domżał-Kędzia et al. (2019).

A capacidade de retenção de umidade pode variar conforme a estrutura química dos exopolissacarídeos. A presença de grupos polares e orientações espaciais são extremamente importantes para uma boa retenção de água (Chi et al., 2019).

Domżał-Kędzia et al. (2019) avaliaram a retenção de umidade em levana de alto peso molecular de *B. subtilis* natto KB1 e relataram uma porcentagem de retenção de umidade de 99,16 %. Os dados obtidos no presente estudo demonstram que a levana apresenta uma alta capacidade de hidratação para uso em formulações cosmeceúticas.

3.2. Caracterização das formulações cosmeceúticas

3.2.1. Estabilidade preliminar

As formulações se mantiveram estáveis durante os 15 dias, observado pela não separação de fases. A Tabela 1 mostra os valores de pH das formulações durante os 15 dias.

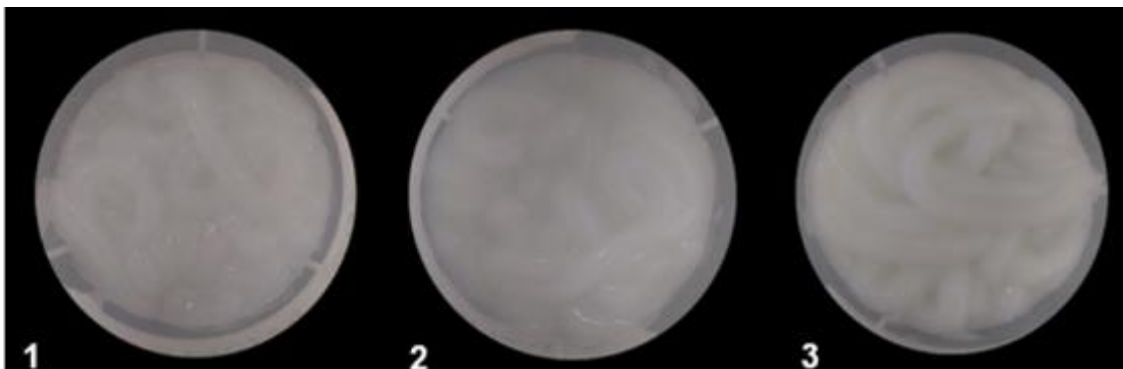
Tabela 1. Valores de pH das formulações cosmeceúticas de gel aniônico contendo levana (1%) e óleo de canela (0,5; 1 e 2%) durante 15 dias.

Formulações cosmeceúticas	0 dias	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias
Formulação 1 (levana + 0,5 % óleo de canela)	5,06	4,76	4,67	4,65	4,65	4,63
Formulação 2 (levana + 1 % óleo de canela)	4,54	4,21	4,18	4,17	4,15	4,15
Formulação 3 (levana + 2 % óleo de canela)	4,15	3,93	3,90	3,87	3,85	3,82

Inicialmente, as formulações contendo 0,5 e 1 % de óleo de canela apresentaram pH de 5,06 e 4,54 respectivamente, valores dentro da faixa do pH da pele (4,5 a 5,5) (Jurgelane; Sevjakova; Dzene, 2017). Com o aumento do tempo foi observado a redução de pH nas formulações cosmeceúticas e com 15 dias apenas a formulação 1 manteve o pH compatível com o da pele facial. As formulações com 1 e 2 % de canela, necessitariam de um pequeno ajuste de pH para aplicação industrial como formulação facial.

Com relação ao odor, as formulações apresentaram aroma característico de canela proporcional à concentração e manteve constante durante os 15 dias de teste. A cor e aspecto das formulações cosmeceúticas preparadas estão na Figura 3. O aumento da concentração de óleo de canela elevou a turbidez do gel, passando de translúcido para gel-creme. Com relação a cor houve uma leve modificação, passando de branco para amarelo pálido após 15 dias.

Figura 3. Propriedades organolépticas (cor e aspecto) das formulações 1 (0,5 %), 2 (1 %) e 3 (2 %) de óleo essencial de canela e levana a 1 %



3.2.2 Propriedades biológicas

A atividade antioxidante das formulações 1, 2 e 3 foram de 30 %, 35 % e 54 % e após 15 dias 35 %, 41 % e 59 % respectivamente. Essa propriedade que se manteve estável irá contribuir no retardo do envelhecimento da pele, considerando que os radicais livres estão fortemente associados a esse processo (Ni et al., 2018).

A atividade antimicrobiana aumentou proporcional à concentração de óleo de canela incorporada e contribuiu para garantir a esterilidade do produto gerado, como um conservante natural. A atividade antimicrobiana do óleo de canela foi descrita por Herman et al., 2013 que relaciona o aumento da atividade com a concentração. Neste estudo os autores incorporaram o 2,5% de óleo de canela em uma emulsão e observaram a inibição das linhagens testadas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Thormar (2011) afirma que a maioria dos óleos essenciais exibe atividade antimicrobiana na concentração abaixo de 5% (V / V).

O aumento da concentração do óleo de canela aumentou a ação antioxidante e acrescentou a atividade antimicrobiana e a levana garantiu as atividades antioxidante e hidratante, gerando assim um cosmético multifuncional.

4. CONCLUSÃO

A levana de *B. subtilis* e o óleo essencial de canela são bioativos com alto potencial de aplicação em cosméticos por apresentarem propriedades biológicas de grande interesse para a área, como atividade antioxidante, hidratante e antimicrobiana. As atividades antioxidante da levana e do óleo de canela foram de 58 % e 21 % respectivamente, na concentração de 10 mg mL⁻¹. O óleo de canela apresentou forte inibição contra *S. aureus*, *Staphylococcus* spp., *E. coli* e *P. aeruginosa*, e a levana

demonstrou um potencial de retenção de umidade de 92 %.

As formulações acrescidas de levana e óleo de canela apresentaram boa estabilidade e o aumento da concentração do óleo de canela reduziu o pH, o que necessitaria de um pequeno ajuste para aplicação industrial, como um cosmético facial.

A atividade antioxidante das formulações 1, 2 e 3 permaneceram estáveis após 15 dias atingindo 35 %, 41 % e 59 % respectivamente. A atividade antimicrobiana do óleo de canela inibiu os patógenos multirresistentes *S. aureus*, *Staphylococcus* spp., *E. coli* e *P. aeruginosa*.

A levana de *B. subtilis* e o óleo de canela associados geraram o desenvolvimento de uma formulação cosmeceutica com as propriedades antioxidante, hidratante e antimicrobiana em um único produto cosmético natural e sustentável.

REFERÊNCIAS

- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- Bersaneti, G. T.; Mantovan, J.; Magri, A.; Mali, S.; Celligoi, M. A. P. C. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.1132–1138, 2016.
- Bersaneti, G. T.; Pan, N. C.; Baldo, C.; Celligoi, M. A. P. C. Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with Potential Application in the Food Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.184, p.838-851, 2017.
- Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. v. 1, 52 p. Brasília, 2004.
- Celligoi, M. A. P. P.; Lonni, A. A. S. G.; Bersaneti, G. T.; Helenas, J. K.; Suwa, R. E.; Andrade, I. P. Biocosmético facial com propriedades antioxidantes pela adição de levana produzida pela levanasacarase de uma espécie de *Bacillus*. **Patente**, BR102018069609, 2018.
- CLSI (2012). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**. Disponível em: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>. Acesso em: 14 de junho de 2019.
- Chi, Y.; Ye, H.; Li, H.; Li, Y.; Guan, H.; Mou, H.; Wang, P. Structure and molecular morphology of a novel moisturizing exopolysaccharide produced by *Phyllobacterium* sp. 921F. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.135, p.998-1005, 2019.
- Chuesiang, P.; Siripatrawan, U.; Sanguandeeikul, Yang, J. S.; McClements, D. J.;

McLandsborough, L. Antimicrobial activity and chemical stability of cinnamon oil in oil-in-water nanoemulsions fabricated using the phase inversion temperature method. **LWT - Food Science and Technology**, v.110, p.190-196, 2019.

Domżał-Kędzia, M.; Lewińska, A.; Jaromin, A.; Weselski, M.; Pluskota, R.; Łukaszewicz, M. Fermentation parameters and conditions affecting levan production and its potential applications in cosmetics. **Bioorganic Chemistry**, 2019.

El amrani, S., El Ouali Lalami, A., Ez zoubi, Y., El Moukhafi, K., Bouslmati, R., & Lairini, S. Evaluation of antibacterial and antioxidant effects of cinnamon and clove essential oils from Madagascar. **Materials Today: Proceedings**, v.13, p.762–770, 2019.

Furukawa, M.; Tsuboi, T. Beautifully whitening agent. **Japanese patent** 2006052146, 2006. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/036029848/publication/JP2006052146A?q=Beautifully%20whitening%20agent%20levan>. Acesso em: 24 de julho de 2019.

Garbossa, W.A.C.; Maia Campos, P.M.B.G. *Euterpe oleracea*, *Matricaria chamomilla*, and *Camellia sinensis* as promising ingredients for development of skin care formulations. **Industrial Crops and Products**, v.83, p.1-10, 2016.

Hamdy, A. A.; Elattal, N. A.; Amin, M. A.; Ali, A. E. Mansour, N. M.; Awad, G. E. A.; Awad, H. M.; Esawy, M. A. Possible correlation between levansucrase production and probiotic activity of *Bacillus* sp. isolated from honey and honey bee. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p.33-69, 2017. (A)

Hamdy, A. A.; Elattal, N. A.; Amin, M. A.; Ali, A. E. Mansour, N. M.; Awad, G. E. A.; Farrag, A. R. H.; Esawy, M. A. In vivo assessment of possible probiotic properties of *Bacillus subtilis* and prebiotic properties of levan. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.13, p.190-197, 2017. (B)

Herman, A.; Herman, A. P.; Domagalska, B. W.; Młynarczyk, A. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. **Indian Journal of Microbiology**, v.53, p.232–237, 2013.

Jurgelane, I.; Sevjakova, S.; Szene L. Influence on illitic clay addition on the stability of sunflower oil in water emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.529, p.178-184, 2017.

Kim, K.; Kim, K.; Ryo, O.; Lee, T.; Kim, T. Cosmetic composition containing levan having cell proliferation, skin-moisturizing and irritation-alleviating effects. **Japanese Patent** 2003277225, 2003. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/JP2003277225A/en>. Acesso em: 18 de julho de 2019.

Lacatusu, I.; Arsenie, L. V.; Badea, G.; Popa, O.; Oprea, O.; Badea, N. New cosmetic formulations with broad photoprotective and antioxidative activities designed by amaranth and pumpkin seed oils nanocarriers. **Industrial Crops and Products**, v.123, p.424–433, 2018.

Liu, J.; Luo, J.; Ye, H.; Zeng, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in

vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.767-772, 2012.

Moarefian, M.; Barzegar, M.; Sattari, M. *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. **Journal of Food Biochemistry**, v.37, p.62-69, 2011.

Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V., Martins, R. (2019). Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach. **Algal Research**, v.41, p.1-9, 2019.

Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Nabavi, S. M. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. **Nutrients**, v.7, p.7729–7748, 2015.

Ni, S., Han, F., Wang, W., Han, D., Bao, Y., Han, D., Wang, H. Niu, L. Innovations upon antioxidant capacity evaluation for cosmetics: A photoelectrochemical sensor exploitation based on N-doped graphene/TiO₂ nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.259, p.963–971, 2018.

Nurdjannah, N.; Bermawie, N. Cloves. **Indonesian Agency for Agriculture Research and Development (IAARD)**, Indonesia, p.197-215, 2012.

Pandey, A.; Jagtap, J. V.; Polshettiwar, S. A. Formulation and evaluation of in-vitro antimicrobial activity of gel containing essential oils and effect of polymer on their antimicrobial activity. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p.234-237, 2011.

Pongsumpun, P.; Iwamoto, S.; Siripatrawan, U. Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.60, 2019.

Ribeiro-Santos, R.; Andrade, M.; Madella, D.; Martinazzo, A. P.; Moura, de A. G. M. L.; de Melo, N. R.; Sanches-Silva, A. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v.62, p.154–169, 2017.

Shi, X. L.; Zhang, J. J.; Song, H. F.; Wang, J. J.; Zhang, Z. S.; Zhang, Q. B. Polysaccharides from *Enteromorpha linza*: Purification and moisture-preserving activity. **Marine Science**, v. 37, p.81–85, 2010.

Srikanth, R.; Siddartha, G.; Sundhar Reddy, C. H. S. S.; Harish, B.S.; Janaki Ramaiah, M.; Uppuluri, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate Polymers**, v.123, p.8-16, 2015.

Spagnol, C. M.; Assis, R. P.; Brunetti, I. L.; Isaac, V. L. B.; Salgado, H. R. N.; Corrêa, M. A. In vitro methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.219, p.358-366, 2019.

Subki, S.Y.M.; Jamal, J.A.; Husain, K.; Manshoor, N. Characterisation of leaf essential

oils of three *Cinnamomum* species from Malaysia by gas chromatography and multivariate data analysis. **Pharmacognosy Journal**, v.5, p.22-29, 2013.

Taylan, O.; Yilmaz, M. T.; Dertli, E. Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.136, p.436-444, 2019.

Thormar H. **Antibacterial and antifungal activities of essential oils**. In: Lipids and essential oils as antimicrobial agents. Wiley, Chichester, p.256–293, 2011.

Vahedikia, N.; Garavand, F.; Tajeddin, B.; Cacciotti, I.; Jafari, S. M.; Omidi, T.; Zahedi, Z. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2019.

Viikari, L., Gisler, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas strains*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 23, p. 240–244, 1986.

Wang, J.; Lia, Y.; Gao, Y.; Xie, Z.; Zhou, M.; He, Y.; Wu, H.; Zhou, W.; Dong, X.; Yang, Z.; Hu, Y. Cinnamon oil-loaded composite emulsion hydrogels with antibacterial activity prepared using concentrated emulsion templates. **Industrial Crops and Products**, v.112, p.281-289, 2018.

Xu, T.; Gao, C.; Feng, X.; Huang, M.; Yang, Y.; Shen, X.; tang, X. Cinnamon and clove essential oils to improve physical, thermal and antimicrobial properties of chitosan-gum arabic polyelectrolyte complexed films. **Carbohydrate Polymers**, v.217, p.116-125, 2019.

Zhang, Z.; Wang, X.; Han, Z.; Zhao, M.; Yin, L. Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2332–2337, 2012.

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., Quek, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v.59, p.282–289, 2016.

Zhao, L.; Fan, F.; Wang, P.; Jiang, X. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. **Biotechnological products and process engineering**, v. 87, p.2841–2850, 2013.

5.4 ARTIGO 2 (SERÁ SUBMETIDO A REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES)

Incorporação de moléculas bioativas em formulação cosmeceutica facial utilizando o delineamento simplex centroide

Incorporation of the bioactive molecules in facial cosmetic formulation using the centroid simplex design

Reginara Teixeira da Silva^a, Gabrielly Terassi Bersaneti^a, Eduarda Mendes Costa^a, Briani Gisele Bigotto^b, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni^b, Dionísio Borsato^c and Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{a*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, ^b Department of Pharmaceutical Sciences, ^c Department of Chemistry. State University of Londrina- Paraná, Brazil

Resumo

A adição de moléculas naturais bioativas em cosméticos é uma tendência no mercado atual. Isso adiciona propriedades e aprimora o produto. O objetivo desta pesquisa foi produzir uma formulação cosmeceutica facial com levana e óleos de canela e amêndoas por um delineamento de mistura simplex-centroide. A viscosidade foi avaliada como resposta do planejamento. As formulações foram desenvolvidas nas concentrações máximas de 1 g, 0,5 ml e 8 ml de levana, óleo essencial de canela e óleo de amêndoa, respectivamente. A melhor formulação com a viscosidade desejada foi de 75% de levana, sem a adição de óleo de canela e 25% de óleo de amêndoas. Esta formulação foi caracterizada por 90 dias sob diferentes condições de exposição. A formulação apresentou alta estabilidade no período, com espalhabilidade de 805 mm², pH e densidade ideais para a área de aplicação cosmeceutica, viscosidade com comportamento não-newtoniano, propriedades organolépticas normais, atividade antioxidante máxima de 72% e capacidade de hidratação de 100,3%, quando armazenado em temperatura ambiente e baixa, sem exposição à radiação luminosa. As formulações faciais desenvolvidas apresentaram potencial de aplicação na área facial, com altas propriedades hidratantes e antioxidantes e importante estabilidade por um longo período, uma característica fundamental para aplicação em formulações cosmeceuticas.

Palavras-chave: Levana; Óleo de amêndoas; Cosméticos; Antioxidante; Hidratante.

Abstract

Bioactive natural molecules in cosmetics are a trend in the current market. This adds properties and enhances the product. The aim this research was produce a facial cosmeceutical formulation with levan, cinnamon and almonds oils by a simplex-centroid mix design and the viscosity with response. Formulations were developed in

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, Londrina State University, Londrina, Brazil.
E-mail address: macelligoi@uel.br

the maximum concentrations of 1 g, 0.5 ml and 8 ml of levan, cinnamon essential oil and almond oil respectively. The best formulation with the desired viscosity was 75% levan, without the addition of cinnamon oil and 25% almond oil. This formulation was characterized for 90 days under different exposure conditions. The formulation showed high stability during the period, with 805 mm² spreadability, ideal pH and density for the application area of cosmetic, viscosity with non-Newtonian behavior, normal organoleptic properties, maximum antioxidant activity of 72% and hydrating capacity of 100.3% , when stored at room and low temperature, without exposure to light radiation. Facial formulation developed showed potential for application in the face area, with high moisturizing and antioxidant properties and important stability over a long time, a fundamental characteristic to application on cosmetic formulation.

Keywords: Levan; Almond oil; Cosmetics; Antioxidant; Moisturizer.

1. Introdução

A pele sofre progressivas alterações morfológicas e fisiológicas com o aumento da idade e fornece a primeira evidência óbvia do processo de envelhecimento (Zouboulis et al., 2019), podendo este, ser causado por fatores genéticos (envelhecimento endógeno) e por fatores extrínsecos ao estilo de vida (envelhecimento exógeno), como exposição crônica à luz, poluição, radiação ionizante, produtos químicos ou toxinas (Im et al., 2018; Zouboulis et al., 2019).

Embora existam várias teorias sobre os mecanismos que contribuem para esse processo, a teoria da oxidação considera que os radicais livres devem ser o ponto chave para o envelhecimento da pele (Amarowicz et al., 2004). Os radicais livres são subprodutos normais dos processos metabólicos e por serem quimicamente instáveis, possuem a capacidade de capturarem oxigênio de outras moléculas biologicamente ativas, levando a danos aos tecidos e, conseqüentemente contribuindo ao processo de envelhecimento da pele (Jaradat et al., 2018).

Assim a ação antioxidante e a capacidade de retenção de umidade dos ingredientes cosméticos são de grande importância no retardo desse processo (Jiménez-Pérez et al., 2018). Os antioxidantes sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado, (BHT), pela facilidade de produção, são amplamente utilizados. No entanto, certos estudos sugerem que o alto consumo de antioxidantes sintéticos resulta em riscos potenciais à saúde. Sato et al. (1987) verificaram que a aplicação tópica de BHA e BHT na pele dorsal de camundongos induziu tumores de pele em 15% e 35%, respectivamente. Além disso, esses compostos são potencialmente preocupantes para o meio ambiente. Apesar de ser degradável, o BHT possui potencial

de bioacumulação (moderado a alto) e alta toxicidade aquática (Nicnas, 2017). Dessa forma, o uso de produtos naturais na cosmetologia atual é uma tendência como citado por Lacatusu et al., (2018).

O exopolissacarídeo levana é uma molécula microbiana, que apresenta alta ação antioxidante comprovada pelos estudos de Liu et al. (2012) Srikanth et al. (2015), Domżał-Kędzia et al. (2019) e Taylan, Yilmaz e Dertli (2019). Também apresenta propriedades de hidratação e alívio da irritação da pele (Kim et al., 2003), ação anti-inflamatória (Srikanth et al., 2015) e efeito clareador da pele (Furukawa; Tsuboi, 2006), possibilitando a sua aplicação em formulações cosmecêuticas.

Celligoi et al., 2018 incorporaram a levana de *Bacillus subtilis* como princípio ativo de formulação biocósmética facial com a base de ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer. O biocósmético apresentou atividade antioxidante 3,6 vezes maior do que à atividade da formulação base (padrão) e a espalhabilidade do produto aumentou com a adição de levana, permanecendo estável por 15 dias.

A levana apresenta uma alta ação antioxidante e a associação de princípios ativos no mesmo sistema de entrega, representa inovação na cosmetologia, pois o aumento da ação bioativa é uma condição obrigatória para projetar novas formulações cosmecêuticas (Lacatusu et al., 2018). O óleo de amêndoas é comumente utilizado na indústria de cosméticos, em cremes para a pele e produtos antienvhecimento, devido as suas propriedades como emoliente, hidratante e antioxidante (Ahmad, 2010), além disso, também foi relatado o seu efeito fotoprotetor por Sultana et al. (2007). O óleo essencial de canela é outro componente que apresenta atividades antioxidante e antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos (Pandey, Jagtap, Polshettiwar, 2011; Herman et al., 2013; Zhang et al., 2016; Vahedikia et al., 2019), podendo ser adicionado em formulações cosmecêuticas, potencializando a ação antioxidante e agregando a propriedade antimicrobiana ao produto.

Na cosmetologia, as emulsões do tipo óleo em água (o/a) e água em óleo (a/o) são comumente conhecidas e utilizadas como sistemas de transporte de ingredientes ativos, melhorando sua distribuição e permeação na pele (Igielska-Kalwat et al., 2019). Variando as proporções dos ingredientes da formulação, podem ser produzidas emulsões com excelente estabilidade e viscosidade ajustáveis conforme área de aplicação (Binder et al., 2019).

Após definida a área de aplicação, o ajuste dos parâmetros como a viscosidade

pode ser definido por delineamento de misturas, incluindo o método simplex-centroide (Jiao et al., 2018), que possibilita conhecer a melhor condição para uma dada resposta através de variações na formulação de componentes específicos (Moraes Filho et al., 2018). Por esse motivo, esse delineamento é comumente aplicado em formulações de produtos industriais, incluindo o processamento de alimentos, cosméticos e medicamentos (Jiao et al., 2018).

A estabilidade das formulações, é um dos dados mais críticos para as indústrias farmacêutica e cosmética. O principal parâmetro usado para prever o prazo de validade da formulação, é a variação de temperatura, mas a exposição à luz solar, também deve ser considerada. Portanto, as formulações são armazenadas sob várias condições e são analisadas periodicamente de 3 a 6 meses (Igielska-Kalwat et al., 2019).

Neste estudo, a associação de levana, óleo de amêndoas e de canela foi para desenvolver um novo produto cosmético com maior desempenho bioativo, utilizando delineamento de misturas simplex-centroide para se encontrar a viscosidade ideal do produto.

2. Material e métodos

2.1. Insumos

Levana de *Bacillus subtilis* natto obtida via fermentação, Glicerina (INCI Name: Glycerin), Álcool cetílico (INCI Name: Cetyl Alcohol), Álcool estearílico (INCI Name: Cetearyl Alcohol), Álcool cetosteárico etoxilado 20 OE (INCI Name: Cetareth - 20), Monoestearato de glicerila (INCI Name: Glyceryl Stearate), Olivem 1000 (INCI Name: Cetearyl Olivatate), Oleato de decila (INCI Name: Decyl Oleate), Blend de conservante (INCI Name: Phenoxyethanol, methylisothiazolinone and benzisothiazolinone), Ciclometicone (INCI Name: Cyclopentasiloxane), Óleo de amêndoas doce (INCI name: Prunus Amygdalus Dulcis Oil) e Óleo essencial de canela (INCI Name: Cinnamomum cassia Oil).

2.2. Produção da levana por *Bacillus subtilis* natto

A levana foi produzida por *Bacillus subtilis* natto no meio de fermentação em (g L⁻¹): sacarose, 400; extrato de levedura, 2; KH₂PO₄, 1; (NH₄)₂SO₄, 3; MgSO₄(7H₂O), 0,6; MnSO₄, 0,2; citrato de amônio, 0,25 (Bersaneti et al., 2017). A fermentação ocorreu em frascos de Erlenmeyer de 2 L com 500 mL de meio, pH 7,0, 150 rpm, 37 °C, durante 24 h e 0,2 g L⁻¹ de inóculo (Bersaneti, 2016). A fermentação foi interrompida por

centrifugação a 9000 rpm, 15 min a 4 °C, e a levana foi precipitada do sobrenadante com etanol absoluto 1:1,5 V/V (meio: etanol), por 12 horas a 4°C e centrifugada a 9000 rpm por 20 minutos, separando a levana de alta massa (4146 kDa) (Viikari; Gisler, 1986). A levana foi dialisada contra água destilada por 48 h e liofilizada.

2.3. Formulações cosmecêuticas

As formulações desenvolvidas foram do tipo emulsão óleo/água (O/A) e estudadas por um planejamento de misturas simplex-centroide com nove formulações variando os componentes X_1 (levana), X_2 (óleo de canela) e X_3 (óleo de amêndoas). As concentrações máximas dos componentes foram de 1 g, 0,5 mL e 8 mL para as variáveis X_1 , X_2 e X_3 , respectivamente (Tabela 1). A variável resposta foi a viscosidade, por ser um parâmetro importante para cosmético facial.

Tabela 1. Planejamento de misturas simplex-centroide para desenvolvimento de uma formulação cosmecêutica facial com levana de *B. subtilis*, óleo de canela e óleo de amêndoas tendo como resposta a viscosidade

Ensaio	Níveis dos fatores (%)			Variável resposta
	X_1	X_2	X_3	Viscosidade (cP)
1	100	0	0	33733
2	0	100	0	26645
3	0	0	100	42079
4	50	50	0	41413
5	50	0	50	35394
6	0	50	50	38575
7	33,3	33,3	33,3	32435
8	33,3	33,3	33,3	31939
9	33,3	33,3	33,3	31473

Símbolos	Fatores	Níveis decodificados		
		100 %	50 %	33,3 %
(X_1)	Levana (g)	1	0,5	0,333
(X_2)	Óleo de canela (mL)	0,5	0,25	0,17
(X_3)	Óleo de amêndoas (mL)	8	4	2,67

O preparo das formulações foi pelo método de emulsificação de inversão de fases. A fase 1 com 72,3 mL de água destilada e 3,0 g de glicerina e a fase 2 por 4,0 g de álcool cetílico, 3,8 g de álcool estearílico, 3,0 g de álcool cetosteárico etoxilado 20 OE, 2,0 g de monoestearato de glicerina, 5,0 g de olivem 1000 e 5,0 g de oleato de decila. As fases 1 e 2 foram aquecidas até 75 °C e a fase 2 foi vertida sobre a 1, sob agitação e em temperatura inferior a 40 °C foram adicionados 0,4 mL de conservante, 1,5 mL de ciclometicone e a levana, óleos de amêndoas e de canela conforme Tabela 1. As formulações foram ajustadas a pH 4,5 com solução de ácido cítrico.

2.4. Caracterização da formulação

A formulação selecionada pelo planejamento foi caracterizada por 90 dias nas condições de exposição: temperatura alta (37 ± 2 °C), temperatura baixa (5 ± 2 °C), com exposição indireta ou direta à radiação luminosa e em temperatura ambiente (28 ± 2 °C). Cada formulação (100 g) foi exposta as diferentes condições (ANVISA, 2004)

Os parâmetros estabilidade e espalhabilidade, propriedades físico-químicas, atividade antioxidante, capacidade de retenção de umidade (hidratação) e propriedades organolépticas foram analisados nos tempos de 2, 30, 60 e 90 dias.

2.4.1. Estabilidade e espalhabilidade

A estabilidade foi verificada pela separação de fases. Cinco (5) gramas da formulação foi centrifugada a 3000 rpm, por 30 minutos a temperatura ambiente. O resultado foi por visualização macroscópica, após a centrifugação e 24 h de repouso, sendo interpretados como: normal (sem separação de fases), separação de fases (coalescência) e cremeado (ANVISA, 2004).

A espalhabilidade foi avaliada com 1 g da amostra utilizando placas de vidro sob papel milimetrado. Os diâmetros perpendiculares formados foram medidos para determinar a superfície abrangente, em temperatura de 25 ± 2 °C (Borghetti; Knorst, 2006). Foram utilizados pesos de 2, 4 e 10 g em intervalos de um minuto, os testes foram em triplicatas. Os cálculos seguiram a equação 1:

$$E_i = \frac{(d^2 \cdot \pi)}{4} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

E_i : Espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado (mm^2); d : Diâmetro médio em milímetro (mm).

2.4.2. Análises físico químicas

O pH foi medido nas amostras diluídas em água destilada (10%) (Garbossa; Campos, 2016).

A densidade (d) foi avaliada utilizando um picnômetro de vidro com volume de 10 mL em 20 °C, sendo utilizada como padrão a densidade da água. O picnômetro vazio foi pesado (M_0), em seguida foram adicionadas até transbordar, secadas e pesadas a água

destilada (M_1) e posteriormente a formulação (M_2) (ANVISA, 2007). Para o cálculo foi utilizado a equação 2:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \quad (\text{Eq. 2})$$

A viscosidade foi determinada por viscosímetro rotacional digital modelo Marte MDV-8. Foram utilizadas 200 g da formulação e o spindle de número 4 com velocidades de 0,6; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 rpm (taxas de cisalhamento) a 25 °C (ANVISA, 2007). Os resultados foram plotados em gráfico correlacionando a viscosidade aparente dada em cP (centiPoise) e a taxa de cisalhamento.

2.4.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Para o ensaio 1 mL da amostra (formulação a 2,5 mg mL⁻¹) e 0.3 mL da solução de DPPH foram incubadas no escuro por 30 min em temperatura ambiente seguida de leituras a $\lambda=517$ nm. O branco usado era composto por 1 mL da formulação e 0.3 mL de etanol e o controle com 1 mL de etanol e 0,3 mL da solução de DPPH (Srikanth et al. 2015). A taxa de inibição (%) do radical livre foi calculada conforme a equação3:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs.do controle} - \text{Abs.da amostra})}{\text{Abs.do controle}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

2.4.4. Capacidade de retenção de umidade (hidratação)

Foi avaliada por gravimetria segundo Zhang et al. (2012) e Zhao et al. (2012). Em cadinhos previamente tarados foram misturados 1 g da formulação e 1 mL de água. Os cadinhos foram armazenados por 96 h (temperatura ambiente) em dessecador de umidade selado com solução saturada de K₂CO₃ (43% umidade relativa - UR). A capacidade de retenção de umidade (Ru) foi avaliada pela percentagem de água residual nas amostras, calculado pela equação 4:

$$\text{Ru (\%)} = \frac{P_t}{P_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde, P₀ é o peso da água destilada adicionada as amostras e P_t é o peso da água após os tempos testados.

2.4.5. Propriedades organolépticas

A cor e o odor da formulação foram avaliados nos tempos inicial e final (2 e 90 dias). A cor foi verificada através da análise visual, em luz branca e o odor utilizando o olfato. Os resultados foram interpretados como: N: normal (sem alteração), LV: levemente modificada, M: modificada e IM: intensamente modificada (ANVISA, 2004).

2.5. Análise estatística

Os resultados do delineamento de misturas simplex-centroide foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão utilizando o software Statistica versão 7.0.

Gráficos de contorno e de otimização de respostas foram gerados a partir dos dados de viscosidade. O modelo foi validado usando o teste t, onde o valor da melhor resposta dos experimentos foi comparado com as respostas apresentadas pela formulação cosmecêutica otimizada (estimadas pelo modelo).

3. Resultados e Discussão

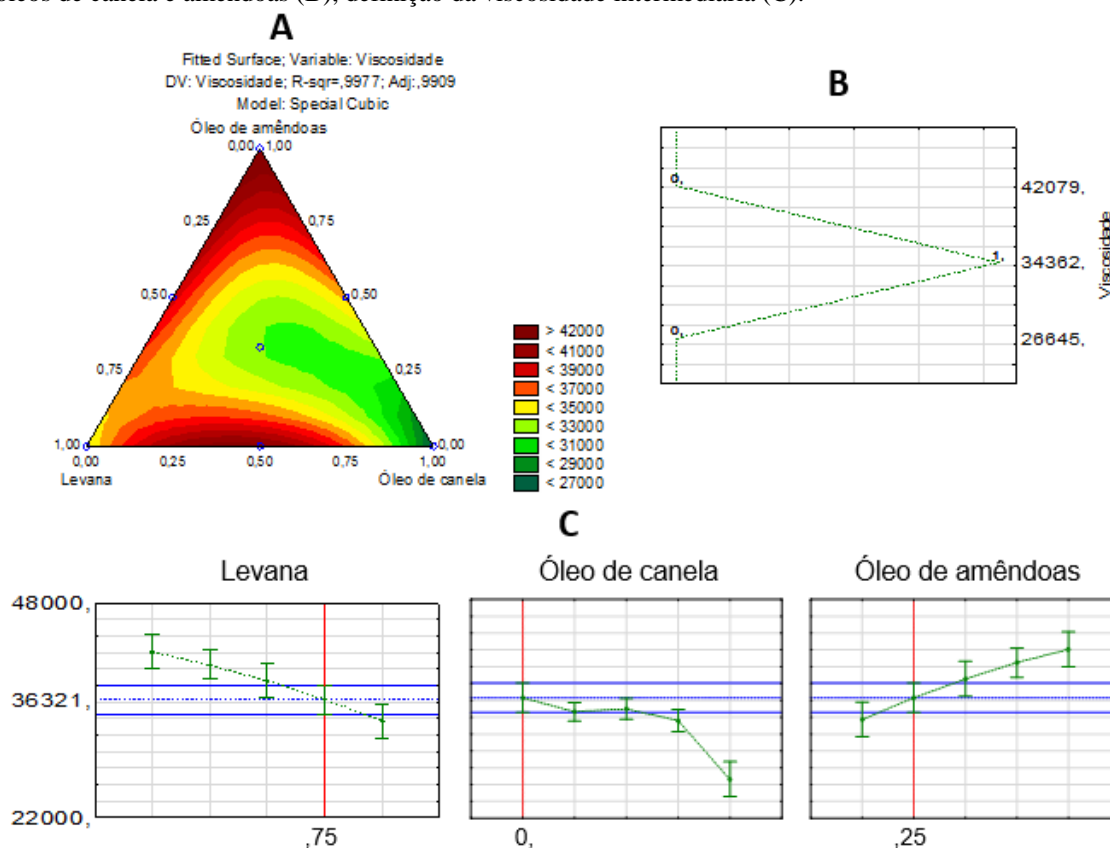
3.1. Análise das formulações cosmecêuticas

As respostas de viscosidade avaliada pelo planejamento de mistura simplex estão na Tabela 1. A viscosidade é um parâmetro fundamental em produtos cosméticos, capaz de determinar a consistência e/ou fluidez apropriadas para região de aplicação e os limites de aceitação devem ser definidos pelo formulador, considerando a percepção visual e sensorial decorrida de alterações (Anvisa, 2004). A formulação com 100% de óleo de amêndoas (ensaio 3) apresentou maior viscosidade (42079 cP) e formulação contendo apenas óleo de canela (ensaio 2) a menor (26645 cP). No entanto, por se tratar de um hidratante facial é adequado uma viscosidade intermediária que atende as exigências do produto. A Figura 2B apresenta a viscosidade intermediária (34362 cP) ideal para o cosmético com 75% de levana, 25% de óleo de amêndoas e sem a adição de óleo de canela. A Figura 2C mostra que na otimização da formulação nessas condições o resultado foi de 36321cP e quando foi validada (triplicata), o resultado obtido da viscosidade média foi de 32925 cP ($p < 0,05$) não apresentando diferença significativa entre o predito e o experimental, garantido assim a otimização da formulação.

Desta forma, a formulação com 75% de levana e 25% de óleo de amêndoas foi produzida e caracterizada por um período de 90 dias em diferentes condições de

exposição, para verificação da estabilidade.

Figura 2. Gráfico de superfície de resposta (A), otimização da viscosidade com variação de levana e óleos de canela e amêndoas (B), definição da viscosidade intermediária (C).



3.2. Caracterização da formulação

3.2.1. Estabilidade e espalhabilidade

A formulação foi classificada como normal pois não apresentou separação de fases ou modificação visível nos tempos estudados até 90 dias.

A espalhabilidade indica a área na qual uma formulação tópica se espalha na pele em mm^2 . De acordo com os resultados foi possível observar que em 90 dias todas as formulações apresentaram uma espalhabilidade similar média de 805 mm^2 , a amostra exposta a radiação luminosa apresentou espalhabilidade inferior. Esse parâmetro desempenha um papel fundamental na determinação da eficácia e da aceitação do produto pelo consumidor (Montenegro et al., 2015). Alguns autores relataram uma relação entre viscosidade e espalhabilidade para formulações tópicas (Lardy et al., 2000;

Garg et al., 2002), sugerindo que quanto menor a viscosidade e a tensão superficial maior será a espalhabilidade na pele.

3.2.2. Análises físico-químicas

Os resultados de pH podem ser observados na Tabela 2. A densidade das amostras estava normal, não apresentando alterações com 90 dias.

Tabela 2. Valores de pH da formulação cosmecêutica com 2, 30, 60 e 90 dias, em diferentes condições de exposição.

Exposição	2 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Radiação luminosa	4,5	4,3	4,2	4,2
Sem radiação luminosa	4,5	4,5	5,0	4,9
Temperatura alta	4,5	4,4	4,4	4,3
Temperatura baixa	4,5	4,9	4,9	4,9
Temperatura ambiente	4,5	4,6	4,8	4,8

Em 90 dias de exposição à radiação luminosa e temperatura elevada a formulação apresentou uma queda de pH, ficando fora da faixa de pH da pele (4,5 a 5,5). Quando mantida em temperatura baixa, temperatura ambiente e sem exposição à radiação luminosa a formulação apresentou um aumento do pH, mantendo-se dentro da faixa de pH ideal da pele. A queda do pH de emulsões cosméticas armazenadas em temperaturas altas também foi verificado por Kim e Lee (2018), que relataram uma diminuição gradual do pH com ao longo do tempo.

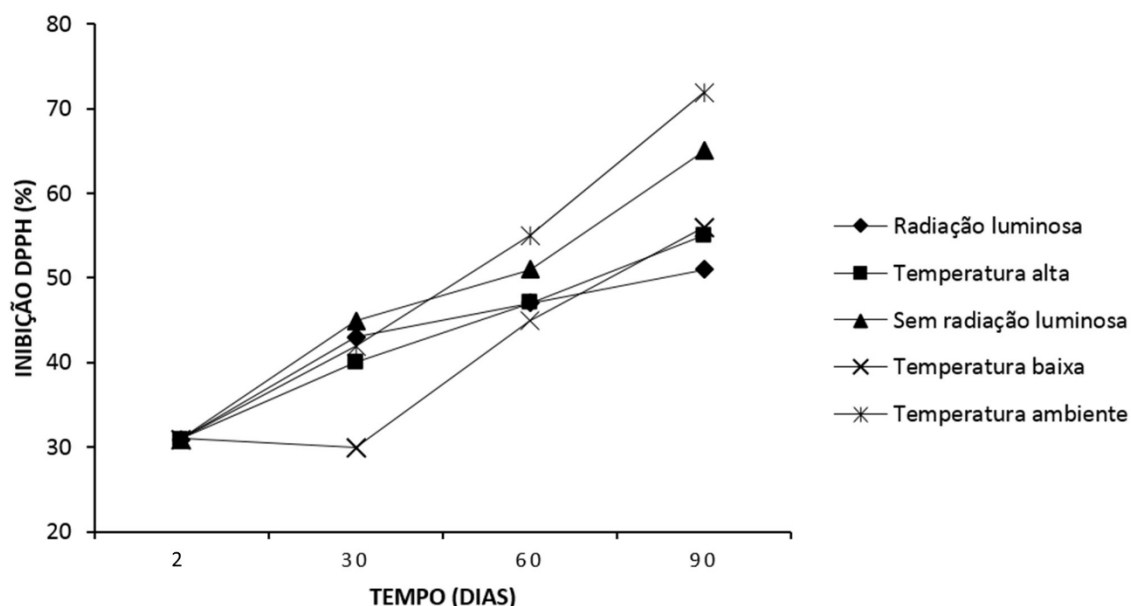
A viscosidade aparente (cP) da formulação cosmecêutica exposta as diferentes condições de exposição e nos tempos estudados permaneceu próxima a viscosidade inicial avaliada. A viscosidade apresentou um comportamento típico não-newtoniano ou pseudoplástico, considerado desejável para preparações tópicas, pois melhora a disseminação do produto na pele (Montenegro et al., 2015). Esse comportamento é o mais comum em formulações cosmecêuticas e é caracterizado pela diminuição gradual da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento (Garbossa; Campos, 2016). Assim, a viscosidade não pode ser expressa por valores únicos (Correa et al., 2005).

3.3.3. Atividade antioxidante

Os resultados da taxa da atividade antioxidante da formulação cosmecêutica em

diferentes tempos e condições de exposição estão na Figura 3.

Figura 3. Atividade antioxidante da formulação cosmeceútica com 2, 30, 60 e 90 dias, em diferentes condições de exposição.



Em 90 dias, houve o aumento da taxa de inibição (%) de radicais livres da formulação em todas as condições de exposição. A formulação mantida em temperatura ambiente, apresentou melhor ação antioxidante (72 %) e quando armazenada em ambiente escuro também exibiu uma boa atividade (65%). Resultados satisfatórios considerando que o armazenamento adequado de produtos cosméticos é em temperatura ambiente. A formulação ficou estável nas condições testadas, mantendo a atividade antioxidante por 90 dias.

Fries e Frasson (2010) testaram a propriedade antioxidante de quatro cremes cosméticos anti-idade comerciais, por meio da técnica de DPPH. Os resultados observados para a concentração de 10 mg mL^{-1} foram de 75,7; 70,4; 47,8 e 62,1 % para as amostras 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Souza et al. (2013) também avaliaram a atividade antioxidante em cosméticos comerciais (5 mg mL^{-1}) pelo método de DPPH, obtendo 87,6; 85,9 e 75,3 % para três amostras testadas. No presente trabalho, utilizando uma menor concentração da formulação ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foi possível se obter uma atividade antioxidante próxima aos dos estudos anteriores.

3.2.4. Capacidade de retenção de umidade (hidratação)

A capacidade de retenção de umidade avaliada na formulação cosmeceutica exposta a diferentes condições de exposição está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Capacidade de retenção de umidade da formulação cosmeceutica com 2, 30, 60 e 90 dias, em diferentes condições de exposição.

Exposição	Retenção de umidade em 43% UR (%)			
	2 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Radiação luminosa	88,8	95,6	85,1	78,5
Sem radiação luminosa	88,8	94,8	99,3	97,8
Temperatura alta	88,8	95,2	83,9	74,2
Temperatura baixa	88,8	95,3	98,6	100,3
Temperatura ambiente	88,8	96,1	87,7	82,1

Em 90 dias, a formulação apresentou uma capacidade de retenção de umidade decrescente nas seguintes condições: temperatura baixa > sem radiação luminosa > temperatura ambiente > radiação luminosa > temperatura alta. É possível observar que quando armazenada em temperatura baixa, a formulação atinge 100% de capacidade de retenção de umidade.

Sugere-se que a capacidade hidratante da formulação desenvolvida, se deve principalmente ao alto potencial de retenção de umidade da levana (Domżał-Kędzia et al., 2019) e aos demais componentes glicerina (Shi et al., 2010) e óleo de amêndoas que impede a evaporação da água da pele (Costa; Silva, 2017).

3.2.5. Propriedades organolépticas

Alterações na cor e odor da formulação durante o tempo de estudo podem ser observadas na Tabela 4. No tempo inicial (2 dias) a formulação tinha coloração branca e odor agradável, dados como normais e padrões.

Tabela 4. Resultado das propriedades organolépticas de cor e odor da formulação cosmeceutica em diferentes tempos e condições de exposição.

Exposição	30 dias		60 dias		90 dias	
	Cor	Odor	Cor	Odor	Cor	Odor
Radiação luminosa	N	M	N	M	N	IM
Sem radiação luminosa	N	N	N	N	LM	N
Temperatura alta	N	N	M	N	M	N
Temperatura baixa	N	N	N	N	N	N

Temperatura ambiente	N	N	LM	N	LM	N
N – normal (sem alteração); LM – levemente modificada; M – modificada; IM – intensamente modificada.						

As alterações na cor foram observadas na formulação exposta à temperatura elevada e temperatura ambiente em 30 dias, apresentando coloração amarela e amarela pálida, respectivamente. Com 90 dias essa cor permaneceu estável, não houve escurecimento. Kim e Lee (2018) também observaram que quando armazenadas em temperatura alta, emulsões demonstram maiores alterações na cor, passando de amarela pálida para marrom escura após 25 dias. Quando armazenada na ausência de radiação luminosa a formulação também apresentou uma leve modificação na coloração após 90 dias, com uma cor amarela pálida.

Com relação ao odor, a única condição que alterou a formulação foi a exposição à radiação luminosa, passando de modificada aos 30 dias para intensamente modificada (ausência total da fragrância inicial) em 90 dias.

4. Conclusão

A levana microbiana e o óleo de amêndoas apresentaram potencial de aplicação como ingredientes ativos de cosméticos. A melhor formulação com a viscosidade desejada foi com 75% de levana e 25% de óleo de amêndoas. Essa formulação apresentou espalhabilidade de 805 mm², pH e densidade ideais para a área de aplicação, viscosidade com comportamento não-newtoniano, propriedades organolépticas normais, atividade antioxidante máxima de 72 %, capacidade hidratante de 100,3 % e alta estabilidade por 90 dias, quando armazenadas em temperatura ambiente e baixa, sem a exposição à radiação luminosa. Portanto a levana microbiana associada ao óleo de amêndoas agrega valor ao cosmético pelas propriedades antioxidante e hidratante.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brasil) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio.

Referências

Ahmad Z. The uses and properties of almond oil. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v.16, p.10–12, 2010.

Amarowicz, R.; Pegg, R. B.; Rahimi-Moghaddam, P.; Barl, B.; Weil, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, **Food Chemistry**, v.84, p.551–562, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. v. 1, 52 p. Brasília, 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+de+Estabilidade+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/49cdf34c-b697-4af3-8647-dcb600f753e2>. Acesso em: 18 de julho de 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 130 p. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: Anvisa, 2007. Disponível em: https://www.crq4.org.br/downloads/guia_cosmetico.pdf. Acesso em: 04 de fevereiro de 2020.

Costa, R.; Santos, L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. **Powder Technology**, v.322, p.402-416, 2017.

Bersaneti, G. T.; Mantovan, J.; Magri, A.; Mali, S.; Celligoi, M. A. P. C. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.1132–1138, 2016.

Bersaneti, G. T.; Pan, N. C.; Baldo, C.; Celligoi, M. A. P. C. Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with Potential Application in the Food Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.184, n.3, p.838-851, 2017.

Borghetti, G. S.; Knorst, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.4, p.531-537, 2006.

Correa, N.M.; Camargo Junior, F.B.; Ignacio, R.F.; Leonardi, G.R. Rheologic behavior of different hydrophylic gels. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.73-78, 2005.

Domżał-Kędzia, M.; Lewińska, A.; Jaromin, A.; Weselski, M.; Pluskota, R.; Łukaszewicz, M. Fermentation parameters and conditions affecting levan production and its potential applications in cosmetics. **Bioorganic Chemistry**, 2019.

Furukawa, M.; Tsuboi, T. Beautifully whitening agent. **Japanese patent** 2006052146, 2006.

Fries, A. T., Frasson, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto & Saúde**, v.10, n.19, p.17-23, 2010.

Garg, A.; Aggarwal, D.; Garg, S.; Singla, A.K. Spreading of semisolid formulations: An update. **Pharmaceutical Technology**, v.26, p.84–105, 2002.

Garbossa, W.A.C.; Maia Campos, P.M.B.G. *Euterpe oleracea*, *Matricaria chamomilla*, and *Camellia sinensis* as promising ingredients for development of skin care formulations. **Industrial Crops and Products**, v.83, p.1-10, 2016.

Herman, A.; Herman, A. P.; Domagalska, B. W.; Młynarczyk, A. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. **Indian Journal of Microbiology**, v.53, n.2, p.232–237, 2012.

Jaradat, N. A., Zaid, A. N., Hussen, F., Issa, L., Altamimi, M., Fuqaha, B., Nawahda, A., Assadi, M. Phytoconstituents, antioxidant, sun protection and skin anti-wrinkle effects using four solvents fractions of the root bark of the traditional plant *Alkanna tinctoria* (L.). **European Journal of Integrative Medicine**, v.21, p.88–93, 2018.

Jiménez-Pérez, Z. E., Singh, P., Kim, Y.-J., Mathiyalagan, R., Kim, D.-H., Lee, M. H., Yang, D. C. Applications of Panax ginseng leaves-mediated gold nanoparticles in cosmetics relation to antioxidant, moisture retention, and whitening effect on B16BL6 cells. **Journal of Ginseng Research**, n.42, n.3, p.327–333, 2018.

JIAO, D.; SHI, C.; YUAN, Q.; AN, X.; LIU, Y. Mixture design of concrete using simplex centroid design method. **Cement and Concrete Composites**, v.89, p.76–88, 2018.

Kim, K.; Kim, K.; Ryo, O.; Lee, T.; Kim, T. Cosmetic composition containing levan having cellproliferation, skin-moisturizing and irritation-alleviating effects. **Japanese Patent** 2003277225, 2003.

Kim, S.; Lee, T. G. Stabilization of l -ascorbic acid in cosmetic emulsions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.57, p.193-198, 2018.

Lacatusu, I., Arsenie, L. V., Badea, G., Popa, O., Oprea, O., Badea, N. New cosmetic formulations with broad photoprotective and antioxidative activities designed by amaranth and pumpkin seed oils nanocarriers. **Industrial Crops and Products**, v.123, p.424–433, 2018.

Lardy, F.; Vennat, B.; Pouget, M.P.; Pourrat, A. Functionalization of hydrocolloids: Principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, p.715-721, 2000.

Liu, J.; Luo, J.; Ye, H.; Zeng, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.767-772, 2012.

Moraes Filho, M. L.; Busanello, M.; Prudencio, S.H.; Garcia, S. Soymilk with okara flour fermented by *Lactobacillus acidophilus*: Simplex-centroid mixture design applied in the elaboration of probiotic creamy sauce and storage stability. **LWT**, v.93, p.339-

345, 2018.

Montenegro, L., Rapisarda, L., Ministeri, C., Puglisi, G. Effects of Lipids and Emulsifiers on the Physicochemical and Sensory Properties of Cosmetic Emulsions Containing Vitamin E. **Cosmetics**, v.2, n.1, p.35–47, 2015.

NICNAS, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. **Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-: Environment tier II assessment**, 2017. Disponível em: <https://www.nicnas.gov.au/chemical-information/imap-assessments/imap-assessments/tier-ii-environment-assessments/bht#_ENREF_17>. Acesso em: 03 de out de 2019.

Pandey, A.; Jagtap, J. V.; Polshettiwar, S. A. Formulation and evaluation of in-vitro antimicrobial activity of gel containing essential oils and effect of polymer on their antimicrobial activity. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.1, p.234-237, 2011

Qvist, P.K.; Sander, C.; Okkels, F.; Jessen, V.; Baldursdottir, S.; Rantanen, J. On-line rheological characterization of semi-solid formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.128, p.36-42, 2018.

Sato, H.; Takahashi, M.; Furukawa, F.; Miyakawa, Y.; Hasegawa, R.; Toyoda, K.; Hayashi, Y. Initiating potential of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (quercetin) in two-stage mouse skin carcinogenesis. **Cancer Letters**, v.38, p.49-56, 1987.

Souza, M. C., Sartor, C. F. P., Felipe, D. F. Comparação da ação antioxidante de uma formulação contendo extrato de *Pereskia aculeata* com cosméticos anti-idade presentes no mercado. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.6, n.3, p.461-477, 2013.

Sultana, Y., Kohli, K., Athar, M., Khar, R. K., Aqil, M. Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B-induced cutaneous photoaging in mice. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.6, n.1, p.14–19, 2007.

Shi, X. L.; Zhang, J. J.; Song, H. F.; Wang, J. J.; Zhang, Z. S; Zhang, Q. B. Polysaccharides from *Enteromorpha linza*: Purification and moisture-preserving activity. **Marine Science**, v. 37, p.81–85, 2010.

Srikanth, R.; Siddartha, G.; Sundhar Reddy, C. H. S. S.; Harish, B.S.; Janaki Ramaiah, M.; Uppuluri, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate Polymers**, v.123, p.8-16, 2015.

Taylan, O.; Yilmaz, M. T.; Dertli, E. Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.136, p.436-444, 2019.

Vahedikia, N.; Garavand, F.; Tajeddin, B.; Cacciotti, I.; Jafari, S. M.; Omid, T.; Zahedi, Z. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles

and cinnamon essential oil: physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2019.

Viikari, L., Gisler, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas strains*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 23, p. 240–244, 1986.

Zouboulis, C. C., Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Elewa, R., Makrantonaki, E. Aesthetic aspects of skin ageing, prevention and local treatment. **Clinics in Dermatology**, v.37, n.4, p.365-372, 2019.

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., Quek, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v.59, p.282–289, 2016.

Zhang, Z.; Wang, X.; Han, Z.; Zhao, M.; Yin, L. Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2332–2337, 2012.

Zhao, L.; Fan, F.; Wang, P.; Jiang, X. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. **Biotechnological products and process engineering**, v. 87, p.2841–2850, 2013.

6 CONCLUSÕES

- A produção de levana por *Bacillus subtilis* natto atingiu 94,62 g L⁻¹, com uma produtividade de 3,94 g / L.h⁻¹ utilizando 400 g L⁻¹ de sacarose em 24 horas.
- A atividade antioxidante da levana avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi de 58 % na concentração de 10 mg mL⁻¹ e a capacidade de retenção de umidade foi de 92 % após 96 h. A levana não apresentou atividade antimicrobiana contra os patógenos testados.
- O óleo essencial de canela apresentou 21 % de atividade antioxidante na concentração de 10 mg mL⁻¹ e apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, com a concentração inibitória mínima de 1 mg mL⁻¹.
- As formulações de gel aniônico foram desenvolvidas com 1 % de levana (melhor atividade antioxidante) e com as concentrações do óleo de canela com 0.5 %, 1% e 2 % (5, 10 e 20 vezes acima da concentração inibitória mínima). Após caracterização apresentaram boa estabilidade por 15 dias, pH compatível com o da pele, atividade antioxidante máxima de 54 % e atividade antimicrobiana contra todos os patógenos testados.
- De acordo com o planejamento simplex-centroide a melhor formulação com a viscosidade desejada foi com 75% de levana e 25% de óleo de amêndoas. Essa formulação apresentou espalhabilidade de 805 mm², pH e densidade ideais para a área de aplicação, viscosidade com comportamento não-newtoniano, propriedades organolépticas normais, atividade antioxidante máxima de 72 %, capacidade hidratante de 100,3 % e alta estabilidade por 90 dias, quando armazenadas em temperatura ambiente e baixa, sem a exposição à radiação luminosa.

- Foi possível desenvolver um cosmético multifuncional associando levana, óleo de canela e óleo de amêndoas como princípios ativos, gerando um produto natural, sustentável e com excelentes propriedades dermocosméticas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A.M.; GAMAL-ELDEEN, A.M.; HELMY, W.A.; ESAWY, M.A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. **Carbohydrate Polymers**, v.89, n.2, p.314–322, 2012.
- AHMAD, Z. The uses and properties of almond oil. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v.16, p.10-12, 2010.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, p.291-297, 1999.
- AMIRALIAN, L. FERNANDES, C.R. Géis Cosméticos. **Cosmetics & Toiletr**, v.30, 2018.
- AMNUAIKIT, T.; CHUSUIT, T.; RAKNAM, P.; BOONME, P. Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. **Med Devices Evidence Res.**, v.4, p.77-81, 2011.
- ANCHISI, C.; MACCIONI, A.M.; SINICO, C.; VALENTI, D. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agentes. **IL Farmaco**, v.56, p.427-431, 2001.
- BANGUELA, A.; ARRIETA, J.G.; RODRÍGUEZ, R.; TRUJILLO, L.E.; MENÉNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, L. High levan accumulation in transgenic tobacco plants expressing the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase gene. **Journal of Biotechnology**, v.154, n.1, p.93-98, 2011.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- BERSANETI, G. T. **Levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto: síntese de fruto-oligosacarídeos para aplicação em filmes comestíveis**. Dissertação de mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, 127 f, 2016.
- BERSANETI, G.T.; PAN, N.C.; BALDO, C.; CELLIGOI, M.A.P.C. Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with Potential Application in the Food Industry. **Appl Biochem Biotechnol**, v.184, n.3, p.838-851, 2017.
- BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v.40, n.5, p.1535–1539, 2005.
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira**

de Ciências Farmacêuticas. v.42, n.4, p.531-537, 2006.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2. ed. 120 p. Brasília, 2007.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. v. 1, 52 p. Brasília, 2004.

CALAZANS, G.M.; LIMA, R. C.; DE FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, n.4, p.245-247, 2000.

COSTA, R.; SANTOS, L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. **Powder Technology**, v.322, p.402-416, 2017.

CHENG, Y.S.; LAM, K.W.; Ng, K.M.; Ko, R.K.M.; Wibowo, C. An integrative approach to product development-A skin-care cream. **Computers & Chemical Engineering**, v. 33, p.1097-1113, 2009.

CHIDAMBARAM, J.S.C.A.; VEERAPANDIAN, B.; SARWAREDDY, K.K.; MANI, K.P.; SHANMUGAM, S.R.; VENKATACHALAM, P. Studies on solvent precipitation of levan synthesized using *Bacillus subtilis* MTCC 441. **Heliyon**, v.5, n.9, 2019.

CLSI, **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWNJR, R. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v.27, n.2, p.145-151, 2006.

DAUDT, R.M.; BACK, P.I.; CARDOZO, N.S.M.; MARCZAK, L.D.F.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, v.134, p.573-580, 2015

DIAS, A.C.; FONTES, M.P.F.; REIS, C.; BELLATO, C.R.; FENDORF, S. Simplex-Centroid mixture design applied to arsenic (V) removal from waters using synthetic minerals. **Journal of Environmental Management**, v.238, p.92-101, 2019.

DOGSA, I.; BRLOZNIK, M.; STOPAR, D.; MANDIC-MULEC, I. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. **PLoS One**, v.8, n.4, p.1-10, 2013.

DUBUISSON, P.; PICARD, C.; GRISEL, M.; SAVARY, G. How does composition influence the texture of cosmetic emulsions? **Colloids and**

Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v.536, p.38–46, 2018.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, v.26, n.1, p.71-82, 2005.

ESAWY, M.A.; MAHMOUD, D.A.R.; FATTAH, A.F.A. (2008). Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.25, n.2, p.237-246, 2008.

FIUME, M.M.; HELDRETH, B.; BERGFELD, W.F.; BELSITO, D.V.; HILL, R.A.; KLAASSEN, C.D.; LIEBLER, D.C.; MARKS JR, J.G.; SHANK, R.C.; SLAGA, T.J.; SNYDER, P.W.; ANDERSEN, F.A. Safety Assessment of Microbial Polysaccharide Gums as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v.35, p.5-49, 2016.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v.92, n.2, p.1432-1442, 2013.

FURUKAWA, M.; TSUBOI, T. Beautifully whitening agent. **Japanese patent** 2006052146, 2006.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; REIS, M.A.M. Bacterial Polysaccharides: Production and Applications in Cosmetic Industry. **Springer International Publishing**, p.1-24, 2015.

GAO, S.; QI, X.; HART, D.J.; GAO, H.; AN, Y. Expression and Characterization of Levansucrase from *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, n.4, p.867-871, 2017.

GARBOSSA, W.A.C.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. *Euterpe oleracea*, *Matricaria chamomilla*, and *Camellia sinensis* as promising ingredients for development of skin care formulations. **Industrial Crops and Products**, v.83, p.1-10, 2016.

GONZALEZ-GARCINUNO, A.; TABERNERO, A.; SANCHEZ-ALVAREZ, J.M.; GALAN, M.A.; VALLE, DEL E.M.M. Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight. **Microbial Cell Factories**, v.16, n.1, p.91, 2017.

GOJGIC-CVIJOVIC, G. D.; JAKOVLJEVIC, D. M.; LONCAREVIC, B. D.; TODOROVIC, N. M.; PERGAL, M. V.; CIRIC, J.; LOOS, K.; BESKOSKI, V.P.; VRVIC, M. M. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.121, p.142-151, 2019.

GU, Y.; ZHENG, J.; FENG, J.; CAO, M.; GAO, W.; QUAN, Y.; DANG, Y.; WANG, Y.; WANG, S.; SONG, C. Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements.

Applied Microbiology and Biotechnology, v.101, n.10, p.4163-4174, 2017.

HAMDY, A. A.; ELATTAL, N. A.; AMIN, M. A.; ALI, A. E. MANSOUR, N. M.; AWAD, G. E. A.; FARRAG, A. R. H.; ESAWY, M. A. In vivo assessment of possible probiotic properties of *Bacillus subtilis* and prebiotic properties of levan. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.13, p.190-197, 2017.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P.; DOMAGALSKA, B. W.; MŁYNARCZYK, A. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. **Indian Journal of Microbiology**, v.53, n.2, p.232–237, 2012.

JIAO, D.; SHI, C.; YUAN, Q.; AN, X.; LIU, Y. Mixture design of concrete using simplex centroid design method. **Cement and Concrete Composites**, v.89, p.76–88, 2018.

KANG, S.A.; JANG, K.; SEO, J.; KIM, H.K.; KIM, J.H.; RAIKAKHWADA, D.; SEO, M.J.; LEE, J.O.; HA, C.; KIM, C.; RHEE, S. Levan: Applications and Perspectives. **Production of Biopolymers and Polymer Precursors**, p.145-161, 2009.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Biopolysaccharides for Skin Hydrating Cosmetics. **Springer International Publishing Switzerland**, p.1867-1892, 2015.

KIRTEL, O.; MENÉNDEZ, C.; VERSLUYS, M.; VAN DEN ENDE, W.; HERNÁNDEZ, L.; TOKSOY ÖNER, E. Levansucrase from *Halomonas smyrnensis* AAD6T: first halophilic GH-J clan enzyme recombinantly expressed, purified, and characterized. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n.21, p.9207-9220, 2018.

KIM, K.; KIM, K.; RYO, O.; LEE, T.; KIM, T. Cosmetic composition containing levan having cellproliferation, skin-moisturizing and irritation-alleviating effects. **Japanese Patent 2003277225**, 2003.

KIM, K.H.; CHUNG, C.B.; KIM, Y.H.; KIM, K.S.; HAN, C.S.; KIM, C.H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Cosmetic Science**, v.56, p.395–406, 2005.

KÜÇÜKAŞIK, F.; KAZAK, H.; GUNEY, D.; FINORE, I.; POLI, A.; YENIGUN, O.; NICOLAUS, B. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, n.6, p.1729-1740, 2011.

KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C., TERROSO, T.F., ASSUMPCÃO, E.R., BERLITZ, S.J., CONTRI, R.V., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S. Development and stability of innovative semisolid formulations containing nanoencapsulated lipoic acid for topical use. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.12, n.10, p.7723-7732, 2012.

LACATUSU, I.; ARSENIU, L.V.; BADEA, G.; POPA, O.; OPREA, O.; BADEA, N.

New cosmetic formulations with broad photoprotective and antioxidative activities designed by amaranth and pumpkin seed oils nanocarriers. **Industrial Crops and Products**, v.123, p.424–433, 2018.

LI, W.; YU, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. Recent novel applications of levansucrases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, n.17, p.6959-6969, 2015.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; ZENG, X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.767-772, 2012.

LIU, Q.; YU, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p.1732-1740, 2017.

LU, L.; FU, F.; ZHAO, R.; JIN, L.; HE, C.; XU, L.; XIAO, M. A recombinant levansucrase from *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 catalyzes versatile transfructosylation reactions. **Process Biochemistry**, v.49, n.9, p.1503-1510, 2014.

MANIVAL, X. YANG, Y.; STRUB, M.P.; KOCHOYAN, M.; STEINMETZ, M.; AYMERICH, S. From genetic to structural characterization of a new class of RNA-binding domain within the SacY/BglG family of antiterminator proteins. **The EMBO Journal**, v.16, n.16, 5019-5029, 1997.

MARTINEZ-FLEITEZ, C.; ORTIZ-LOMBARDÍA, M.; PONS, T.; TARBOURIECH, N.; TAYLOR, E J.; ARRIETA, J.G.; HERNÁNDEZ, L.; DAVIES, G.J. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biochemical Journal**, v.390, p.19-27, 2005.

MANANDHAR, S.; VIDHATE, S.; D'SOUZA, N. Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.794-798, 2009.

MÉNDEZ-LORENZO, L.; PORRAS-DOMÍNGUEZ, J.R.; RAGA-CARBAJAL, E.; OLVERA, C.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M.E.; CARRILLO-NAVA, E.; COSTAS, M.; MUNGUÍA, A.L. Intrinsic levansucrase activity of *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB). **PLoS ONE**, v.10, n.11, p.1-15, 2015.

MILAN, A.L.K.; MILAO, D.; SOUTO, A.A.; CORTE, T.W.F. Study of hydration skin by the cosmetics emulsions for xerosis and their stability by rheology. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p.649-657, 2007.

MORAES FILHO, M. L.; BUSANELLO, M.; PRUDENCIO, S.H.; GARCIA, S. Soymilk with okara flour fermented by *Lactobacillus acidophilus*: Simplex-centroid mixture design applied in the elaboration of probiotic creamy sauce and storage stability. **LWT**, v.93, p.339-345, 2018.

MOUSSA, T.A.A.; AL-QAYSI, S.A.S.; THABIT, Z.A.; KADHEM, S.B. Microbial levan from *Brachybacterium phenoliresistens*: Characterization and enhancement of production. **Process Biochemistry**, v.57, p.9-15, 2017.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v.153, p.375-80, 1944.

NI, D.; XU, W.; BAI, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, T.; MU, W. Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.113, p.29-37, 2018.

NISI, G.; CUOMO, R.; BRANDI, C.; GRIMALDI, L.; SISTI, A.; D'ANIELLO, C. Carbon dioxide therapy and hyaluronic acid for cosmetic correction of the nasolabial folds. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.15, p.169-175, 2016.

NOVAK, A.C. **Evaluation of the cosmetic potential of the *Cyanobacterium Spirulina platensis***. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ONER, E. T.; HERNÁNDEZ, L.; COMBIE, J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. **Biotechnology Advances**, v.34, p.827-844, 2016.

PORRAS-DOMÍNGUEZ, J.R.; ÁVILA-FERNÁNDEZ, A.; MIRANDA-MOLINA, A.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M.E.; MUNGUÍA, A.L. *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 338 – 344, 2015.

PRATHYUSHA, A. M. V. N.; SHEELA, G. M.; BRAMHACHARI, P. V. Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. **Biotechnology Reports**, 2018.

RADCHENKOVA, N.; PANCHEV, I.; VASSILEV, S.; KUNCHEVA, M. DOBREVA, S.; KAMBOUROVA, M. Continuous cultivation of a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418 for production of an exopolysaccharide applicable in cosmetic creams. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, n.5, p.1301-1309, 2015.

SANTOS, L. F.; CAVALCANTI, O. A.; CELLIGOI, M. A. C. Produção e aplicação de polissacarídeos: um enfoque na levana e os potenciais dispositivos. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 254-270, 2011.

SANTOS, L.F.; MELO, F.C.B.C.; PAIVA, W.J.M.; BORSATO, D.; SILVA, M.L.C.C.; CELLIGOI, M.A.P.C. Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* natto. **Romanian Biotechnological Letters**, v.18, p.8413-8422, 2013.

SANTOS-MORIANO, P.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; POVEDA, A.; JIMENEZ-

BARBERO, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.119, p.18–25, 2015.

SARILMISER, H.K.; ATES, O.; OZDEMIR, G.; ARGAS, K.Y.; ONER, E.T. Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6^T. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.119, n.4, p.455-463, 2015.

SIMMS, P.; BOYKO, W.; EDWARDS, J. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. **Carbohydrate Research**, v.208, p.193-198, 1990.

SILBER, S.; Dagbagli, S.; Yegin, S.; Baysal, T.; Goksungur, Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, v.99, p.454-461, 2014.

SILVA, R. T.; BERSANETI, G. T.; LONNI, A. A. S. G.; CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de levana e sua aplicação em cosméticos. In: A produção do conhecimento nas ciências biológicas, Ponta Grossa: **Atena Editora**, 2019.

SIMÕES, A.; VEIGA, F.; VITORINO, C. Developing cream formulations: renewed interest in an old problem. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.108, p.3240-3251, 2019.

SOLWAY, D.R.; CONSALTER, M.; LEVINSON, D.J. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of skin tears in the frail elderly. **Wounds**, v.22, n.1, p.17–19, 2010.

SOMOGYI, M., A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biol. Chemistry**, v.160, p.61-68, 1952.

SONG, Y.; SONG, N.; KIM, J.; NHO, Y.; BAIK, S. Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from Kimchi. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v 175, p. 169-175, 2011.

SULTANA, Y.; KOHLI, K.; ATHAR, M.; KHAR, R.K.; AQIL, M. Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B–induced cutaneous photoaging in mice. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.6, p.14–19, 2007.

SHI, X. L.; ZHANG, J. J.; SONG, H. F.; WANG, J. J.; ZHANG, Z. S.; ZHANG, Q. B. Polysaccharides from *Enteromorpha linza*: Purification and moisture-preserving activity. **Marine Science**, v. 37, p.81–85, 2010.

SHIH, I.-L.; YU, Y.-T. Simultaneous and selective production of levan and poly (gamma-glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v.27, n.2, p.103-106, 2005.

SLETMOEN, M.; MAURSTAD, G.; SIKORSKI, P.; PAULSEN, B.S.; STOKKE,

B. T Characterisation of bacterial polysaccharides: steps towards single-molecular studies. **Carbohydrate Research**, v.338, n.23, p.2459–2475, 2003.

SRIKANTH, R.; REDDY, C.H.S.S.S.; SIDDARTHA, G.; RAMAIAH, M.J.; UPPULURI, K.B. Review on production, characterization and applications of microbial levan. **Carbohydrate Polymers**, v.120, p. 102-114, 2015. (A)

SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; SUNDHAR REDDY, C. H. S. S.; HARISH B.S.; JANAKI RAMAIAH, M.; UPPULURI, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate Polymers**, v.123, p.8-16, 2015. (B)

STRUBE, C. P.; HOMANN, A.; GAMER, M.; JAHN, D.; SEIBEL, J.; HEINZ, D. W. Polysaccharide Synthesis of the Levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* Is Controlled by Distinct Surface Motifs. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.20, p.17593-17600, 2011.

OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, 37(2), 177–183, 2007.

OLIVEIRA, A.Z.M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurónico**. 100 f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Farmacêutica - Universidade do Porto, 2009.

ONER, E. T.; HERNÁNDEZ, L.; COMBIE, J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. **Biotechnology Advances**, v.34, n.5, p. 827-844, 2016.

OSEGUERA, M.A.P.; GUERECA, L.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, n.4, p.465–471, 1996.

OSMAN, A.; ONER, E. T.; EROGLU, M. S. Novel levan and pNIPA temperature sensitive hydrogels for 5-ASA controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v.165, p.61-70, 2017.

PANDEY, A.; JAGTAP, J. V.; POLSHETTIWAR, S. A. Formulation and evaluation of in-vitro antimicrobial activity of gel containing essential oils and effect of polymer on their antimicrobial activity. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.1, p.234-237, 2011.

PALANIRAJA, A.; JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v.106, n.1, p.1-12, 2011.

PENG, J.; XU, W.; NI, D.; ZHANG, W.; ZHANG, T.; GUANG, C.; MU, W. Preparation of a novel watersoluble gel from *Erwinia amylovora* levan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.122, p. 469-478,

2018.

PERES, L.P.A.; DIAS, I.L.T. Desenvolvimento e avaliação de formulações em gel para veiculação de ácido salicílico. **Revista Multidisciplinar da Saúde**, n.5, 2011.

PIJNING, T.; ANWAR, M. A.; BÖGER, M.; DOBRUCHOWSKA, J. M.; LEEMHUIS, H.; KRALJ, S.; DIJKHUIZEN, L.; DIJKSTRA, B. W. Crystal Structure of Inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the Substrate Specificity and Product Specificity of GH68 Fructansucrases. **Journal of Molecular Biology**, v.412, n.1, p.80-93, 2011.

TAGUETT, F.; BOISSET, C.; HEYRAUD, A.; BUON, L.; KACI, Y. Characterization and structure of the polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* strain TF7 isolated from an arid region of Algeria. **Comptes Rendus Biologies**, v.338, n.5, p.335–342, 2015.

TOMULESCU, C.; STOICA, R.; SEVCENCO, C.; CĂȘĂRICĂ, A.; MOSCOVICI, M.; VAMANU, A. LEVAN - A MINI REVIEW. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v.20, p.309-317, 2016.

VAHEDIKIA, N.; GARAVAND, F.; TAJEDDIN, B.; CACCIOTTI, I.; JAFARI, S. M.; OMIDI, T.; ZAHEDI, Z. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2019.

VIIKARI, L., GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas strains*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 23, p. 240–244, 1986.

XU, W.; LIU, Q.; BAI, Y.; YU, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. Physicochemical properties of a high molecular weight levan from *Brenneria* sp. EniD312 **International Journal of Biological Macromolecules**, v.109, p.810-818, 2017.

XU, T.; GAO, C.; FENG, X.; HUANG, M.; YANG, Y.; SHEN, X.; TANG, X. Cinnamon and clove essential oils to improve physical, thermal and antimicrobial properties of chitosan-gum arabic polyelectrolyte complexed films. **Carbohydrate Polymers**, v.217, p.116-125, 2019.

WUERGES, J.; CAPUTI, L.; CIANCI, M.; BOIVIN, S.; MEIJERS, R.; BENINI, S. The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. **Journal of Structural Biology**, v.191, n.3, p.290-298, 2015.

YOO, S.-H.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.34, p.37–41, 2004.

ZIELIŃSKA, A.; NOWAK, I. Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. **CHEMIK**, v.68, n.2, p.103-110, 2014.

ZHANG, T.; LI, R.; QIAN, H.; MU, W.; MIAO, M.; JIANG, B. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.975-981, 2014.

ZHANG, Y., LIU, X., WANG, Y., JIANG, P., QUEK, S. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v.59, p.282–289, 2016.

ZHANG, Z.; WANG, X.; HAN, Z.; ZHAO, M.; YIN, L. Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2332–2337, 2012.

ZHAO, L.; FAN, F.; WANG, P.; JIANG, X. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. **Biotechnological products and process engineering**, v. 87, p.2841–2850, 2013.