



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÉBORA DAHMER

**DESENVOLVIMENTO DE HIDRATANTE LABIAL
MULTIFUNCIONAL CONTENDO LEVANA DE *Bacillus
subtilis natto* E SOFOROLÍPIDIOS DE *Starmerella
bombicola* COM PROPRIEDADES HIDRATANTE,
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

Londrina
2023

DÉBORA DAHMER

**DESENVOLVIMENTO DE HIDRATANTE LABIAL MULTIFUNCIONAL
CONTENDO LEVANA DE *Bacillus subtilis natto* E SOFOROLIPÍDIOS
DE *Starmerella bombicola* COM PROPRIEDADES HIDRATANTE,
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni.

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

Londrina
2023

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

Dahmer, Débora .

Desenvolvimento de hidratante labial multifuncional contendo levana de *Bacillus subtilis natto* e soforolipídios de *Starmerella bombicola* com propriedades hidratante, antioxidante e antimicrobiana / Débora Dahmer. - Londrina, 2023.
140 f.

Orientador: Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni.

Coorientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Hidratante Labial - Tese. 2. Moléculas Biotecnológicas - Tese. 3. Avaliação da Eficácia - Tese. 4. Análise Sensorial - Tese. I. Alesandra Stinghen Garcia Lonni, Audrey . II. Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Maria . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDU 61

DÉBORA DAHMER

**DESENVOLVIMENTO DE HIDRATANTE LABIAL MULTIFUNCIONAL
CONTENDO LEVANA DE *Bacillus subtilis natto* E SOFOROLIPÍDIOS
DE *Starmerella bombicola* COM PROPRIEDADES HIDRATANTE,
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Audrey Alesandra Stinghen Garcia
Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Raquell de Castro Chaves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de junho de 2023.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Londrina - UEL pela educação pública e de qualidade ofertada, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, seu corpo docente e demais funcionários, por esta oportunidade de crescimento e aprendizado, e à CAPES pelo suporte financeiro no período de concessão da bolsa.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni, por ter me aceito como integrante de seu grupo de pesquisa, sem nem sequer me conhecer previamente, e por ter confiado em mim para a realização deste projeto. Agradeço, também, por ser essa maravilhosa mãe científica e profissional, sempre disposta a nos auxiliar e apoiar. Gostaria de agradecer, também, à minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, por toda parceria, disponibilidade e apoio durante a realização deste projeto.

Gostaria de agradecer aos professores Dr^a. Renata Kobayashi e Dr. Gerson Nakazato pela calorosa receptividade em vosso laboratório (Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada – NIP3) e pela disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento deste projeto.

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Dionísio Borsato por todo auxílio na realização das análises estatísticas.

Gostaria de agradecer à professora Dr^a. Sandra Helena Prudencio pelo auxílio com o desenvolvimento dos testes sensoriais e pela permissão de uso do Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA.

Gostaria de agradecer à professora Dr^a. Marina Leite Miterrer Daltoé, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, *campus* Pato Branco, pelo auxílio no desenvolvimento e na análise dos resultados obtidos nos testes sensoriais.

Gostaria de agradecer à Biotec Magistral pela doação do insumo Lecigel[®] utilizado no desenvolvimento deste trabalho e, também, à Farmácia de Manipulação Pharmadelle, pelo auxílio e apoio à pesquisa.

Gostaria de agradecer à doutoranda Briani Gisele Bigotto por todo

apoio, auxílio e parceria, ao longo destes quase três anos. Você foi a primeira colega com quem tive contato no laboratório e nunca mediu esforços para me ensinar tudo que estava ao teu alcance. Agradeço pela amizade que construímos neste período de convívio, a qual foi e é muito importante para mim. Expresso a ti a minha admiração e carinho.

Gostaria de agradecer à Pós-Doutoranda Sara Scandorieiro por todo auxílio e parceria, com a correção de projetos, apresentações científicas e artigos. Agradeço também pela amizade construída neste período de convívio, a qual é de grande valia para mim. Me identifico contigo em diversos aspectos e expresso a ti a minha admiração e carinho.

Gostaria de agradecer à graduanda Thays Amélio Bergamini pelo apoio e dedicação em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho, e também, pela amizade e parceria construídas ao longo deste tempo.

Gostaria de agradecer aos colegas do Laboratório de Inovação e Tecnologia Cosmecêutica - LABITEC e do laboratório de Biotecnologia, e mais novos amigos, Briani Gisele Bigotto, Eduarda Mendes Costa, Thays Amélio Bergamini, Beatriz Ticiani Vieira Pereira, Isabela Mazarim, Vitória Dinardo, Camila Harumi, Sara Scandorieiro e aos demais, por todo apoio, boas risadas e união neste período. Vocês, com certeza, tornaram essa etapa mais leve e alegre. Saibam que sou muito grata por todas as experiências compartilhadas.

Gostaria de agradecer à Jennifer Germiniani Cardozo por todo auxílio com o desenvolvimento das análises microbiológicas e pela maravilhosa parceria, que tornaram os dias de experimento alegres e prazerosos.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Hélia Scheuer Dahmer e Neocir Tadeu Dahmer, por terem recebido de braços abertos este sonho, sempre me incentivando e acreditando que eu era capaz. Sem o apoio de vocês, tanto emocionalmente quanto financeiramente, esta etapa não teria sido vencida. Gostaria de agradecer também a minha irmã, Roberta Dahmer, por todas as palavras e gestos de incentivo. Família é a base de tudo, e como eu amo a minha!

Gostaria de agradecer ao Lucas Marinho de Souza Santana, por todo incentivo, paciência e empatia durante este período, e por não ter medido esforços para que fosse possível podermos desfrutar alguns momentos juntos, mesmo com a

distância.

Gostaria de agradecer as amigadas de longa data, Amanda Loren de Lara, Bruna Lemes, Gabriela Mariano da Silva, Elizandra Maiara de Oliveira e Jessica Netto, por permitirem que a distância fosse apenas uma forma de fortalecermos este vínculo que já temos. Agradeço, também, a Gabrielle Cristina Calegari pelo incentivo, pela amizade e por não medir esforços para me auxiliar na realização deste sonho.

Gostaria de agradecer às amigadas que construí em Londrina por todo apoio, momentos de diversão, descontração e alegria. Sem vocês, minha jornada aqui não teria sido tão afortunada e bem vivida. Uma vida com amigos é uma vida mais feliz!

Gostaria de agradecer a um ser maior que todos nós e que tudo sabe, Deus, por ter me permitido vivenciar essa nova etapa acadêmica, tão almejada por mim, e por ter traçado tão perfeitamente cada caminho desta, dando-me forças, discernimento e sabedoria para enfrentar toda e qualquer situação.

E para finalizar, gostaria de agradecer a todos aqueles, que de uma forma ou outra, demonstraram seu apoio e incentivo durante este período. Cada um foi fundamental durante esta trajetória e por isso sou profundamente grata!

“Hardships often prepare ordinary people for an extraordinary destiny”

- C. S. Lewis

DAHMER, Débora. **Desenvolvimento de hidratante labial multifuncional contendo levana de *Bacillus subtilis natto* e soforolipídios de *Starmerella bombicola* com propriedades hidratante, antioxidante e antimicrobiana**. 2023. 140 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A demanda por ingredientes multifuncionais e naturais na indústria cosmética influencia a busca de novas matérias-primas inovadoras, que possam atuar possibilitando benefícios adicionais nas formulações. Moléculas obtidas por biotecnologia, como a levana (LEV) e os soforolipídios (SOF), as quais apresentam natureza sustentável, atividade versátil e bom desempenho quando em comparação aos compostos sintéticos, são alguns exemplos. O estudo desenvolvido neste trabalho apresentou como objetivo o desenvolvimento de um hidratante labial multifuncional contendo LEV (2,0%) de *Bacillus subtilis natto*, SOF (1,0%) de *Starmerella bombicola* e óleo essencial de *Citrus paradisi* (OCP) (0,3%), empregando planejamento experimental do tipo simplex-centróide. As oito formulações desenvolvidas, uma formulação base (FB) e sete formulações estudo, foram avaliadas farmacotecnicamente quanto à pré-estabilidade (teste de centrifuga), características organolépticas e estabilidade preliminar, e quanto aos parâmetros físico-químicos de pH, espalhabilidade e retenção de umidade. A seleção da concentração dos ativos ocorreu por meio dos ensaios microbiológicos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e combinação de antimicrobianos, avaliação da atividade antioxidante (DPPH) e pela revisão da literatura. A seleção da melhor formulação do estudo ocorreu posteriormente, através de análise estatística de Superfície de Resposta, e esta foi empregada para avaliação da eficácia *in vivo* e análise sensorial (intensidade de atributos, aceitação e intenção de compra). Todas as formulações apresentaram pH entre 6,0 e 7,0, o qual é compatível com a região labial, e se mantiveram estáveis frente ao teste de centrifuga, sem a presença de instabilidades ou separação de fases. Estas também preservaram suas características organolépticas, inclusive, após o período de estudo da estabilidade preliminar. A espalhabilidade das formulações apresentou variação entre 415,3 e 1217,1 mm², a retenção de umidade apresentou respostas acima de 95% e a capacidade antioxidante foi próxima a 50% para todas as formulações. A formulação otimizada (FT), que apresentou as melhores respostas e, portanto, foi escolhida através das análises estatísticas continha 0,4% de LEV e 0,8% de SOF em sua composição. A FT desenvolvida auxiliou na manutenção da hidratação e oleosidade labiais já apresentadas pelos participantes, além de exibir bom índice de aceitação e de intenção de compra frente aos avaliadores. A intensidade dos atributos avaliados pelo método sensorial não apresentou diferença significativa entre a FT e o controle do estudo. A incorporação dos ativos apresentada neste trabalho, em uma formulação de hidratante labial, é inovadora e apresenta potencial de mercado, além de ser um cosmético natural e sustentável, o qual atende as demandas dos consumidores.

Palavras-chave: Hidratante Labial. Moléculas Biotecnológicas. Avaliação da Eficácia. Análise Sensorial. Cosméticos Naturais.

DAHMER, Debora. **Development of a multifunctional lip balm containing levan from *Bacillus subtilis natto* and sophorolipids from *Starmerella bombicola* with moisturizing, antioxidant and antimicrobial properties.** 2023. 140 p. Dissertation (Postgraduate in Pharmaceutical Sciences) – Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The demand for multifunctional and natural ingredients in the cosmetic industry influences the search for new innovative raw materials that can act to provide additional benefits in formulations. Molecules obtained by biotechnology, such as levan (LEV) and sophorolipids (SOF), which have a sustainable nature, versatile activity and good performance when compared to synthetic compounds, are some examples. The study carried out in this work aimed to develop a multifunctional lip moisturizer containing LEV (2.0%) from *Bacillus subtilis natto*, SOF (1.0%) from *Starmerella bombicola* and essential oil from *Citrus paradisi* (OCP) (0.3%), using simplex-centroid experimental design. The eight formulations developed, one base formulation (FB) and seven study formulations, were pharmacotechnically evaluated for pre-stability (centrifuge test), organoleptic characteristics and preliminary stability, and for physicochemical parameters of pH, spreadability and retention of moisture. The selection of the concentration of the actives occurred through the microbiological assays of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and combination of antimicrobials, evaluation of the antioxidant activity (DPPH) and through the literature review. The selection of the best formulation for the study occurred later, through statistical analysis of the Response Surface, and this was used to evaluate the in vivo efficacy and sensory analysis (attribute intensity, acceptance and purchase intention). All formulations had a pH between 6.0 and 7.0, which is compatible with the labial region, and remained stable in the centrifuge test, without the presence of instabilities or phase separation. These also preserved their organoleptic characteristics even after the preliminary stability study period. The spreadability of the formulations varied between 415.3 and 1217.1 mm², moisture retention showed responses above 95% and the antioxidant capacity was close to 50% for all formulations. The optimized formulation (FT), which presented the best responses and, therefore, was chosen through statistical analysis, contained 0.4% LEV and 0.8% SOF in its composition. The FT developed helped to maintain lip hydration and oiliness already presented by the participants, in addition to showing a good acceptance rate and purchase intention among the evaluators. The intensity of the attributes evaluated by the sensorial method did not present a significant difference between the FT and the study control. The incorporation of the actives presented in this work, in a lip moisturizer formulation, is innovative and has market potential, in addition to being a natural and sustainable cosmetic, which meets the demands of consumers.

Key-words: Lip Moisturizer. Biotechnological Molecules. Effectiveness Assessment. Sensory analysis. Natural Cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da borda vermelha dos lábios, em que D: Derme e E: Epitélio.	17
Figura 2 - Função de barreira do estrato córneo, destacando as ceramidas.....	18
Figura 3 - Ilustração de sistemas emulsivos do tipo O/A e A/O.....	20
Figura 4 - Tipos de instabilidade de emulsões.	21
Figura 5 - Estrutura linear da levana com ligações principais do tipo $\beta(2,6)$ e suas ramificações do tipo $\beta(2,1)$	23
Figura 6 - Representação das conformações dos soforolipídios.	26
Figura 7 - Metabólitos secundários presentes no óleo essencial de Citrus paradisi.	30
Figura 8 - Planejamento simplex-centróide para o hidratante labial, onde LEV = levana, SOF= soforolipídio e OCP = óleo essencial de toranja.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Insumos empregados na formulação base do tipo O/A do hidratante labial.	39
Tabela 2 - Classificação da pele de acordo com a hidratação.....	48

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	107
ANEXO II - FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL	116
ANEXO III - FICHA DE EFEITO DA FORMULAÇÃO	118
ANEXO IV - CAPÍTULO DE LIVRO.....	119
ANEXO V – PATENTE DE PRODUTO.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Microgramas por mililitro
A/O	Água em óleo
Abs.	Absorbância
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butilhidroxitolueno
CER	Ceramidas
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMc	Concentração inibitória mínima da combinação
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
d	Diâmetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC	Estrato córneo
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
Ei	Espalhabilidade
EPS	Exopolissacarídeo
FT	Formulação Teste
FB	Formulação Base
$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas por litro
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HPPC	Produtos de Higiene, Perfumaria e Cosméticos
ICIF	Índice Concentração Inibitória Fracionada
kHz	Quilohertz
LEV	Levana

mg·L ⁻¹	Miligramas por litro
mg·mL ⁻¹	Miligramas por mililitro
MHA	Ágar Muller-Hinton
MHB	Caldo Muller-Hinton
mm ²	Milímetros quadrados
nm	Nanômetros
O/A	Óleo em água
OCP	Óleo Essencial de <i>Citrus paradisi</i>
OE	Óleo Essencial
OEs	Óleos Essenciais
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
PP	Polietileno
R ²	Coeficiente de determinação
RU	Retenção de umidade
SOF	Soforolipídio
SOFs	Soforolipídios
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
u.a.	Unidades Arbitrárias
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V	Viscosas
v/v	Volume/volume
λ	Comprimento de onda
μA	Micro Ampere

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	HISTOLOGIA LABIAL E O ESTADO DE HIDRATAÇÃO DO ESTRATO CÓRNEO	16
2.2	COSMÉTICOS LABIAIS EMULSIVOS	18
2.3	MOLÉCULAS BIOATIVAS OBTIDAS ATRAVÉS DA BIOTECNOLOGIA E SEU EMPREGO EM COSMÉTICOS	22
2.3.1	Levana	23
2.3.2	Soforolipídio	25
2.4	A UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM COSMÉTICOS	27
2.4.1	Óleo Essencial de <i>Citrus paradisi</i> (<i>Grapefruit</i> ou Toranja)	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	OBTENÇÃO DA LEVANA DE <i>BACILLUS SUBTILIS NATTO</i>	32
4.1.1	Microrganismo	32
4.1.2	Preservação do Microrganismo	32
4.1.3	Preparo do Inóculo	32
4.1.4	Síntese e Separação de Levana	33
4.2	OBTENÇÃO DO SOFOROLIPÍDIO DE <i>STARMERELLA BOMBICOLA</i>	33
4.2.1	Produção do soforolipídio	33
4.2.2	Extração e quantificação do soforolipídio	34
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ATIVOS	34
4.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do SOF e do OCP	34
4.3.2	Teste de Diluição em Caldo com Duplo Agente Antimicrobiano	35
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ATIVOS	36
4.5	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL SIMPLEX-CENTRÓIDE DAS FORMULAÇÕES	37
4.6	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE HIDRATANTE LABIAL A PARTIR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.7	CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS	40
4.7.1	Teste de Pré Estabilidade (Centrifugação)	40
4.7.2	Estabilidade Preliminar das Formulações	40
4.7.3	Ensaio Organoléptico	40
4.7.4	Ensaio Físico-Químico	42
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FORMULAÇÕES	43

4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	44
4.10	ENSAIO DE EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> E ANÁLISE SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES.....	44
4.10.1	Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos 44	
4.10.2	Local do Estudo	44
4.10.3	Delineamento do estudo	45
4.10.4	Critérios de Inclusão e Exclusão dos Participantes	47
4.10.5	Avaliação da Hidratação Cutânea por Método de Bioimpedância	48
4.10.6	Análise Sensorial das Formulações.....	49
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA - TESTES <i>IN VIVO</i>	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
	ARTIGO 1	52
	ARTIGO 2	79
	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXOS.....	107
	ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-UEL) (1/9)	107
	ANEXO II – FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL (1/2).....	116
	ANEXO III – FICHA DE EFEITO DA FORMULAÇÃO (1/1)	118
	ANEXO IV – CAPÍTULO DE LIVRO (1/24).....	119
	ANEXO V – PATENTE DE INVENÇÃO (1/2)	135

1 INTRODUÇÃO

Os lábios apresentam diversas funções fisiológicas no organismo humano (NIAMTU, 2018). Estes correspondem a uma extensão da mucosa oral para a região externa da face (BIELFELDT *et al.*, 2019), e apresentam histologia bem definida, sendo constituídos por fino estrato córneo (EC), formado por células de renovação mais rápida do que aquelas presentes no estrato córneo normal (LÓPEZ-JORNET; CAMACHO-ALONSO; RODRÍGUEZ-ESPIN, 2010).

Devido a sua proeminente localização na região facial, os lábios estão constantemente susceptíveis a influências do ambiente externo. Isto provoca alterações no estado de hidratação labial (GUEST *et al.*, 2013), aliado ao fato de o EC desta região apresentar rápida renovação celular, o que permite que corneócitos imaturos sejam expostos à superfície cutânea, permitindo que a água presente nos lábios apresente maior perda transepidérmica de água, o que resulta em ressecamento e aspereza (TAMURA *et al.*, 2016).

O emprego de produtos cosméticos para tratamento labial são uma excelente alternativa para auxiliar na manutenção e/ou reparação da hidratação dos lábios (BIELFELDT *et al.*, 2019). Nos últimos anos, a indústria cosmética tem prezado pelo desenvolvimento de formulações incorporando matérias-primas naturais, que apresentem melhor custo-benefício e que conferem proventos adicionais ao produto. Exopolissacarídeos (EPS), como o ácido hialurônico, tem sido vastamente empregados na cosmetologia com esta finalidade, por serem biocompatíveis e apresentarem diversas propriedades bioativas (DA SILVA *et al.*, 2019; DOS SANTOS *et al.*, 2011).

A levana (LEV), um EPS de frutose constituído por ligações do tipo $\beta(2\rightarrow6)$, apresenta elevado potencial para aplicação na indústria cosmética como princípio ativo, e é descrito na literatura por apresentar diversas potencialidades farmacológicas e propriedades bioativas, tais como antiviral, clareadora, hidratante e antioxidante, além de ser utilizada como emulsificante e agente encapsulante (RAGAB *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020).

Os sofrorolipídios (SOF) correspondem a biossurfactantes e apresentam sofroroses dissacarídicas(2'-O- β -D- glucopiranosil-1- β -D-glucopiranosose) unidas por ligações glicosídicas a uma cadeia de ácido graxo (HIPÓLITO *et al.*, 2020). Estes são produzidos a partir de cepas fúngicas não patogênicas, por meio de

processos fermentativos (VARVARESOU; IAKOVOU, 2015). Devido sua baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e boa compatibilidade com a pele, além de apresentarem diversas propriedades bioativas, como efeito hidratante, antimicrobiano e antioxidante, há elevado interesse no emprego destes biossurfactantes pela indústria cosmética (CHO; NG; YAP, 2022).

O emprego de óleos essenciais (OE) pela indústria cosmética tem apresentado destaque (SHARMEEN *et al.*, 2021), não somente pelo aroma, mas também, pela variedade de propriedades bioativas e farmacológicas advindas destes (CUNHA *et al.*, 2022). O óleo essencial de *Citrus paradisi* (toranja ou *grapefruit*), o qual é reconhecido como seguro para uso (GRAS), apresenta diversas propriedades bioativas, tais como antimicrobiana e antifúngica, as quais podem ser aplicadas no desenvolvimento de produtos cosméticos (DOSOKY; SETZER, 2018).

A qualidade de um produto cosmético envolve, dentre vários fatores, sua eficácia e o aspecto sensorial. Com a finalidade de avaliar efeitos de formulação, o estudo biofísico da pele têm sido amplamente empregado, como alternativa aos experimentos em animais, pois permite a aplicação de métodos que avaliam características cutâneas, como hidratação e oleosidade, por meio de técnicas não invasivas, rápidas e seguras (MELO; CAMPOS, 2016). Além da comprovação da eficácia clínica, é imprescindível que o produto apresente um bom sensorial (SHIRATA; CAMPOS, 2016), sendo a análise sensorial uma ferramenta útil e relevante para a cosmetologia, garantindo a qualidade dos produtos desenvolvidos com base nas expectativas do consumidor e nos benefícios frisados (MARTINS *et al.*, 2020).

Com base nas informações apresentadas, este trabalho apresentou como objetivo principal desenvolver um hidratante labial multifuncional como novo cosmético biotecnológico, contendo levana de *Bacillus subtilis* natto, soforolipídio de *Stammerella bombicola* e óleo essencial de *Citrus paradisi*, e avaliar a eficácia *in vivo* desta formulação, por meio de análise biofísica não-invasiva da hidratação e oleosidade labiais, bem como, verificar seu efeito sensorial, por meio da definição de intensidade de atributos, aceitação e intenção de compra.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTOLOGIA LABIAL E O ESTADO DE HIDRATAÇÃO DO ESTRATO CÓRNEO

Os lábios correspondem a uma estrutura que apresenta diversas funções fisiológicas no organismo humano, como a proteção da cavidade oral contra agentes externos, a regulação da temperatura e higrometria desta e o auxílio na ingestão de bebidas e alimentos (NIAMTU, 2018). Funções de relacionamento e estética também são atribuídas aos lábios, pois através de sua forma e deformação, advém o surgimento de expressões mímicas e orais durante a comunicação, sendo essa estrutura considerada um componente importante na simetria e estética facial (KAR *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2018).

Como extensão da mucosa oral para a região externa da face, os lábios correspondem a única região da mucosa oral que está exposta ao ambiente externo (BIELFELDT *et al.*, 2019b), a qual é completamente distinta da pele em seu entorno, por não apresentar glândulas sudoríparas ou pelos. A histologia dos lábios é bem definida, sendo essa região dividida em três porções distintas: a porção externa corresponde a pele, a porção intermediária à zona vermelha dos lábios (zona transicional) e a porção interna à mucosa labial (GHASEMI; AKBARI, 2022).

A pele, que se estende até a margem vermelha, é constituída por um epitélio escamoso queratinizado fino e estratificado, o qual apresenta menor quantidade de corneócitos do que a epiderme que não possui folículos pilosos. Já a superfície interna do lábio é constituída de epitélio mucoso, o qual é escamoso, estratificado, espesso e úmido. Este também reveste as bochechas e o assoalho da boca (GHASEMI; AKBARI, 2022).

A zona transicional, também denominada de área vermelha ou borda vermelha dos lábios, é constituída por tênue estrato córneo (EC, a parte mais superficial da epiderme), formado por células de renovação mais rápida do que aquelas presentes no estrato córneo normal (TAMURA *et al.*, 2018; BIELFELDT *et al.*, 2019a), e um epitélio escamoso estratificado queratinizado muito fino, o qual é desprovido de folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas (Figura 1) (NIAMTU, 2018). A vermelhidão desta região é proveniente da rica vascularização labial, em que os vasos sanguíneos têm acesso próximo à superfície devido as

numerosas e densamente compactadas papilas dérmicas (GHASEMI; AKBARI, 2022).

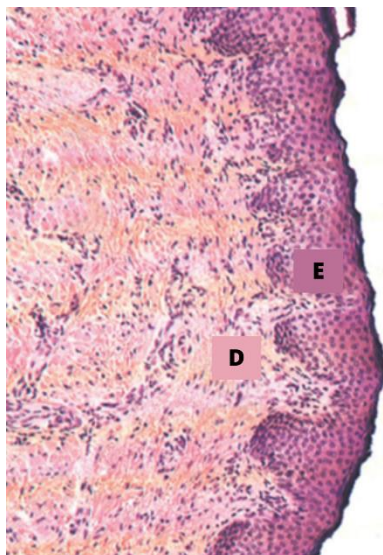


Figura 1 - Estrutura da borda vermelha dos lábios, em que D: Derme e E: Epitélio.

Fonte: Adaptado de Niamtu (2018).

Devido a sua proeminente localização na região facial, os lábios estão constantemente suscetíveis a influências do ambiente externo, como a radiação solar, ventos e temperaturas extremas, e a tratamentos farmacêuticos, incluindo os cosméticos e produtos dentários, os quais podem tornar os lábios ressecados (BIELFELDT *et al.*, 2019a). As principais causas do ressecamento e rachaduras labiais são a baixa capacidade de retenção de umidade do EC e uma função de barreira prejudicada. Devido a rápida renovação celular do EC labial, corneócitos imaturos são expostos à superfície cutânea, permitindo que a água presente nos lábios apresente maior perda transepidérmica de água, devido à baixa função de barreira e de capacidade de retenção de água, o que resulta em uma região seca e áspera (TAMURA *et al.*, 2018).

Dos diferentes mecanismos da pele, o estado de hidratação do EC é o mais comumente alterado no cotidiano (GUEST *et al.*, 2014) e para que uma barreira intacta seja mantida na epiderme, a quantidade adequada de água precisa estar presente nessa superfície. As ceramidas (CERs), principais constituintes dos lipídios intracelulares presentes no EC (cerca de 50%), apresentam papel fundamental na

função de barreira e na retenção de água pela epiderme. Estas, são menos presentes na região labial quando em comparação a outras regiões corporais, o que acarreta uma diminuição da função de barreira e da capacidade de reter água pelos lábios (TAMURA *et al.*, 2016; ISODA *et al.*, 2018).

A relação existente entre as ceramidas e os lábios é verificada por meio da rugosidade labial. O nível de CERs totais, sua espécie específica e o número total de carbonos constituintes influenciam diretamente na manutenção das funções do EC labial (BIELFELDT *et al.*, 2019b). CERs localizadas na região dos lábios apresentam menor comprimento de cadeia do que àquelas localizadas em outras partes do corpo humano, o que auxilia na perda transepidermica de água (GFELLER *et al.*, 2019). Lábios com superfície rugosa apresentam funções de barreira diminuídas quando comparados àqueles com superfície lisa, bem como, menores níveis de CERs (ISODA *et al.*, 2018) (Figura 2).

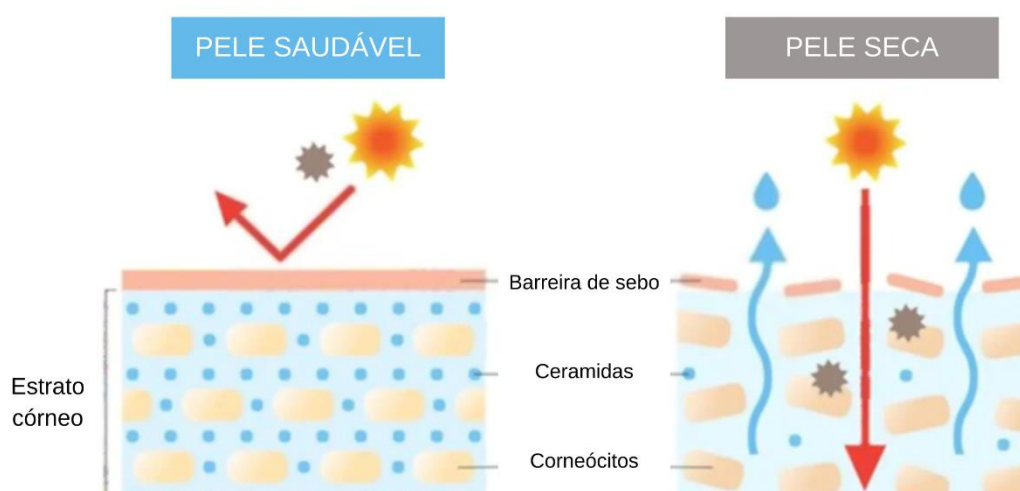


Figura 2 - Função de barreira do estrato córneo, destacando as ceramidas.

Fonte: Adaptado de site INNOVIST (2022).

2.2 COSMÉTICOS LABIAIS EMULSIVOS

Devido às características diferenciadas apresentadas pelos lábios, estes necessitam de cuidados especializados. Com o intuito de prevenir o ressecamento e aspereza destes, mantendo ou elevando os níveis de hidratação do

EC, produtos cosméticos para tratamento labial são uma excelente alternativa. Tais produtos apresentam em sua constituição insumos emolientes, como ceras e óleos, com o objetivo de reparar/prevenir condições de aspereza e ressecamento (BIELFELDT *et al.*, 2019a; GFELLER *et al.*, 2019).

Avaliando o panorama de consumo de produtos cosméticos no Brasil no ano de 2023, o país assumiu a quarta colocação no mercado consumidor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (US\$ 22,9 bilhões), e a sétima colocação no mercado mundial de consumo de maquiagens (ABIHPEC, 2023). Os cosméticos labiais correspondem a uma parcela significativa do valor total das indústrias cosméticas, pois apresentam produtos sem gênero específico para tratamento labial, os quais podem ser utilizados tanto pelo público feminino quanto o masculino. Além disso, são produtos de fácil uso, que podem ser aplicados e reaplicados diversas vezes, e que são encontrados em diferentes formas físicas (batom em bala e líquido, *gloss*, *balm* e emulsivos), ficando a critério dos consumidores aquele que melhor atende às suas necessidades (DAHMER *et al.*, 2022).

Grande parte dos cosméticos labiais encontrados no mercado apresentam formulação anidra, ou seja, são constituídos exclusivamente por insumos lipofílicos, como ceras, manteigas e óleos vegetais, sem a presença de água em sua composição. Exemplos destes produtos são os batons em bala e líquidos. Uma exceção à regra são os produtos labiais emulsivos, ou seja, emulsões destinadas a serem aplicadas nos lábios (SANGO; BINDER, 2017). Emulsões correspondem a sistemas coloidais comumente compostos por dois líquidos imiscíveis (normalmente óleo e água), em que um foi disperso no outro, gerando uma fase contínua e uma fase dispersa. Devido a esta característica, estes sistemas são muito instáveis, pois não há compatibilidade entre os líquidos formadores, sendo necessária a presença de um agente emulsificante (surfactante) para que ocorra a estabilização e formação da emulsão. A escolha destes surfactantes é determinada por meio de um equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) adequado, de modo a estabilizar a emulsão pela redução da tensão interfacial existente entre as duas fases (ZHU *et al.*, 2019).

O processo de emulsificação consiste basicamente na fragmentação de um dos líquidos na fase do outro, gerando uma grande quantidade de pequenas gotículas (RAVERA *et al.*, 2021). De acordo com a fase dispersa, sistemas emulsivos podem ser classificados em água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (Figura 3). Emulsões do tipo O/A consistem de gotículas de óleo dispersas na fase aquosa, e

emulsões do tipo A/O consistem em gotículas de água dispersas na fase oleosa contínua (ZHU *et al.*, 2019). Emulsões apresentam grande importância na indústria cosmética devido ao fato de serem um dos veículos mais comuns empregados em sistemas bifásicos, demonstrando grande versatilidade e uso generalizado em diversas categorias de cosméticos (VENKATARAMANI; TSULAIA; AMIN, 2020), além disso, permitem a combinação de insumos ativos hidrofílicos e lipofílicos na mesma formulação. Emulsões do tipo O/A comumente são empregadas em indústrias cosméticas na manufatura de cremes e loções, enquanto emulsões do tipo A/O são utilizadas no desenvolvimento de produtos mais resistentes, como protetores solares (CALVO *et al.*, 2020). No mercado brasileiro, as emulsões do tipo O/A são mais valorizadas, por permitirem um sensorial leve e menos oleoso, proporcionando sensações de leveza e refrescância (AMIRALIAN; FERNANDES, 2018).

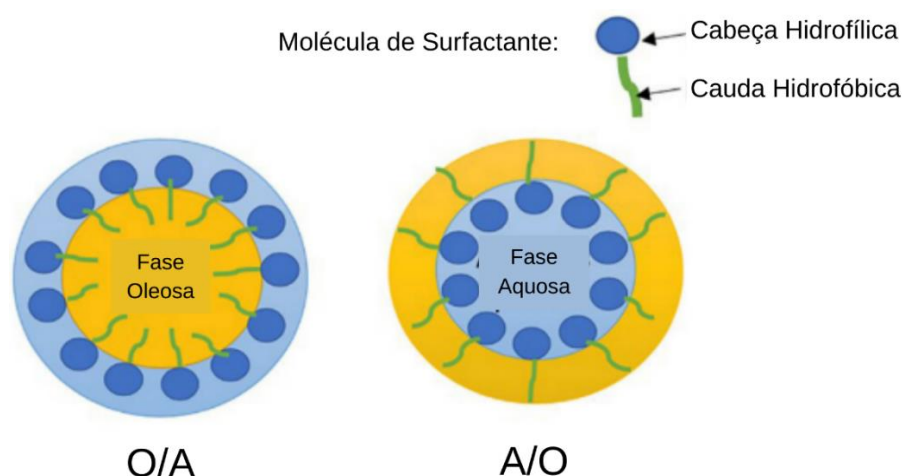


Figura 3 - Ilustração de sistemas emulsivos do tipo O/A e A/O.

Fonte: Adaptado de Venkataramani, Tsulaia e Amin (2020).

No desenvolvimento de diferentes tipos de emulsão, alguns fatores devem ser levados em consideração, pois estes são considerados importantes para garantir a estabilidade final do produto, a qual é caracterizada pela ausência de coalescência ou cremação e pela manutenção das características físicas apresentadas, como odor e cor (KHAN *et al.*, 2011). Dentre os fatores destacam-se a temperatura do sistema, a avaliação do EHL, a natureza do agente emulsionante e os mecânicos, como a velocidade de agitação da mistura, o tipo de equipamento utilizado e o processo de fabricação (AMIRALIAN; FERNANDES, 2018). A instabilidade das

emulsões (Figura 4 - Tipos de instabilidade de emulsões.) pode ser classificada, principalmente, em quatro fenômenos: floculação, cremação (*creaming*), coalescência e *breaking* (quebra).

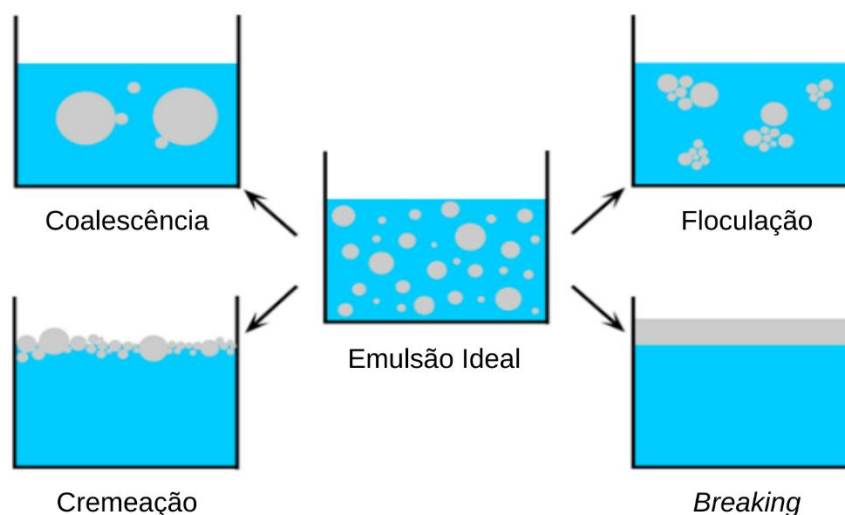


Figura 4 - Tipos de instabilidade de emulsões.

Fonte: Adaptado de Khan *et al.* (2011).

- **Floculação:** corresponde a associação de pequenas partículas da emulsão de modo a formar grandes aglomerados, os quais são redispersáveis. Este é um processo reversível e ocorre devido a presença de surfactantes em excesso na fase contínua, na forma de micelas, o que resulta em uma força atrativa entre as gotículas da fase dispersa.
- **Cremação (*creaming*):** corresponde ao fenômeno no qual a fase dispersa, mantendo sua forma de gotículas e partículas, se separa, formando uma camada no topo da fase contínua, a qual pode ser redispersada através de agitação. Isto ocorre devido a diferenças de densidade entre as fases.
- **Coalescência:** fenômeno relacionado ao processo de fusão entre duas ou mais gotículas da fase dispersa naquelas maiores, o que é gerado pela interrupção do filme líquido entre elas, quando a barreira é insuficiente para impedir a formação de gotas progressivamente maiores. Este processo é irreversível e ao final do processo irá gerar duas fases líquidas distintas.
- ***Breaking* (quebra):** fenômeno em que a fase dispersa se separa completamente da fase contínua, resultando em uma desestabilização irreversível.

Cosméticos labiais emulsivos exigem maior empenho em sua formulação devido a questões de estabilidade, como supra descrito, porém, apresentam textura agradável e podem prover benefícios adicionais, como os de tratamento, aos lábios, pela incorporação de diferentes insumos ativos, como vitaminas, antioxidantes e regeneradores labiais (DAHMER *et al.*, 2022).

2.3 MOLÉCULAS BIOATIVAS OBTIDAS ATRAVÉS DA BIOTECNOLOGIA E SEU EMPREGO EM COSMÉTICOS

A biotecnologia corresponde a uma ciência que permite o desenvolvimento de novos produtos e serviços, de modo eficiente, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida. Moléculas bioativas provenientes desta têm sido estudadas nos últimos anos devido às diversas propriedades biológicas que apresentam, bem como, seu caráter renovável (BIANCHET *et al.*, 2020). Na indústria cosmética, a biotecnologia tem ganhado grande espaço, pois auxilia no desenvolvimento de insumos e na avaliação do efeito destes na pele humana, especialmente, no que diz respeito aos ativos anti-idade, sendo uma excelente alternativa no desenvolvimento de produtos (GOMES *et al.*, 2020).

Antes da incorporação de um insumo obtido por biotecnologia em formulações cosméticas, alguns fatores são levados em consideração, tais como, a biocompatibilidade existente entre este e a pele e/ou os cabelos e a sua segurança para uso humano (SAJNA *et al.*, 2015). Uma das tecnologias empregadas pela biotecnologia clássica para o desenvolvimento de insumos e ativos é o processo fermentativo. Neste, microrganismos como fungos e bactérias, além de certas enzimas, são empregados na conversão de substratos (como glicose e oxigênio) em produtos (metabólitos primários e secundários), os quais podem ser álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos e, inclusive, antibióticos. Os produtos obtidos são dependentes do microrganismo, do substrato e das enzimas empregadas. Normalmente, as fermentações são conduzidas em biorreatores, os quais correspondem a equipamentos empregados para promover um ambiente adequado, com ótimas condições de temperatura, aeração e pH, em que os microrganismos

possam produzir de modo eficiente os produtos desejados, a partir dos substratos que são incorporados ao meio de cultura (GOMES *et al.*, 2020).

Diversos insumos empregados em cosméticos apresentam origem sintética e compostos químicos em sua composição, os quais podem gerar efeitos adversos. Associado à crescente preocupação com os impactos ambientais que tais insumos podem gerar ao ambiente, uma nova demanda por cosméticos verdes e mais naturais têm se fortificado desde os anos 90. Através da biotecnologia, insumos e ativos cosméticos começaram a ser produzidos com o intuito de apresentar eficiência e serem seguros para aplicação em formulações, tais como ácidos orgânicos, polissacarídeos e lipídios. Alguns exemplos de ativos obtidos por biotecnologia são ácido kójico, ácido hialurônico, levana, β -glucana e os soforolipídios (SAJNA *et al.*, 2015; VARVARESOU; IAKOVOU, 2015; GUPTA *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2020; FILIPE *et al.*, 2022).

2.3.1 Levana

A levana corresponde a um exopolissacarídeo (EPS) constituído por monômeros de D-frutose, unidos através de ligações glicosídicas do tipo $\beta(2\rightarrow6)$, as quais originam sua cadeia principal que pode apresentar pontos de ramificação do tipo $\beta(2\rightarrow1)$ e resíduos de glicose terminal (DE SIQUEIRA *et al.*, 2020; DOS SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011). Sua massa molecular corresponde a aproximadamente 60 mil moléculas de frutose unidas por meio de ligações glicosídicas (DA SILVA *et al.*, 2019).

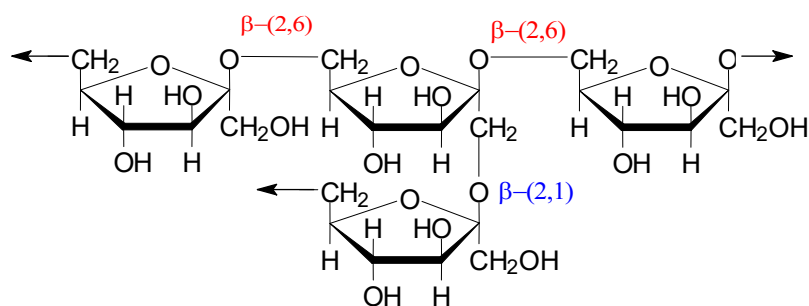


Figura 5 - Estrutura linear da levana com ligações principais do tipo $\beta(2,6)$ e suas

ramificações do tipo $\beta(2,1)$.

A síntese da levana ocorre principalmente pela enzima levanasacarase, a qual apresenta diversas funções: hidrólise da molécula de sacarose em glicose e frutose na ligação $\beta(2\rightarrow1)$; transferência do grupo frutossil para uma molécula aceptora (água, glicose, sacarose e frutana); e polimerização (DA SILVA et al., 2019). Este EPS pode ser produzido a partir de uma grande variedade de organismos, tais como bactérias (*Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis* e *Erwinia herbicola*), fungos (*Aspergillus sydowii* e *A. versicolor*) e plantas (DOMŻAŁ-KĘDZIA et al., 2019). A quantidade de biopolímero produzido está intimamente relacionada com as condições de crescimento celular e a composição do meio de cultura empregado, enquanto seu peso molecular, grau de polimerização e a formação de ramificações são determinados de acordo com o organismo produtor (microrganismos e plantas) (DOS SANTOS; CAVALCANTI; CELLIGOI, 2011; DA SILVA et al., 2019).

Zhang et al. (2014) e Wu, Chou e Shih (2013) verificaram em seus estudos que os principais fatores que afetam a produção de levana são: a concentração da fonte de carbono, a qual é diretamente proporcional a produção do EPS; o pH do meio, o qual está diretamente relacionado com a condição ótima de operação da enzima levanasacarase; o efeito dos íons metálicos selecionados para o meio fermentativo; a temperatura empregada para a biossíntese, a qual também se relaciona diretamente a ação da levanasacarase; o tempo de cultivo; e a velocidade de agitação e aeração do meio fermentativo. Normalmente, fermentação submersa é utilizada para a produção de levana microbiana. Para isto, é imprescindível a presença de uma fonte de carbono no meio de cultura, como a sacarose. Por apresentar baixos efeitos inibidores da levanasacarase, tal carboidrato é preferível, pois permite maior possibilidade de elevados rendimentos deste polissacarídeo (SRIKANTH et al., 2015).

A levana corresponde a um polímero anfifílico, que apresenta elevada solubilidade. Tal propriedade é atribuída a vasta quantidade de ramificações que este EPS possui. Em relação a viscosidade, a levana apresenta comportamento incomum frente aos demais polissacarídeos de elevado peso molecular, pois sua viscosidade intrínseca é de nível baixo, ou seja, sua contribuição no incremento da viscosidade de uma solução é baixa (DE SIQUEIRA et al., 2020; SRIKANTH et al., 2015). Este biopolímero também apresenta elevada estabilidade. Estudo frente a diferentes

temperaturas comprova que a levana apresenta resistência ao aquecimento (até 225 °C), bem como, estabilidade química, tanto em meios ácidos quanto básicos (DE SIQUEIRA *et al.*, 2020). Seu alto potencial como ingrediente ativo permite que a levana possa ser empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, devido sua ação como agente estabilizante, auxiliador de formulação, espessante e encapsulante, além de atuar como transportadora de aroma e fragrâncias (WU; CHOU; SHIH, 2013).

Dando enfoque especial à indústria cosmética, diversas propriedades apresentadas por esse polissacarídeo, tais como seu excelente poder de retenção de água (hidratação da pele), seu substancial efeito antioxidante e a capacidade de auxiliar na proliferação dos fibroblastos humanos e queratinócitos (efeito *filler*) de modo semelhante ao ácido hialurônico, atraem grande interesse no âmbito cosmetológico, principalmente, por se tratar de uma biomolécula sustentável (DA SILVA *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2005).

2.3.2 Soforolipídio

Os soforolipídios (SOFs) correspondem a biossurfactantes, classificados como glicolipídios extracelulares, e consistem em soforoses dissacarídicas (2'-O- β -D- glucopiranosil-1- β -D-glucopiranosose) unidas por ligações glicosídicas até uma cadeia de ácido graxo terminal (ω) ou subterminal (ω -1), constituída de 16 a 18 carbonos. Estes são produzidos sob duas diferentes conformações, a acídica e a lactônica (Figura 6), as quais apresentam diferentes propriedades e aplicações (HIPÓLITO *et al.*, 2020). A forma acídica apresenta dois grupos cabeça de soforose e ácido carboxílico, no qual o açúcar é acetilado. A forma lactônica é resultado da esterificação do ácido carboxílico para um anel dissacarídico (VARVARESOU; IAKOVOU, 2015).

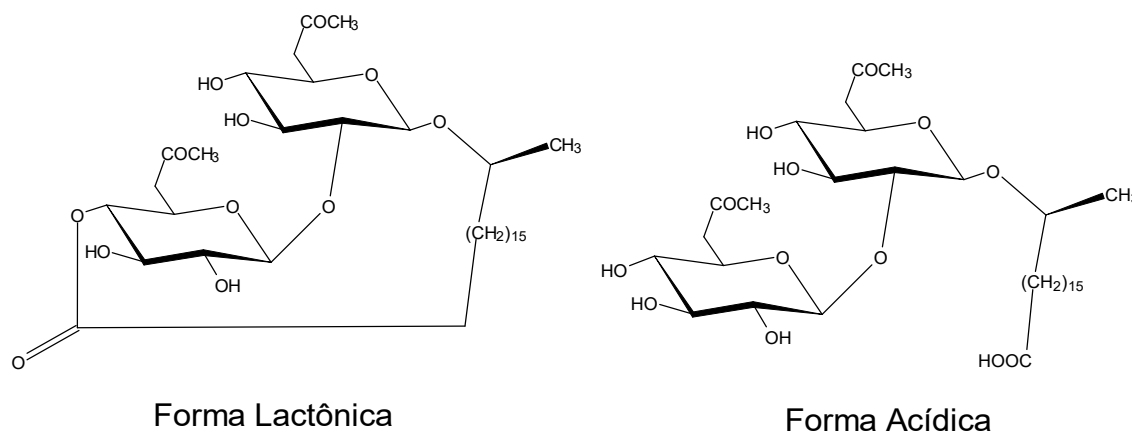


Figura 6 - Representação das conformações dos sofrorolipídios.

Estes são produzidos a partir de cepas não patogênicas dos fungos *Starmerella bombicola*, *Candida apicola*, *Rhodotorula bogoriensis* e *Wickerhamiella domercqiae*, através de processos fermentativos, sendo que maiores produções são obtidas quando do emprego dos primeiros. Excelentes produções são atingidas quando dois tipos de fonte de carbono, uma hidrofílica e uma lipídica, são empregadas no meio de fermentação. A estrutura dos SOFs pode ser modificada pela alteração dos substratos lipídicos durante a fermentação ou através de modificações catalisadas por enzimas após sua síntese microbiana (VARVARESOU; IAKOVOU, 2015).

Os sofrorolipídios apresentam baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade, o que atrai o interesse em sua pesquisa para aplicação como biossurfactante em diversas áreas, tais como a cosmética, farmacêutica, alimentícia e agrícola, reduzindo a tensão superficial e interfacial de sistemas, aumentando a dissolução de hidrocarbonetos, facilitando a solubilização e absorção de compostos (CHO; NG; YAP, 2022). Biossurfactantes, de modo geral, podem ser considerados uma alternativa verde frente aos demais surfactantes existentes no mercado, com algumas vantagens, tais como superior compatibilidade com o ambiente e um baixo perfil toxicológico. Diversos estudos têm demonstrado as aplicabilidades dos SOF's como emulsificantes de alimentos, agentes antimicrobianos e conservantes, e agentes antioxidantes (GAUR *et al.*, 2019; HIPÓLITO *et al.*, 2020; HIPÓLITO *et al.* 2021; COSTA *et al.*, 2022; FILIPE *et al.*, 2022).

No que diz respeito a indústria cosmética, o emprego de sofrorolipídios é promissor devido a boa compatibilidade com a pele apresentada por estes, suas propriedades hidratantes e sua atividade biológica, os quais podem ser empregados

no tratamento de acne e odores corporais (COSTA *et al.*, 2022; FILIPE *et al.*, 2022). Estudos realizados por Maeng *et al.* (2018) demonstraram que sofrólipídio derivado do óleo de cavalo hidrolisado apresentou excelente efeito antirugas e auxiliou na melhora da elasticidade e firmeza da pele. Diversos estudos a respeito da atividade antimicrobiana apresentada pelos SOFs demonstraram que estes possuem ação contra bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*), os quais são considerados os mais relevantes microrganismos encontrados em produtos cosméticos (CHO; NG; YAP, 2022). Devido a capacidade que possuem de reduzir a tensão interfacial e superficial de sistemas, os sofrólipídios são considerados bons agentes emulsificantes para emprego em emulsões cosméticas, pois podem auxiliar na estabilização destas, evitando separação de fases (ZERHUSEN *et al.*, 2019).

2.4 A UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM COSMÉTICOS

Devido à crescente demanda do público consumidor pelo desenvolvimento de formulações contendo ingredientes bioativos, sustentáveis e naturais, como alternativa aos insumos sintéticos e derivados petroquímicos que podem causar efeitos colaterais ao organismo humano, a pesquisa por ingredientes verdes, como plantas e seus derivados, apresentou impulso nos últimos anos (UBELAN *et al.*, 2022). O conhecimento sobre as propriedades biológicas apresentadas por estas permitiu a incorporação de novos insumos bioativos aos produtos formulados, os quais auxiliam na manutenção da saúde e beleza, e agregam valor no mercado cosmético (CARVALHO; ESTEVINHO; SANTOS, 2016).

A fragrância apresentada por um produto cosmético permite incremento em sua atratividade perante os consumidores. Odores agradáveis influenciam no conforto apresentado pelo produto ao ser aplicado e, inclusive, no seu efeito, sendo um diferencial na seleção de compra destes itens. Nos últimos anos, a indústria cosmética tem mostrado maior interesse por fontes naturais de fragrâncias, com base na atual demanda exigida pelo mercado. Dentre estas, o emprego de óleos essenciais (OE) tem apresentado destaque (SHARMEEN *et al.*, 2021), não somente pelo aroma, mas também, pela variedade de propriedades bioativas e farmacológicas

advindas destes, como efeitos analgésico, antimicrobiano, antioxidante, relaxante e antisséptico (CUNHA *et al.*, 2022). Óleos essenciais (OEs) têm sido incorporados em um grande espectro de produtos cosméticos, perfumes e produtos para uso do lar (GUZMÁN; LUCIA, 2021) e são considerados orgânicos, naturais e veganos, mesmo que não exista uma regulamentação específica para isto (ABELAN *et al.*, 2022).

OEs são produtos naturais altamente hidrofóbicos, que são extraídos de partes de plantas aromáticas, como flores, folhas, frutas e cascas, formando uma mistura complexa de moléculas que apresenta elevada volatilidade e odor característico. Os OEs correspondem a metabólitos secundários produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa, e que constituem uma ampla família de substâncias químicas com perfil único, o qual é definido pelos seus constituintes individuais. Esses são extraídos por diferentes processos, como destilação a vapor, prensagem a frio e extração por solvente, os quais interferem na sua atividade final. Fatores como as condições climáticas e a época de colheita das plantas, a espécie empregada e a parte vegetal utilizada para a extração também influenciam nesta atividade (CARVALHO; ESTEVINHO; SANTOS, 2016; GUZMÁN; LUCIA, 2021).

Do ponto de vista químico, os OEs são líquidos incolores, que apresentam menor densidade que a água e pouca ou nenhuma solubilidade neste solvente, porém, podem ser misturados com álcoois, éteres e lipídios. Esses são constituídos por uma mistura de compostos voláteis de baixo peso molecular, como terpenóides, compostos aromáticos, fenilpropanóides e hidrocarbonetos alifáticos, em diferentes concentrações, de acordo com as rotas biossintéticas específicas da planta (GUZMÁN; LUCIA, 2021).

O emprego de óleos essenciais em cosméticos ocorre em concentrações entre 1,0 e 2,0% para minimizar o risco da ocorrência de reações alérgicas (KACZMARCZYK *et al.*, 2015), facilitar a incorporação destes nas formulações e evitar desconforto por aromas intensos (MOSQUERA TAYUPANTA *et al.*, 2018). Devido às propriedades antimicrobianas apresentadas pelos OEs, formulações cosméticas desenvolvidas com estes compostos não requerem necessariamente um sistema conservante adicional, muitas vezes sintético (SARKIC; STAPPEN, 2018).

2.4.1 Óleo Essencial de *Citrus paradisi* (Grapefruit ou Toranja)

Citrus paradisi é a espécie da planta conhecida popularmente por *Grapefruit* ou Toranja, pertencente ao gênero *Citrus*, o qual é encontrado em plantas da família Rutaceae, uma das mais antigas e populares a ser cultivada (OKUNOWO *et al.*, 2013). As frutas pertencentes a este gênero, como limão, laranja, lima e toranja, são produzidas ao redor do mundo e vastamente consumidas por seus numerosos benefícios à saúde, especialmente, como fonte de vitamina C. Os OEs provenientes do gênero *Citrus* são vastamente empregados como aditivos e conservantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, pois são GRAS, ou seja, reconhecidos como seguros, além disso, apresentam aroma agradável e refrescante, o que permite a incorporação destes OEs em cosméticos e perfumes (DOSOKY; SETZER, 2018).

Os componentes majoritários dos OEs do gênero *Citrus* são D-limoneno, β -mirceno, α -pineno, β -pineno, γ -terpineno, α -terpinoleno, dentre outros, os quais são responsáveis pelas propriedades biológicas apresentadas por estes (OKUNOWO *et al.*, 2013). OE de *Citrus paradisi* (OCP) é rico em monoterpenos, apresentando como componente principal o D-limoneno, seguido por α -pineno, β -mirceno, sabineno e nootkatone, o que gera excelentes atividades antioxidante e antimicrobiana (Figura 7). A porção não volátil deste OE é constituída por bergamotina, bergapteno e epoxibergamotina (DOSOKY; SETZER, 2018).

Dentre as propriedades do OCP descritas na literatura apresentam destaque seu efeito antiobesidade, pela facilitação da lipólise, sua promoção de limpeza corporal pela eliminação de toxinas e fluidos em excesso e seu efeito larvicida. Para aplicação cosmética, destacam-se seus efeitos antimicrobiano e antifúngico. O OE de *Citrus paradisi* também é reconhecido como GRAS, porém, leve sensibilização pode ocorrer caso este esteja oxidado. O OCP obtido por destilação não é considerado fototóxico, diferentemente daquele obtido por outros métodos. Não obstante, seu máximo nível para uso dérmico é de 4,0% e seu risco fototóxico é considerado baixo (TISSERAND; YOUNG, 2014; DOSOKY; SETZER, 2018).

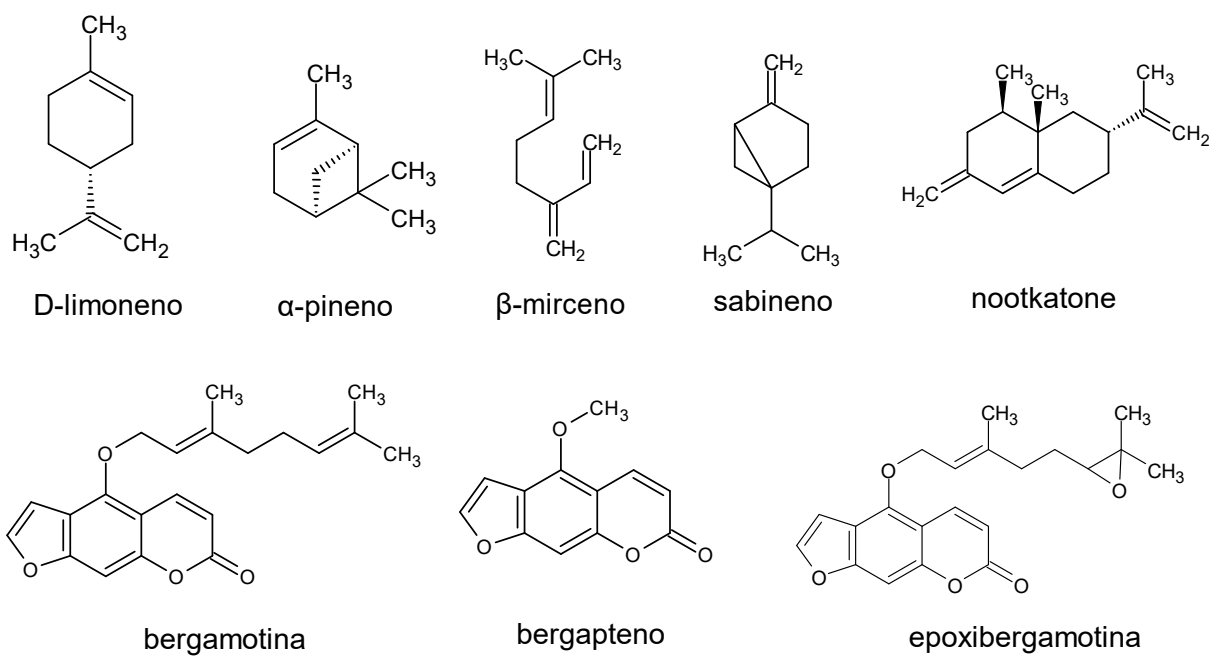


Figura 7 - Metabólitos secundários presentes no óleo essencial de *Citrus paradisi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um hidratante labial multifuncional contendo levana de *Bacillus subtilis natto*, soforolipídio de *Stammerella bombicola* e óleo essencial de *Citrus paradisi*, que apresente propriedades hidratante, antimicrobiana e antioxidante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir levana de *Bacillus subtilis natto* e soforolipídio de *Stammerella bombicola* através de fermentação;
- Determinar a concentração inibitória mínima do soforolipídio e do óleo essencial de *Citrus paradisi*, isolados e combinados, para definir as concentrações destes ativos a serem empregadas;
- Verificar a atividade antioxidante da levana, do soforolipídio (SOF) e do óleo essencial de *Citrus paradisi* (OCP);
- Desenvolver as formulações do hidratante labial empregando planejamento simplex-centróide;
- Proceder com a caracterização farmacotécnica das formulações;
- Realizar ensaios de estabilidade preliminar das formulações desenvolvidas;
- Verificar a eficácia das formulações por meio de ensaio de atividade antioxidante;
- Selecionar a melhor formulação através de Superfície de Resposta;
- Avaliar a eficácia da formulação otimizada frente a hidratação e oleosidade labiais, por ensaio *in vivo*, empregando aparelho não-invasivo;
- Realizar análise sensorial (intensidade de atributos, escala hedônica e intenção de compra) da formulação otimizada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA LEVANA DE *BACILLUS SUBTILIS NATTO*

4.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a obtenção de levana foi o *Bacillus subtilis natto* CCT 7712, uma cepa não patogênica isolada de soja fermentada, um alimento japonês conhecido como “natto”, pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Fundação André Tosello (Campinas).

4.1.2 Preservação do Microrganismo

O meio de preservação da cepa do *B. subtilis natto* CCT7712 apresentava em sua constituição peptona (50 g·L⁻¹), extrato de carne (30 g·L⁻¹) e ágar (20 g·L⁻¹). Este foi autoclavado a 121 °C, durante 15 minutos. O cultivo do microrganismo ocorreu por 24 horas, a 37 °C, e depois este foi mantido em câmara fria a 4 °C para posterior repique a cada 45 dias (BERSANETI *et al.*, 2017).

4.1.3 Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo ocorreu por fermentação em batelada, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio, o qual era constituído por (em g·L⁻¹) (CALAZANS *et al.*, 2000): sacarose, 100; extrato de levedura, 2; fosfato de potássio monobásico, 2; sulfato de amônio, 1; e sulfato de magnésio 0,5. Os frascos foram incubados em mesa agitadora tipo *shaker* durante 24 horas, a 37 °C, e 150 rpm, com inóculo padronizado de 0,2 g·L⁻¹ para todas as fermentações (BERSANETI *et al.*, 2017). Centrifugação foi empregada para a interrupção dos cultivos, durante 10 minutos, a 6000 rpm. As células foram posteriormente ressuspensas em solução salina (NaCl a 0,9%) e lidas a 400 nm, e o sobrenadante foi usado como fonte de enzima (levanasacarase).

4.1.4 Síntese e Separação de Levana

A levana foi produzida pela enzima levanasacarase em meio (em g·L⁻¹): sacarose, 420,7; 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) em pH 7,0, a 150 rpm e 37 °C, por 24 h.

Após a interrupção do cultivo, do sobrenadante foi precipitada a levana com etanol absoluto na proporção de 1:3 v/v (sobrenadante: etanol), sendo o sistema mantido em repouso durante 12 horas a 4 °C, e posteriormente, centrifugação a 6500 rpm, durante 20 minutos e a 4 °C foi empregada para a obtenção da levana. Após a evaporação completa do etanol, o pellet foi lavado com água destilada, centrifugado nas mesmas condições, homogeneizado e dialisado contra água destilada, durante 48 horas, com três trocas diárias da água e após este processo, foi congelada e liofilizada (BERSANETI et al., 2017; DA SILVA et al., 2020; DE MELO, ZAIA e CELLIGOI, 2012).

4.2 OBTENÇÃO DO SOFOROLIPÍDIO DE *STARMERELLA BOMBICOLA*

4.2.1 Produção do sofrorolipídio

A produção do sofrorolipídio foi realizada em biorreator de bancada, com capacidade de 5 L e volume operacional de 3,5 L. O meio de fermentação foi composto por (em g·L⁻¹): ácido oleico, 220; glicose, 200; e extrato de levedura, 6. As condições mantidas foram taxa de aeração de 1,0 vvm, agitação de 450 rpm, temperatura de 30 °C e pH 3,5 (SILVEIRA et al., 2019). O inóculo da levedura *S. bombicola* foi em meio composto de (em g·L⁻¹): glicose, 10; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; e peptona, 5. O cultivo foi realizado em *shaker* orbital a 150 rpm, por 48 horas a 30 °C (BAJAJ; ANNAPURE, 2015). O inóculo foi padronizado a 0,5 g·L⁻¹, correlacionando a uma curva de biomassa em g·L⁻¹ a $\lambda=600$ nm.

4.2.2 Extração e quantificação do soforolipídio

As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 6000 rpm, por 15 minutos. Do precipitado foi avaliada a biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e do sobrenadante, foi quantificado os soforolipídios e o consumo de substratos (MINUCELLI *et al.*, 2017). A biomassa foi lavada três vezes em acetato de etila na proporção de 1:1 (v/v) para remoção de impurezas. O sobrenadante (soforolipídios), foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila (1:1 v/v) e rotaevaporado. A fração obtida foi submetida a nova extração em funil de separação com solução metanol:água (4:1, v/v) e hexano (v/v), nas proporções de 1:1 (v/v), para obtenção do soforolipídio bruto retido na fração metanólica e remoção de impurezas lipídicas presentes na fase hexânica. Após a secagem do metanol, o soforolipídio foi submetido à três extrações com acetato de etila:água (3:1) por 40 minutos à 4 °C, para eliminação de possíveis açúcares residuais na fase aquosa. A quantificação do soforolipídio foi realizada pelo método gravimétrico. Este foi seco em estufa até eliminação completa do solvente e posteriormente liofilizado, para aplicações.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ATIVOS

4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do SOF e do OCP

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o método de diluição em caldo do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines*, 2021), com algumas modificações. As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Streptococcus mutans* UA 159 foram tratadas com as faixas de concentrações de $0,003 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,184 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de soforolipídio e $0,66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $41,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o OCP, ambos solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). O ensaio foi realizado em microtubos, em triplicata e em três ocasiões diferentes.

Colônias isoladas de cultura bacteriana crescidas em ágar Muller-Hinton (MHA, Difco) (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e ágar Brain Heart Infusion Broth (BHI, Himedia) (*S. mutans*), foram suspensas em solução salina (0,85% cloreto de

sódio, p/v, Merck) e ajustadas à escala 0,5 de McFarland, para obtenção de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC·mL⁻¹). Após a diluição de 1:100 em da suspensão bacteriana em Caldo Muller-Hinton (MHB, Difco) e Caldo BHI (Himedia), 50 µL foram inoculados nos respectivos tratamentos com os antimicrobianos, nas concentrações descritas anteriormente. Meio de cultura, ativos antimicrobianos e DMSO na ausência de inóculo foram testados como controle de esterilidade. O controle positivo para crescimento bacteriano foi realizado com o preparo de inóculo em meio de cultura na ausência de antimicrobiano.

Os microtubos foram incubados por 24h, a 37 °C (para *S. mutans* a incubação ocorreu em estufa com circulação de 4,5% de CO₂), e a MIC foi determinada como a menor concentração dos agentes antimicrobianos capaz de inibir o crescimento bacteriano visível.

4.3.2 Teste de Diluição em Caldo com Duplo Agente Antimicrobiano

A interação entre o soforolipídio e o OCP contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Streptococcus mutans* UA 159 foi determinada pelo teste de diluição em caldo de duplo agente antimicrobiano, como descrito por García-García *et al.* (2011), com algumas modificações. Combinações de soforolipídio e OCP foram testadas em concentrações variando entre 0,003 mg·mL⁻¹ – 0,092 mg·mL⁻¹ e 5,22 mg·mL⁻¹ - 41,75 mg·mL⁻¹, respectivamente, ambos solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). Colônias isoladas de cultura bacteriana semeadas em MHA (Difco) (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e meio ágar BHI (Himedia) (*S. mutans*), foram suspensas em solução salina (0,85% cloreto de sódio, p/v, Merck) e ajustadas à escala 0,5 de McFarland, para obtenção de $1,5 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹. Após a diluição de 1:100 da suspensão bacteriana em MHB (Difco) e Caldo BHI (Himedia), 50 µL foram inoculados nos tratamentos com os respectivos antimicrobianos em combinação, nas concentrações descritas anteriormente. Meio de cultura, ativos antimicrobianos e DMSO na ausência de inóculo foram testados como controle de esterilidade. O controle positivo para crescimento bacteriano foi realizado com o preparo de inóculo em meio de cultura na ausência de antimicrobiano.

Os microtubos foram incubados por 24h, a 37 °C (para *S. mutans* a incubação ocorreu em estufa com circulação de 4,5% de CO₂). A interação dos

compostos foi analisada pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), obtido na equação 1 pela soma da Concentração Inibitória Fracionária (CIF) do sofrorolipídio (Equação 2) e do OCP (Equação 3). ICIF é interpretado como sinérgico quando seu resultado é $\leq 0,5$, aditivo quando o resultado é $> 0,5$ e ≤ 1 , indiferente quando resulta em > 1 e < 4 , e antagonista quando o resultado é ≥ 4 (Odds, 2003).

$$FICI = FIC_{SOF} + FIC_{OCP} \quad (\text{Equação 1})$$

$$FIC_{SOF} = \frac{CIM_{combinação}}{CIM_{individual}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$FIC_{OCP} = \frac{CIM_{combinação}}{CIM_{individual}} \quad (\text{Equação 3})$$

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ATIVOS

Para a análise da capacidade antioxidante dos ativos a serem empregados no hidratante labial, metodologia descrita por Srikanth *et al.* (2015) foi empregada, com adaptações. Inicialmente, o DPPH foi dissolvido em etanol para obter uma solução de concentração 250 μM e esta foi mantida ao abrigo da luz. Soluções testes foram preparadas em diferentes concentrações, na forma de curva: a LEV foi dissolvida em água nas concentrações de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; o SOF foi dissolvido em etanol nas concentrações de 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; e o OCP foi dissolvido em etanol nas concentrações de 1 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 50 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a mistura reacional, 1 mL das soluções teste mais 0,3 mL da solução DPPH foram adicionadas em tubos de ensaio envoltos em papel craft, procedimento realizado em triplicata, e estes foram mantidos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Para o branco, 1 mL das soluções teste e 0,3 mL de etanol foram utilizados. O controle foi composto por 1 mL de etanol e 0,3 mL de solução DPPH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 517 nm. A taxa de inibição (%) do radical livre foi calculada conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{(\text{abs. do controle} - \text{abs. da amostra})}{\text{abs. do controle}} \right) \times 100$$

Em que:

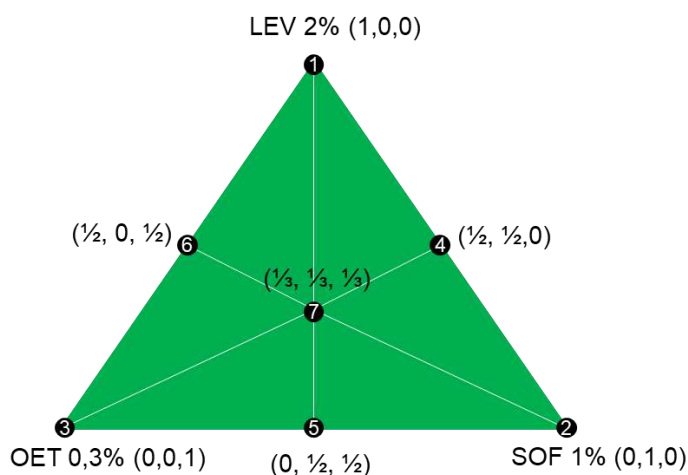
Abs. do controle: absorbância do controle;

Abs. da amostra: absorbância da amostra.

4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL SIMPLEX-CENTRÓIDE DAS FORMULAÇÕES

O planejamento experimental simplex-centróide para três componentes consiste em um triângulo equilátero que apresenta em seus vértices os componentes da mistura, em suas arestas uma mistura binária de mesma proporção de cada variável, e um ponto central constituído de uma mistura ternária de mesma proporção dos componentes empregados. No estudo realizado, as três diferentes variáveis empregadas no planejamento foram: levana (2,0%; p/p), soforolipídio (1,0%; p/p) e óleo essencial de toranja (0,3%; p/p), conforme a Figura 8. As concentrações de soforolipídio e óleo essencial foram definidas de acordo com suas propriedades antimicrobianas.

Figura 8 - Planejamento simplex-centróide para o hidratante labial, onde LEV = levana, SOF= soforolípido e OCP = óleo essencial de toranja.



4.6 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE HIDRATANTE LABIAL A PARTIR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Oito formulações, do tipo emulsão O/A foram desenvolvidas, cuja composição da formulação base (FB) está descrita na Tabela 1. A formulação está em tramitação para seu depósito de patente, desta forma, o sigilo sobre a concentração foi preservado. O preparo das formulações ocorreu de acordo com metodologia descrita por Oliveira e Moraes (2019), com adaptações. Inicialmente, todos os componentes sólidos e líquidos foram pesados, em balança analítica, de acordo com a fase em que seriam incorporados. Em um béquer de 250 mL foram adicionados os insumos da fase A, com exceção do Copolímero de acrilato de sódio e lecitina, e em um béquer de 50 mL os insumos da fase B. A fase A foi colocada sob uma chapa de aquecimento até que atingisse a temperatura de 75 °C. Com o auxílio de um agitador mecânico (Fisatom 713D) o Copolímero de acrilato de sódio e lecitina foi adicionado aos poucos no sistema, sob agitação constante de 800 rpm, a qual foi aumentada para 1500 rpm até que este estivesse completamente dissolvido no sistema, formando um gel-creme.

Em seguida, a fase A foi colocada sob a chapa de aquecimento até atingir a temperatura de 75 °C, bem como a fase B. Quando ambas atingiram 75 °C,

a fase B foi vertida sobre a fase A, sob agitação inicial de 800 rpm, a qual foi aumentada gradativamente até atingir 1500 rpm, até ser formada uma emulsão branca e homogênea. A agitação foi mantida até que o sistema fosse resfriado a 40-35 °C, quando ocorreu a adição do conservante (fase C). Após cessar a agitação, foi verificado o pH da emulsão formada, o qual deveria estar entre 6,0 e 7,0. Caso este não estivesse na faixa determinada, eram adicionadas gotas de solução 20% (v/v) de hidróxido de sódio (fase D) e o sistema homogeneizado para correção do pH.

Tabela 1 – Insumos empregados na formulação base do tipo O/A do hidratante labial.

Fase	Nome Químico	INCI Name	Marca
A	Água Destilada	Water/Aqua	--
A	EDTA-Na	Dissodium EDTA	Embacaps
A	Sacarina Sódica	Sacharrin Sodium	Henrifarma
A	Glicerina	Glycerin	Alphatec
A	Copolímero de acrilato de sódio e lecitina	Sodium Acrylates Copolymer (and) Lecithin	Lucas Meyer
B	Óleo de Rícino	Ricinus Communis (Castor) Seed Oil	Dinâmica
B	Triglicérides de Ácido Cáprico/Caprílico	Caprylic/Capric Triglyceride	Fagron
B	Manteiga de Karité	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	Infinity Pharma
B	BHT	Butylated hydroxytoluene	Biovital
B	Mentol	Menthol	Biovital
B	Polissorbato 80	Polysorbate 80	Synth
C	Fenoxietanol e Metilisotiazolinona	Phenoxyethanol (and) Methylisothiazolinone	Embacaps
D	Hidróxido de sódio (solução 20%)	Sodium hydroxide	Organic Compounding

Após o preparo das formulações, estas foram armazenadas em frascos plásticos de polietileno (PP) com capacidade de 100 mL, sendo mantidas sob refrigeração, por um período de 24 horas, para a realização de testes posteriores de centrifugação (pré estabilidade).

4.7 CARACTERIZAÇÃO FARMACOTÉCNICA DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

4.7.1 Teste de Pré Estabilidade (Centrifugação)

Teste de centrífuga foi desenvolvido com todas as formulações, 24 horas após seu preparo, amparando assim na triagem destas. Para o desenvolvimento do teste, 5 g de cada formulação, em triplicata, foram acondicionados em tubos Falcon de 15 mL, e submetidos à centrifugação (Centrífuga Baby, Fanem®) durante 30 minutos, à 2800 rpm (BRASIL, 2004).

4.7.2 Estabilidade Preliminar das Formulações

Os ensaios de Estabilidade Preliminar para as amostras de hidratante labial foram realizados de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004). O período de duração do teste foi de 15 dias (7 ciclos), sendo as análises desenvolvidas no tempo zero (24 horas) e após 15 dias. As condições de armazenamento empregadas foram: estufa (40 ± 2 °C) e geladeira (5 ± 2 °C). Os parâmetros organolépticos e físico-químicos foram paralelamente avaliados. O ensaio foi realizado em triplicata e uma amostra de referência foi mantida ao abrigo da luz para fins comparativos.

4.7.3 Ensaio Organolépticos

Conforme o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2008), foram realizados ensaios de aspecto, cor, sabor e odor para as formulações O/A desenvolvidas. Todos os testes também foram realizados em paralelo aos testes de estabilidade preliminar (tempo 0 e tempo 15) e em triplicata.

4.7.3.1 Aspecto

O ensaio de aspecto foi realizado por meio de comparação, a nível macroscópico, das formulações desenvolvidas em relação ao controle (base), 24 horas após o preparo destas, com o intuito de verificar se ocorreu alguma instabilidade, como separação de fases, precipitação ou turvação. Posteriormente, este foi descrito (homogêneo, viscoso, leitoso, dentre outros) e classificado em normal, levemente modificada, modificada ou intensamente modificada (BRASIL, 2004).

4.7.3.2 Cor

O ensaio de coloração foi realizado por meio de análise macroscópica das formulações, 24 horas após seu preparo, sendo 1,5 g de cada amostra transferidos para placas de Petri colocadas sobre um fundo preto, sob condições de luz branca artificial, comparando estas com a amostra controle, sendo que todas as amostras foram armazenadas em condições e embalagens semelhantes. Posteriormente, as amostras foram classificadas em normal, levemente modificada, modificada ou intensamente modificada.

4.7.3.3 Sabor

O ensaio de sabor foi realizado diretamente através do paladar, ao serem aplicadas as formulações dos hidratantes labiais sobre os lábios. Estas foram comparadas ao controle, 24 horas após seu preparo, e posteriormente classificadas em normal, levemente modificada, modificada e intensamente modificada (BRASIL, 2004).

4.7.3.4 Odor

A análise olfativa foi realizada por meio de comparação do odor das amostras formuladas em referência a amostra controle, através do olfato, sendo que

todas as amostras foram armazenadas em condições e embalagens semelhantes, e posteriormente classificadas em normal, levemente modificada, modificada e intensamente modificada (BRASIL, 2004).

4.7.4 Ensaios Físico-Químicos

Para as formulações O/A dos hidratantes labiais foram realizados ensaios de pH, espalhabilidade e retenção de umidade. Estes foram realizados em triplicata e, também, em paralelo ao teste de estabilidade preliminar (BRASIL, 2004).

4.7.4.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Para a determinação do pH das amostras, foi realizada a inserção direta do eletrodo (ST230, OHAUS) nas formulações, após este ter sido previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. O ensaio foi reproduzido em triplicata (BRASIL, 2008).

4.7.4.2 Espalhabilidade

A avaliação da espalhabilidade dos hidratantes labiais ocorreu por meio do método de placas paralelas, com adaptações, e o ensaio foi realizado em triplicata. Para isto, 1 g das formulações foi transferido sobre o ponto central de uma placa de vidro (20 cm x 20 cm), contida sobre uma escala de papel milimetrado. Sobre as formulações, foi adicionada uma placa de vidro de massa conhecida para determinar a superfície que estas ocuparam após um minuto de pressão, por meio da leitura dos diâmetros abrangidos. Posteriormente, pesos (2 g, 5 g e 10 g) de massa conhecida foram adicionados sobre a placa de vidro, sendo o processo de leitura dos diâmetros abrangidos após um minuto repetido para todos eles. Cálculo posterior do diâmetro médio (KNORST, 1991) foi realizado e os resultados obtidos através da seguinte equação:

$$E_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra (mm²) para um determinado peso (g);

d = diâmetro médio (mm).

4.7.4.3 Retenção de umidade

A retenção de umidade (RU) das formulações dos hidratantes labiais foi avaliada por método gravimétrico, de acordo com metodologia proposta por Zhang *et al.* (2012). Em cadinhos previamente tarados, foram adicionados 1g das formulações mais 1 mL de água destilada, sendo o sistema homogeneizado. Em seguida, estes foram acondicionados em dessecador de umidade selado com solução saturada de K₂CO₃ (43% de umidade relativa), por um período de 96 horas, a temperatura ambiente. A porcentagem de RU foi calculada conforme equação abaixo, pela porcentagem de água residual nas amostras.

$$RU(\%) = \frac{PT}{P0} \times 100$$

Onde:

PT: Peso final;

P0: Peso inicial.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FORMULAÇÕES

Para a análise da capacidade antioxidante das formulações de hidratante labial, método do DPPH foi empregado, conforme metodologia descrita no item 4.4. As soluções testes foram preparadas na concentração de 400 mg·mL⁻¹, com adição de etanol e posterior homogeneização em vórtex durante 2 minutos, para

dissolução completa da formulação no solvente. Em seguida, o sistema foi filtrado em papel filtro. Vale ressaltar que para a realização desta análise, todas as formulações foram produzidas sem a adição de BHT em sua composição, pois este é um excelente antioxidante e poderia vir a interferir nos resultados obtidos.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, para verificação da normalidade. Caso distribuição normal, todos os dados foram estatisticamente comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA), e para comparação de diferenças individuais entre as médias, teste de Tukey. Caso a distribuição não fosse normal, teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn foram empregados. Em todos os casos, um nível de significância de $p < 0,05$ foi aceito para denotar significância. Análise de superfície de resposta (*Software Statistica* versão 7.0.0) também foi realizada para definição da formulação final do estudo.

4.10 ENSAIO DE EFICÁCIA *IN VIVO* E ANÁLISE SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES

4.10.1 Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, segundo a Resolução nº446/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e tem como CAAE 58720522.9.0000.5231.

4.10.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado em dois ambientes distintos. A primeira etapa, que corresponde ao desenvolvimento e caracterização das formulações, foi realizada no Laboratório de Inovação e Tecnologia Cosmecêutica – LABITEC, localizado no

Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Hospital Universitário de Londrina (HU), situado na Av. Robert Koch, 60 - Operária, Londrina - PR, 86038-350.

A segunda etapa, que corresponde às avaliações *in vivo* e análise sensorial, foi realizada no Laboratório de Análises Sensoriais, localizado no Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA, na Rodovia Celso Garcia Cid - PR-445 - Km 380, Campus Universitário, CEP 86057-970 - Londrina – PR. Neste local foram realizadas a triagem dos voluntários e as medições biofísicas para o parâmetro de hidratação, além dos ensaios sensoriais.

4.10.3 Delineamento do estudo

O delineamento empregado no estudo foi experimental, do tipo ensaio clínico randomizado. A eficácia de duas diferentes formulações semissólidas foi avaliada frente a um parâmetro biofísico da pele humana: a hidratação. Técnica de escala de intensidade foi aplicada para levantar atributos e perfis das formulações. A aceitação e intenção de compra das formulações também foram avaliadas através de análise sensorial, bem como, o efeito (regeneração labial) destas. As formulações avaliadas apresentaram em sua composição matérias primas cosméticas convencionais e comumente empregadas, em concentrações sugeridas pelos fabricantes.

O equipamento utilizado para a avaliação dos parâmetros biofísicos foi o Analisador de Pele Digital Facial Skin Analyser (SkinUp® Beauty Devices). A análise sensorial foi feita em duas etapas e através de aplicação de questionário, os quais foram entregues diretamente aos avaliadores. Na primeira etapa, escala de intensidade, aceitação e intenção de compra dos produtos foram avaliados. Na segunda etapa, o efeito (regeneração labial) da aplicação do cosmético contendo as moléculas bioativas e óleo essencial de toranja foi avaliado.

A população do estudo foi composta por 61 voluntários sadios, do sexo feminino, com idades entre 18 e 40 anos. Estes foram selecionados a partir de convite verbal e em meio digital (redes sociais) pela equipe de pesquisadores, sendo instruídos dos objetivos e métodos do estudo a ser desenvolvido. Em caso de aceite, os voluntários foram avaliados pela coordenadora deste projeto, e após

esclarecimentos sobre o estudo, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi solicitada.

Para a análise de hidratação cutânea, os voluntários selecionados foram divididos aleatoriamente em dois grupos de tratamento, sendo eles G1: grupo experimental, que utilizou exclusivamente a formulação do estudo (hidratante labial contendo as biomoléculas), o qual apresentou 26 participantes; G2: grupo controle, que utilizou exclusivamente a formulação controle do estudo (hidratante labial sem levana e ativos), o qual apresentou 30 participantes. O estudo foi conduzido como duplo cego em relação ao conteúdo dos produtos aplicados. Foi solicitado aos voluntários que durante o período de estudo apenas utilizassem na região labial os cosméticos fornecidos, de modo a evitar possíveis interferências.

Os participantes foram orientados sobre o modo de aplicação dos produtos, o qual deveria ocorrer diretamente sobre os lábios previamente higienizados com água micelar (a qual foi entregue ao voluntário), sendo em seguida enxaguados e secos com toalha macia, e aplicando suavemente e de modo uniforme, duas vezes ao dia (manhã e noite), o hidratante labial, durante um período de 7 dias. A aplicação ocorreu a partir do próprio aplicador da bisnaga labial em contato com os lábios, sem interação de outras partes corporais, como as mãos, do paciente com a formulação. Uma planilha para o controle de aplicação diária foi entregue para cada voluntário e uma lista de transmissão foi criada para lembrar sobre a aplicação dos produtos. Foi recomendado que um *wash-out* sem cosméticos labiais ou qualquer terapia tópica labial fosse realizado 12 horas antes da aplicação dos produtos em estudo.

A coleta das medidas foi efetuada no tempo zero (valor basal) e 7 dias após autoaplicação diária dos hidratantes labiais. A região do lábio inferior foi selecionada para as medidas, sendo higienizada com água micelar previamente à coleta dos dados. Foram empregadas seis repetições para a análise de hidratação. Foi recomendado que antes das medições os voluntários não fizessem uso de surfactantes ou detergentes na região dos lábios (12 horas antes) e evitassem se alimentar ou ingerir líquidos (2 horas antes).

O acompanhamento do tratamento com o hidratante labial também foi feito por meio dos seguintes instrumentos: 1) Fotodocumentação dos lábios, a qual ocorreu em condições padronizadas de iluminação, fundo e posicionamento. O registro fotográfico ocorreu no tempo zero (antes do início da aplicação dos hidratantes labiais) e no tempo 7 dias (ao final do tratamento).

A análise sensorial, que ocorreu por meio dos testes afetivos de aceitação por escala hedônica de sete pontos e intenção de compra, escala de intensidade e avaliação do efeito do hidratante labial, foi realizada com os mesmos voluntários do teste de hidratação cutânea, ou seja, com avaliadores não treinados, porém, potenciais consumidores do produto. Ao final do período de 7 dias do tratamento com os hidratantes labiais, cada voluntário recebeu duas amostras de hidratante labial, uma contendo as biomoléculas (formulação teste do estudo) e uma controle (formulação teste do estudo sem levana), em *eppendorf*, previamente codificadas. Além das amostras, estes também receberam uma ficha contendo as instruções dos testes e as escalas para avaliação (modelos em anexo).

4.10.4 Critérios de Inclusão e Exclusão dos Participantes

As participantes do estudo foram selecionadas através dos critérios de inclusão, sendo adultos saudáveis, do sexo feminino, entre 18 e 40 anos, que trabalhavam ou estudavam na Universidade Estadual de Londrina. As voluntárias forneceram por escrito seu consentimento livre e esclarecido, permitindo assim sua participação no estudo. Todas as participantes estavam cientes de que não poderiam realizar o emprego de nenhum outro dermocosmético nos lábios durante o período do estudo, bem como, realizar qualquer procedimento estético ou dermatológico (preenchimento e micro pigmentação) que poderia vir a interferir nos resultados da pesquisa. Além disso, as voluntárias não deveriam apresentar qualquer tipo de hipersensibilidade ou alergia aos componentes das formulações, injúria no local de medição ou saúde debilitada. As participantes selecionadas foram previamente avaliadas pela coordenadora deste estudo, que tem conhecimento nas áreas farmacêutica e cosmetológica. Devido a pandemia iniciada pelo vírus SARS-CoV-2, mais conhecida por Coronavírus ou COVID-19, oriunda no ano de 2020, e levando em consideração a saúde e bem-estar dos voluntários, somente participaram do estudo aqueles participantes que tivessem tomado a vacina para o COVID-19, após comprovação por meio de carteirinha de vacinação ou comprovante expedido pelo aplicativo Conecte SUS.

Foram excluídas da amostragem voluntárias que estivessem grávidas ou com suspeita de gravidez, lactantes, com histórico de hipersensibilidade

previamente conhecida a cosméticos, surfactantes ou algum componente das formulações, que fizessem uso de medicação que pudesse alterar as respostas da pele, que apresentassem algum distúrbio crônico, sistêmico ou de pele, com sinais de irritação cutânea no local de aplicação, que tivessem feito o uso de tratamentos labiais, dermatológicos ou estéticos, nos 40 dias antecedentes ao estudo, que participaram de estudos similares nos 30 dias antecedentes ou que apresentassem sinais de dermatite ou irritação durante o período de avaliação. As voluntárias poderiam desistir do estudo a qualquer momento, sem que isto acarretasse qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. As voluntárias que relatassem não fazer o uso correto dos produtos também seriam excluídas.

4.10.5 Avaliação da Hidratação Cutânea por Método de Bioimpedância

A medida de hidratação da pele foi realizada pelo aparelho Analisador de Pele *Digital Facial SkinUp Analyser®*, o qual é baseado no método da impedância bioelétrica (bioimpedância), que consiste na passagem de uma corrente elétrica de baixa intensidade (500 a 800 μA) e de alta frequência (50 kHz) pela região labial (que se apresenta como condutora). Com a resistência desse condutor à passagem da corrente elétrica, os resultados da análise foram obtidos. Este equipamento possui sistema de identificação simplificada dos resultados da análise através de percentuais para a hidratação da pele e de valores de classificação da pele de acordo com a hidratação (score de Heinrich, Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação da pele de acordo com a hidratação.

Tipo de Pele	Hidratação (u.a.)
Muito seca	< 30
Seca	30 - 40
Normal	> 40

Fonte: Adaptado de Heinrich *et al.*, (2003). u.a.= unidades arbitrárias.

A região do lábio inferior foi selecionada para as medidas, sendo higienizada com água micelar previamente à coleta dos dados. Foram empregadas seis repetições para a análise de hidratação, sendo os resultados apresentados como valores médios dessas medições sequenciais.

4.10.6 Análise Sensorial das Formulações

Testes para levantamento de atributos e perfis (escala de intensidade) das formulações, testes afetivos quantitativos de aceitação e intenção de compra, e teste de efeito do hidratante labial foram realizados, com avaliadores não treinados e potenciais consumidores. Estes receberam as duas amostras de hidratante labial, acondicionadas em *eppendorf*, e previamente codificadas com número de três dígitos em ordem aleatória, bem como, as fichas de avaliação contendo as instruções do método.

No teste de escala de intensidade, os atributos avaliados foram: facilidade de espalhar, absorção, hidratação, frescor, formação de filme aveludado e fragrância. No teste de aceitação, os avaliadores classificaram as amostras utilizando a escala hedônica estruturada de 7 pontos: 7- Gostei muitíssimo, 6- Gostei muito, 5- Gostei, 4- Não gostei, nem desgostei, 3- Desgostei, 2- Desgostei muito e 1- Desgostei muitíssimo. Em paralelo, no teste de intenção de compra, foi requerido que os avaliadores indicassem sua intenção de compra das amostras apresentadas, usando a escala de 5 pontos: 5- Certamente compraria, 4- Provavelmente compraria, 3- Talvez comprasse, talvez não comprasse, 2- Provavelmente não compraria e 1- Certamente não compraria. Para o teste sensorial de efeito da aplicação do hidratante labial contendo levana, o qual foi realizado posteriormente aos demais testes, os avaliadores informaram através de um simples questionamento se a formulação auxiliou a evitar o ressecamento e a aspereza dos lábios.

Os testes sensoriais foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos – Centro de Ciências de Alimentos (CCA), com exceção do teste de efeito. Ao final dos 7 dias do período para a avaliação da hidratação cutânea, os voluntários receberam as duas amostras e as fichas sensoriais contendo as instruções de uso e os questionários. Estes foram instruídos sobre como realizar os

testes pela equipe de pesquisadores, que acompanhou a análise para sanar quaisquer dúvidas.

A realização da análise sensorial se deu da seguinte forma: os voluntários realizaram primeiramente o teste de escala de intensidade, em seguida o teste de aceitação por escala hedônica de sete pontos e, posteriormente, informaram qual a sua intenção de compra do produto. Com o auxílio do aplicador labial, estes aplicaram a primeira amostra codificada diretamente sobre os lábios higienizados (com a água micelar fornecida, enxaguando os lábios e secando estes com disco de algodão), de modo suave e uniforme, e então procederam com a avaliação dos parâmetros descritos no formulário. Posteriormente, para a mesma amostra, estes indicaram sua intenção de compra, e poderiam deixar comentários ou sugestões. Após higienizar os lábios com a água micelar, o mesmo procedimento foi adotado para as demais amostras codificadas.

O teste de efeito do hidratante labial foi realizado após os demais. Os avaliadores receberam uma amostra codificada na forma de bisnaga contendo a formulação teste do estudo (com as biomoléculas), a qual aplicaram diariamente, duas vezes ao dia, por um período de 7 dias, procedendo com os mesmos cuidados indicados para o teste de avaliação da hidratação. Ao final deste período, estes avaliaram o efeito do produto através do seguinte questionamento, escolhendo como resposta uma das alternativas, sim ou não:

“Após os sete dias de aplicação do produto, você percebeu que houve melhora na aspereza e ressecamento dos seus lábios?”

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA - TESTES *IN VIVO*

A distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, para verificação da normalidade. Todos os dados foram estatisticamente comparados utilizando-se Teste t paramétrico. Para avaliação da intensidade dos atributos, escala hedônica e intenção de compra, assumiu-se que os dados eram paramétricos, sendo utilizado Teste t para avaliação de diferença estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste estudo foram apresentados na forma de dois artigos científicos, conforme as orientações previstas nos guias para autores das revistas, *Cosmetics* (ISSN 2079-9284) e *Journal of Applied Microbiology* (ISSN) 1365-2672, sendo divididos em:

- 1) “Desenvolvimento de hidratante labial multifuncional contendo levana de *Bacillus subtilis natto* e soforolipídios de *Starmerella bombicola* por meio de planejamento experimental simplex-centróide”;
- 2) “Avaliação da eficácia *in vivo* e análise sensorial de bálsamo labial multifuncional biotecnológico contendo levana de *Bacillus subtilis natto* e soforolipídio de *Starmerella bombicola* para reparação e hidratação dos lábios”.

ARTIGO 1

DESENVOLVIMENTO DE HIDRATANTE LABIAL MULTIFUNCIONAL CONTENDO LEVANA DE *Bacillus subtilis natto* E SOFOROLIPÍDIOS DE *Starmerella bombicola* POR MEIO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL SIMPLEX-CENTRÓIDE

Débora Dahmer^a, Briani Gisele Bigotto^b, Sara Scandorieiro^a, Thays Amélio Bergamini^a, Jennifer Germiani Cardozo^c, Renata Kobayashi^c, Gerson Nakazato^c, Dionísio Borsato^d, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^b, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^cDepartamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^dDepartamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

***Autor Correspondente:**

Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Av. Robert Koch, 60 Vila Operária, CEP: 86038-350, Londrina, Brasil, e-mail: audrey@uel.br.

RESUMO: A demanda por ingredientes multifuncionais e naturais na indústria cosmética influencia a busca por matérias-primas inovadoras, que possibilitem benefícios adicionais nas formulações. O presente estudo propõe o desenvolvimento de um hidratante labial multifuncional contendo levana (LEV) de *Bacillus subtilis natto*, soforolipídios (SOF) de *Starmerella bombicola* e óleo essencial de *Citrus paradisi* (OCP), empregando planejamento experimental do tipo simplex-centróide. As formulações desenvolvidas foram avaliadas farmacotecnicamente e quanto a parâmetros físico-químicos. Ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH foi empregado para os ativos e formulações. A seleção da formulação otimizada do estudo ocorreu por meio de análise estatística de Superfície de Resposta. As formulações não apresentaram separação de fases ou outras instabilidades após realização do teste de centrifuga, e após estresse térmico no teste de estabilidade preliminar, o qual apresentou duração de 15 dias, estas se mantiveram estáveis quanto às características organolépticas e físico-químicas. Os hidratantes labiais apresentaram coloração branca, aspecto homogêneo, odor característico e sabor levemente doce. O pH se manteve entre 6,0 e 7,0, o qual é adequado para a região labial, a espalhabilidade apresentou resultados entre 415,3 e 1217,1 mm², sendo melhor para os hidratantes contendo SOF, a retenção de umidade foi acima de 95%, representando uma boa capacidade hidratante, e a capacidade antioxidante foi próxima a 50%, o que corresponde a um bom efeito antioxidante. A formulação otimizada apresentou 0,4% de LEV e 0,8% de SOF em sua composição. A incorporação destes ativos naturais em um hidratante labial é inovadora, atendendo a demanda cosmetológica por produtos naturais, orgânicos e veganos, apresentando assim, grande potencial no mercado frente aos consumidores.

PALAVRAS-CHAVE: Cosméticos Naturais. Emulsão Labial. Ativos Biotecnológicos. Óleo essencial de *Grapefruit*. Planejamento Experimental. Eficácia Cosmética.

1. INTRODUÇÃO

Os lábios apresentam diversas funções fisiológicas no organismo humano, como a proteção da cavidade oral contra agentes externos, a regulação da temperatura e higrometria desta e o auxílio na ingestão de bebidas e alimentos. Funções de relacionamento e estética também são atribuídas aos lábios, pois por meio de sua forma e deformação, advém o surgimento de expressões mímicas e orais durante a comunicação (Kim et al., 2018), sendo considerada um componente importante na simetria e estética facial (Kar et al., 2018).

Como extensão da mucosa oral interna para a região externa da face, os lábios, também denominados de área vermelha ou borda vermelha dos lábios (Bielfeldt et al., 2019a), são completamente distintos da pele em seu entorno, por não apresentarem glândulas sudoríparas ou pelos (Tamura et al., 2021). A histologia destes é bem definida, sendo essa região constituída por tênue estrato córneo (EC), formado por células ortoqueratóticas de renovação mais rápida do que aqueles presentes no estrato córneo normal, e o epitélio caracterizado como um tecido fino, levemente queratinizado e com menor conteúdo de ceramidas (Gfeller et al., 2019).

Devido a sua proeminente localização na região facial, os lábios estão constantemente susceptíveis a influências do ambiente externo, como a radiação solar, ventos, temperaturas extremas e uso de cosméticos e tratamentos dentários (Bielfeldt et al., 2019b). Dos diferentes mecanismos de manutenção da pele, o estado de hidratação do EC é o mais comumente alterado no cotidiano e para que uma barreira intacta seja mantida na epiderme, a quantidade adequada de água precisa estar presente nessa superfície (Bielfeldt et al., 2019a). Devido a rápida renovação celular do EC labial, corneócitos imaturos são expostos à superfície cutânea, permitindo que a água presente nos lábios transpire com maior facilidade, o que resulta em uma região seca e áspera (Tamura et al., 2016). Com o intuito de prevenir o ressecamento e aspereza dos lábios, mantendo ou elevando os níveis de hidratação do EC, produtos cosméticos para tratamento labial são uma excelente alternativa (Bielfeldt et al., 2019b).

Avaliando o panorama de consumo de produtos cosméticos no Brasil, no ano de 2023, o país assumiu a quarta colocação no mercado de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos e a sétima colocação no mercado mundial de aquisição de maquiagens (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos - ABIHPEC, 2023). Esta crescente demanda por produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (HPPC) está relacionada a fatores como a influência das mídias sociais, o lançamento de produtos que atendem às necessidades dos consumidores e a busca pela impressão de jovialidade.

A indústria cosmética cada vez mais preza pelo desenvolvimento de formulações com matérias-primas naturais, que apresentem melhor custo-benefício e que conferem proventos adicionais ao produto, como atividades antioxidante e hidratante, além de melhorias no sensorial. Exopolissacarídeos (EPS), como o ácido hialurônico, têm sido vastamente empregados na cosmetologia com finalidade de agregar multifuncionalidade aos produtos, por serem biocompatíveis e apresentarem diversas propriedades bioativas (Da Silva et al., 2019).

Desta forma, a proposta deste estudo é desenvolver um hidratante labial com ativos biotecnológicos como levana (LEV) e soforolipídios (SOF), e óleo essencial de *Citrus paradisi*. A LEV, um EPS de frutose constituído por ligações do tipo $\beta(2\rightarrow6)$, apresenta elevado potencial para aplicação na indústria cosmética como princípio ativo. Esta é descrita na literatura como um polímero que apresenta diversas potencialidades farmacológicas e propriedades bioativas, tais como antiviral, antioxidante, clareadora e hidratante, além de ser utilizada como emulsificante e agente encapsulante (Ragab et al., 2019; Da Silva et al., 2020), a qual é obtida por meio de microrganismos como *Bacillus subtilis*. Os SOFs correspondem a biossurfactantes e apresentam soforoses dissacarídicas (2'-O- β -D-glucopiranosill-1- β -D-glucopiranosose) unidas por ligações glicosídicas a uma cadeia de ácido graxo (Hipólito et al., 2020). Estes são produzidos a partir de cepas fúngicas não patogênicas, por meio de processos fermentativos (Varvaresou; Iakovou, 2015). Por apresentarem baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade, nos últimos anos há um grande interesse em sua pesquisa para aplicação como biossurfactante em diversas áreas. A boa compatibilidade com a pele apresentada pela LEV e pelos SOFs, suas propriedades hidratantes e suas atividades biológicas, como antimicrobiana e antioxidante, permitem que sejam empregados na indústria cosmética (Cho; Ng; Yap, 2022).

O emprego de óleos essenciais (OE) pela indústria cosmética tem se destacado (Sharmeen et al., 2021), tanto pelo aroma quanto pelas diversas propriedades bioativas e farmacológicas que apresentam (Cunha et al., 2022). O óleo essencial de *Citrus paradisi* (toranja ou *grapefruit*) (OCP), o qual é reconhecido como GRAS (Geralmente reconhecido como seguro, pelo FDA - *Food and Drug Administration*), apresenta diversas propriedades bioativas, tais como antimicrobianas, as quais podem ser aplicadas no desenvolvimento de produtos cosméticos (Dosoky; Setzer, 2018). Com base nas informações apresentadas, este trabalho teve como objetivo principal desenvolver um hidratante labial multifuncional como novo cosmético biotecnológico, contendo LEV de *Bacillus subtilis* natto, SOF de *Starmerella bombicola* e OCP como princípios ativos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e óleo essencial de *Citrus paradisi* (OCP)

A bactéria *Bacillus subtilis* natto (CCT 7712), obtida da Coleção de Culturas Tropicais, foi fornecida pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil) e utilizada para a produção de levana. A levedura *Starmerella bombicola* (ATCC® 22214™), obtida da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA), foi fornecida pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil) e empregada para a produção de soforolipídios. Os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™) e *Streptococcus mutans* (UA 159) foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (Universidade Estadual de Londrina, Brasil). O óleo essencial de *Citrus paradisi* (OCP) foi obtido comercialmente (ViaAroma, Porto Alegre, Brasil).

2.2. Obtenção das Biomoléculas

2.2.1 Levana (LEV)

A LEV foi produzida pela enzima levanasacarase, obtida por meio da bactéria *B. subtilis natto* (CCT 7712), conforme metodologia descrita por Helenas et al. (2022). A extração da LEV ocorreu por meio de precipitação com etanol absoluto na proporção de 1:3 v/v (sobrenadante: etanol), sendo o sistema mantido em repouso durante 12 horas a 4 °C. Em seguida, empregou-se centrifugação a 6500 G, durante 20 minutos e a 4 °C foi. Após a evaporação completa do etanol, a LEV foi dialisada contra água destilada, durante 48 horas, com três trocas diárias de água, sendo posteriormente congelada e liofilizada.

2.2.2. Soforolipídios (SOF)

A produção dos sofrólipídios ocorreu a partir da levedura *S. bombicola* (ATCC® 22214™), em biorreator de bancada, empregando como substratos glicose e ácido oleico, conforme metodologia descrita por Silveira et al. (2019). O inóculo da levedura foi padronizado a 0,5 g·L⁻¹. A extração dos sofrólipídios ocorreu com solventes orgânicos, sendo este posteriormente seco em estufa e liofilizado.

2.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Ativos

Os ensaios foram realizados frente às cepas bacterianas *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *S. mutans* (UA 159).

2.3.1. Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) dos SOF e do OCP foi determinada pelo método de diluição em caldo (*Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines*, CLSI, 2021), com as faixas de concentrações de 0,003 mg·mL⁻¹ a 0,184 mg·mL⁻¹ de SOF e 0,66 mg·mL⁻¹ a 41,75 mg·mL⁻¹ para o OCP. O ensaio foi realizado em microtubos, em triplicata e em três ocasiões diferentes.

Colônias isoladas de cultura bacteriana crescidas em meio ágar Muller-Hinton (MHA, Difco) (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e meio ágar Brain Heart Infusion Broth (BHI, Himedia) (*S. mutans*), foram suspensas em solução salina (0,85% cloreto de sódio, m/v, Merck) e ajustadas à escala 0.5 de McFarland, para obtenção de 1,5 x 10⁸ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC·mL⁻¹). Após a diluição de 1:100 da suspensão bacteriana em Caldo Muller-Hinton (MHB, Difco) e Caldo BHI (Himedia), 50 µL foram inoculados nos respectivos tratamentos com os antimicrobianos, nas concentrações descritas anteriormente. Meio de cultura, ativos antimicrobianos e DMSO na ausência de inóculo foram testados como controle de esterilidade. O controle positivo para crescimento bacteriano foi realizado com inóculo em meio de cultura sem antimicrobiano.

Os microtubos foram incubados por 24h, a 37 °C (para *S. mutans* a incubação ocorreu em estufa com circulação de 4,5% de CO₂), e a CIM foi determinada como a menor concentração dos agentes antimicrobianos capaz de inibir o crescimento bacteriano visível.

2.3.2. Efeito Antimicrobiano de SOF e OCP em Combinação

Os valores de CIM para cada ativo em combinação foi determinado pelo ensaio de microdiluição em caldo de duplo gradiente de concentração, com base na turbidez, de forma similar ao descrito no item 2.3.1. O tipo de interação antibacteriana entre os ativos foi determinado pelo índice de concentração inibitória fracionada (FICI), conforme descrito por García-García et al. (2011), com algumas modificações. Combinações de SOF (0,003 - 0,092 mg·mL⁻¹) e OCP (5,22 - 41,75 mg·mL⁻¹) foram testadas.

O inóculo bacteriano foi preparado conforme descrito no item 2.3.1, utilizando escala de McFarland e posterior diluição de 1:100 nos meios de cultura adequados para cada espécie bacteriana, bem como, os controles de esterilidade e viabilidade bacteriana. Os microtubos foram incubados por 24h, a 37 °C (para *S. mutans* a incubação ocorreu em estufa com circulação de 4,5% de CO₂). A interação dos compostos foi analisada pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), obtido na equação 1 pela soma da Concentração Inibitória Fracionária (CIF) dos soforolipídios (Equação 2) e do OCP (Equação 3). ICIF é interpretado como sinérgico ($\leq 0,5$), aditivo ($> 0,5$ e ≤ 1), indiferente (> 1 e < 4) ou antagonista (≥ 4) (Odds, 2003), conforme o cálculo $ICIF = CIF_{SOF} + CIF_{OCP}$, em que $CIF = CIM_{combinação} / CIM_{individual}$.

2.4. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Ativos

A análise da capacidade antioxidante dos ativos foi realizada conforme metodologia descrita por Srikanth et al. (2015), com adaptações. Inicialmente, o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi solubilizado em etanol para obter concentração de 250 μM e este foi mantido ao abrigo da luz. Amostras testes foram preparadas em diferentes concentrações, na forma de curva: a LEV foi dissolvida em água nas concentrações de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; o SOF foi dissolvido em etanol nas concentrações de 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; e o OCP foi diluído em etanol nas concentrações de 1 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 50 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a mistura reacional, 1 mL das soluções teste mais 0,3 mL da solução DPPH foram adicionadas em tubos de ensaio envoltos em papel craft, procedimento realizado em triplicata, e estes foram mantidos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Para o branco, 1 mL das soluções teste e 0,3 mL de etanol foram utilizados. O controle foi composto por 1 mL de etanol e 0,3 mL de solução DPPH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 517 nm. A taxa de inibição (%) do radical livre foi calculada conforme a equação $\% \text{ inibição} = ((\text{abs. do controle} - \text{abs. da amostra}) / \text{abs. do controle}) \times 100$.

2.5. Desenvolvimento das Formulações Cosméticas

O planejamento experimental simplex-centróide foi utilizado para otimização das concentrações dos ativos. Sete formulações foram desenvolvidas variando os componentes x1 (LEV), x2 (SOF) e x3 (OCP), a partir de formulação controle do tipo emulsão O/A. A concentração máxima empregada dos ativos foi 2% (LEV), 1% (SOF) e 0,3% (OCP). As formulações foram preparadas por meio de agitação mecânica, sendo compostas por: água destilada, EDTA dissódico, sacarina sódica, glicerina, copolímero de acrilato de sódio e lecitina, óleo de rícino, triglicérides de ácido cáprico e caprílico, manteiga de karité, butilhidroxi tolueno, mentol, polissorbato 80, fenoxietanol e metilisotiazolinona, solução de hidróxido de sódio a 20%, conforme patente depositada no INPI sob nº BR 10 2023 008390 0. Ao final do processo, as formulações foram acondicionadas em frascos plásticos de polietileno (PP) com capacidade de 100 mL, sendo mantidas sob refrigeração, por um período de 24 horas, para a realização de testes posteriores de centrifugação (pré estabilidade).

2.6. Caracterização Farmacotécnica das Formulações

2.6.1. Teste de Pré-Estabilidade

Cinco gramas de cada formulação, em triplicata, foram acondicionados em tubos Falcon de 15 mL, e submetidos à centrifugação (Centrifuga Baby, Fanem®) durante

30 minutos, à 2800 rpm (Brasil, 2004).

2.6.2. Ensaios Organolépticos

Conforme o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (Brasil, 2008), foram realizados ensaios de aspecto, cor, sabor e odor para as formulações O/A desenvolvidas.

2.6.3. Espalhabilidade

A avaliação da espalhabilidade dos hidratantes labiais ocorreu por meio do método de placas paralelas e o ensaio foi realizado em triplicata. 1 g das formulações foi transferido sobre o ponto central de uma placa de vidro (20 cm x 20 cm), contida sobre uma escala de papel milimetrado. Sobre as formulações, foi adicionada uma placa de vidro de massa conhecida para determinar a superfície que estas englobaram após um minuto de pressão, por meio da leitura dos diâmetros abrangidos. Posteriormente, objetos de massa conhecida (2 g, 5 g e 10 g) foram adicionados sobre a placa de vidro, e após 1 minuto da adição de cada objeto, fez-se a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra. Cálculo posterior do diâmetro médio (Knorst, 1991) foi realizado e a espalhabilidade de cada amostra calculada por meio da equação $Ei = (d^2 \cdot \pi) / 4$.

2.6.4. Retenção de Umidade

A retenção de umidade (RU) pelas formulações dos hidratantes labiais foi avaliada por método gravimétrico, de acordo com metodologia proposta por Zhang et al. (2012). Brevemente, em cadinho previamente tarado, foram adicionados 1 g de formulação mais 1 mL de água destilada, sendo o sistema homogeneizado. Em seguida, estes foram acondicionados em dessecador de umidade selado com solução saturada de K_2CO_3 (43% de umidade relativa), por um período de 96 horas, a temperatura ambiente. A porcentagem de RU foi calculada conforme equação $RU(\%) = (PT/PO) \times 100$, em que PT corresponde a peso final e PO a peso inicial, pela porcentagem de água residual nas amostras.

2.6.5. Avaliação da Atividade Antioxidante das Formulações

Para a análise da capacidade antioxidante das formulações de hidratante labial, a mesma metodologia do item 2.5 foi adotada. As amostras testes foram preparadas na concentração de $400 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, com adição de etanol e posterior homogeneização em vórtex durante 2 minutos, para dissolução completa da formulação no solvente. Em seguida, o sistema foi filtrado em papel filtro. Vale ressaltar que para a realização desta análise, todas as formulações foram produzidas sem a adição de BHT em sua composição, pois este é um excelente antioxidante e poderia interferir nos resultados obtidos.

2.6.6. Estabilidade Preliminar das Formulações

O ensaio de estabilidade preliminar foi realizado conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (Brasil, 2004), com período de duração de 15 dias (ciclos de 24h, alternando a temperatura), sendo as condições de armazenamento empregadas: estufa ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e geladeira ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Os parâmetros organolépticos e físico-químicos foram paralelamente avaliados, sendo realizados no tempo zero (24h após a manipulação das formulações) e após 15 dias de estresse térmico. O ensaio foi realizado em triplicata e uma amostra de referência foi mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, para fins comparativos.

2.7. Análise Estatística e de Superfície de Resposta

A distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, para verificação da normalidade. Caso distribuição normal, todos os dados foram estatisticamente comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA), e para comparação de diferenças individuais entre as médias, teste de Tukey. Caso a distribuição não fosse normal, teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn foram empregados. Em todos os casos, um nível de significância de $p < 0,05$ foi aceito para denotar significância. Análise de superfície de resposta (Software Statistica versão 7.0.0) também foi realizada para definição da formulação otimizada.

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção das Biomoléculas

A produção de levana a partir da enzima levanasacarase foi de $42,93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto a produção de sofrorolipídios foi de $87,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, devido a estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa e padronização dos processos fermentativos.

3.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Ativos

Os testes antimicrobianos foram realizados com os ativos SOF e OCP, os quais apresentam relatos na literatura de suas propriedades antimicrobianas. Os microrganismos utilizados na realização das análises são relacionados a infecções causadas na região labial (Jung et al., 2019; Kim, 2019; Amin et al., 2021; Alkhars et al., 2022), além de fazerem parte da microbiota desta região e da cavidade oral. Os testes de CIM demonstraram que SOF e OCP são capazes de inibir o crescimento dos microrganismos testados, com CIM entre $0,012 - 0,048 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e entre $10,44 - 41,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A associação dos ativos, em todos os casos, permitiu redução na CIM quando comparado aos tratamentos individuais, resultando em uma interação de aditismo (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito dos sofrorolipídios (SOF) e óleo essencial de *Citrus paradisi* (OCP) frente aos microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. mutans*.

	SOF ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)			OCP ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)			ICIF	Interação
	CIM	CIMc	CIF	CIM	CIMc	CIF		
<i>S. aureus</i>	0,012	0,006	0,5	10,44	5,22	0,5	1,0	Aditismo
<i>S. epidermidis</i>	0,048	0,024	0,5	41,75	20,88	0,5	1,0	Aditismo
<i>S. mutans</i>	0,012	0,006	0,5	20,88	10,44	0,5	1,0	Aditismo

Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos ativos isolados, em combinação (CIMc) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) obtido pela Concentração Inibitória Fracionada (CIF) dos SOF e OCP. ICIF, o qual depende da CIF, é interpretado da seguinte forma: sinérgico ($\leq 0,5$), aditivo ($> 0,5$ e ≤ 1), indiferente (> 1 e < 4) ou antagonista (≥ 4). CIF é determinado pela equação: $\text{CIF} = \text{CIM}_{\text{combinação}} / \text{CIM}_{\text{individual}}$. ICIF é determinado pela equação: $\text{ICIF} = \text{CIF}_{\text{SOF}} + \text{CIF}_{\text{OCP}}$.

3.3. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Ativos

O teste de atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH demonstrou que

o OCP apresenta baixo potencial antioxidante, abaixo de 12,75%, nas concentrações de 1,0 - 50 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os SOFs apresentaram potencial antioxidante entre 33,87% e 61,53% nas concentrações de 5,0 - 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, assim como a LEV, a qual apresentou potencial antioxidante entre 22,0% e 56,10% nas concentrações de 1,0 - 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

3.4. Desenvolvimento das Formulações Cosméticas

A escolha da concentração dos ativos (variáveis) empregada no planejamento experimental foi baseada na resposta das análises antioxidante e antimicrobiana, e em informações da literatura. A concentração de OCP foi definida como 0,3% (2,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a concentração de SOF foi definida como 1,0% e a concentração de LEV empregada foi de 2,0%.

Tabela 2 - Concentração dos ativos empregadas nas formulações conforme planejamento experimental.

	LEV (2,0%)	SOF (1,0%)	OCP (0,3%)	Composição % (100 g)
F1	1	0	0	2,0% LEV
F2	0	1	0	1,0% SOF
F3	0	0	1	0,3% OCP
F4	½	½	0	1,0% LEV + 0,5% SOF
F5	0	½	½	0,5% SOF + 0,15% OCP
F6	½	0	½	1,0% LEV + 0,15% OCP
F7	1/3	1/3	1/3	0,66% LEV + 0,1% OCP + 0,33% SOF
FB	0	0	0	Sem ativos

Levana: LEV; Soforolipídios: SOF; Óleo Essencial de *Citrus paradisi* (OCP). Planejamento experimental simplex-centróide.

3.5. Caracterização Farmacotécnica das Formulações

Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 3. No teste de centrifugação, a base e as demais formulações não apresentaram qualquer sinal de instabilidade, como separação de fase, sedimentação ou cremeação. Quanto aos parâmetros organolépticos, todas as formulações, incluindo a base, apresentaram coloração branca, sabor levemente doce (normal) e odor característico (normal), com exceção das formulações contendo OCP em sua composição, as quais apresentaram odor característico do óleo essencial. Quanto ao aspecto, todas as formulações apresentaram-se homogêneas e viscosas. As formulações contendo SOF aparentavam estar levemente menos viscosas devido à incorporação dessa molécula, porém, apresentaram melhor espalhabilidade quando comparado a base.

Todas as formulações apresentaram pH entre 6,0 e 7,0, o qual é adequado para produtos labiais. No quesito espalhabilidade, as formulações apresentaram resultados entre 415,3 e 469,2 mm^2 , com exceção daquelas contendo SOF, as quais apresentaram resultados entre 909,6 e 1217,1 mm^2 . Quanto à retenção de umidade, todas as formulações apresentaram valores de retenção entre 95,30% e 97,92%.

Tabela 3 - Caracterização farmacotécnica das formulações no tempo zero.

Formulação	Centrífuga	Aspecto	Cor	Odor	Sabor	Espalhabilidade (mm ²)	Retenção de Umidade (%RU)
FB	SSF	V	Branco	Normal	Normal	423,0 ± 42,6	97,92 ± 0,38
2,0% LEV	SSF	V	Branco	Normal	Normal	415,3 ± 21,5	97,70 ± 0,54
1,0% SOF	SSF	MV	Branco	Normal	Normal	909,6 ± 41,1*	96,29 ± 1,00
0,3% OCP	SSF	V	Branco	Carac. OCP	Normal	422,5 ± 20,8	97,32 ± 1,61
1,0% LEV + 0,5% SOF	SSF	MV	Branco	Normal	Normal	1170,0 ± 14,1*	95,30 ± 0,56*
0,5% SOF + 0,15% OCP	SSF	MV	Branco	Carac. OCP	Normal	1217,1 ± 14,3*	97,71 ± 0,87
1,0% LEV + 0,15% OCP	SSF	V	Branco	Carac. OCP	Normal	469,2 ± 5,1	97,42 ± 0,30
0,66% LEV + 0,1% OCP + 0,33% SOF	SSF	MV	Branco	Carac. OCP	Normal	1061,2 ± 7,4*	97,56 ± 0,16

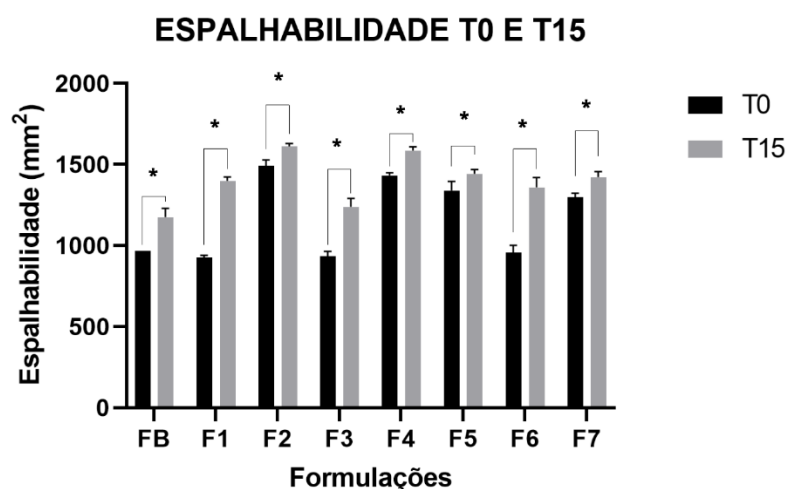
SSF: sem separação de fases; V: viscoso; MV: menos viscoso; Carac. OCP: odor característico do OCP; mm²: milímetros quadrados; %RU: percentual de retenção de umidade; *: diferença estatística significativa em relação a FB ($p < 0,05$), ANOVA, teste de comparações múltiplas de Dunnett.

3.6. Estabilidade Preliminar das Formulações

Após a realização das caracterizações farmacotécnicas, todas as formulações foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar, durante um período de 15 dias. Os parâmetros cor e odor permaneceram inalterados ao longo do estudo, enquanto em relação ao aspecto e sabor, algumas formulações apresentaram leves alterações, como a diminuição da viscosidade e a redução do sabor doce, porém, estas não foram relevantes a ponto de permitir a eliminação das formulações do estudo. O pH das formulações foi verificado nos tempos zero e 15 dias e não apresentou qualquer modificação, mantendo-se entre 6,0 e 7,0.

No quesito espalhabilidade, todas as formulações do tempo 15 dias apresentaram variação em sua capacidade de espalhamento quando comparadas às suas respectivas formulações no tempo zero, denotando significância estatística ($p < 0,05$) (Figura 1). Este parâmetro indicou que as formulações submetidas ao estudo apresentaram melhora em sua espalhabilidade ao longo do tempo.

Figura 1 - Espalhabilidade apresentada pelas formulações no estudo de estabilidade preliminar.



Espalhabilidade das formulações: T0: tempo zero; T15: tempo 15 dias. mm²: milímetros quadrados. *: diferença estatística significativa.

Formulações: FB: base; F1: 2% de LEV; F2: 1% de SOF; F3: 0,3% de OCP; F4: 1,0% LEV + 0,5% SOF; F5: 0,5% SOF + 0,15% OCP; F6: 1,0% LEV + 0,15% OCP; F7: 0,66% LEV + 0,1% OCP + 0,33% SOF.

Quanto a retenção de umidade (Figura 2), tanto as formulações do tempo zero quanto as do tempo 15 dias não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para este parâmetro, ou seja, estas mantiveram seu nível de hidratação ao longo do período do estudo.

Figura 2 - Retenção de umidade apresentada pelas formulações no estudo de estabilidade preliminar.



Retenção de umidade das formulações: T0: tempo zero; T15: tempo 15 dias. %RU: porcentagem de retenção de umidade.

Formulações: FB: base; F1: 2% de LEV; F2: 1% de SOF; F3: 0,3% de OCP; F4: 1,0% LEV + 0,5% SOF; F5: 0,5% SOF + 0,15% OCP; F6: 1,0% LEV + 0,15% OCP; F7: 0,66% LEV + 0,1% OCP + 0,33% SOF.

A partir do estudo de estabilidade preliminar realizado, foi possível verificar que as formulações se mantiveram estáveis ao serem submetidas a condições de estresse. Desta forma, não houve exclusão de nenhuma delas na parte sequencial do trabalho.

3.7. Avaliação da Atividade Antioxidante das Formulações

As formulações do estudo também foram submetidas ao teste de capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, para verificação da atividade antioxidante apresentada por estas (Tabela 4). As formulações apresentaram bom resultado para este parâmetro, com taxas de inibição do radical livre entre 45,71% – 53,28%. As formulações contendo 0,3% OCP e 1,0% LEV + 0,15% OCP foram as únicas que apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à FB, com diminuição da sua capacidade antioxidante.

Tabela 4 - Atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH apresentado pelas formulações no tempo zero.

Formulação	% de Inibição
FB	51,32 ± 1,03
2,0% LEV	49,14 ± 2,38
1,0% SOF	53,28 ± 0,38
0,3% OCP	45,71 ± 0,38*
1,0% LEV + 0,5% SOF	52,70 ± 2,57
0,5% SOF + 0,15% OCP	47,60 ± 0,40
1,0% LEV + 0,15% OCP	46,05 ± 1,97*
0,66% LEV + 0,1% OCP + 0,33% SOF	51,48 ± 1,99

*: diferença estatística significativa em relação a FB ($p < 0,05$), ANOVA one-way, teste de comparações múltiplas de Dunnett.

3.8. Análise de Superfície de Resposta

O método empregado para a avaliação da formulação otimizada foi a análise estatística de Superfície de Resposta (*Software Statistica*, versão 7.0.0), onde as variáveis analisadas foram a concentração dos ativos SOF, LEV e OCP, sobre as respostas espalhabilidade, atividade antioxidante e retenção de umidade.

Tabela 5 - Planejamento simplex-centróide para a espalhabilidade, atividade antioxidante e retenção de umidade das formulações.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Resposta		
	x1	x2	x3	Espalhabilidade (mm ²)	Atividade Antioxidante (%)	Retenção de Umidade (%)
1	1,000	0,000	0,000	415,30	49,14	97,70
2	0,000	1,000	0,000	909,60	53,28	96,29
3	0,000	0,000	1,000	422,50	45,71	97,32
4	0,500	0,500	0,000	1170,00	52,70	95,30
5	0,000	0,500	0,500	1217,00	47,60	97,71
6	0,500	0,000	0,500	469,20	46,05	97,42
7	0,333	0,333	0,333	1061,20	52,57	96,20
8	0,333	0,333	0,333	1084,90	52,70	96,34
9	0,333	0,333	0,333	1056,50	49,18	97,56
10	0,333	0,333	0,333	1075,80	51,48	96,78

x1: LEV, x2: SOF e x3: OCP. Em mm²: milímetros quadrados.

3.8.1 Espalhabilidade

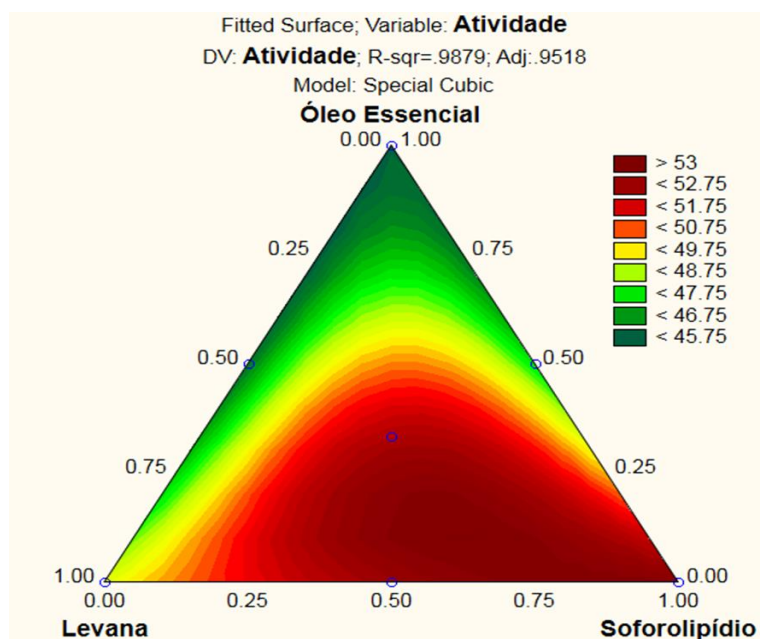
A superfície de resposta e o perfil de predição de valor e desejabilidade (*profile of predict value and desirability*) para a espalhabilidade são apresentados na Figura 3. De acordo com as análises estatísticas, a formulação composta por 0.0 de levana, 0.5 de soforolipídio (0,5%) e 0.5 de OCP (0,15%) seria a ideal para obter a melhor espalhabilidade do produto. As estimativas do modelo são apresentadas na Tabela 6. A presença de LEV, SOF e OCP foram significantes ($p < 0,05$) para a espalhabilidade, apresentando efeito positivo. As combinações SOF e LEV e SOF e OCP apresentaram melhor efeito positivo na espalhabilidade das formulações (2030,20 e 2204,20 mm², respectivamente). A ANOVA do modelo obtido para descrever a espalhabilidade mostrou coeficiente de determinação (R^2) de 0,9997 e foi significativa ao nível de 5%.

$R^2:0,9997$, $R^2_{ajusted}:0,9987$; Lack-of-fit: $p=0,919236$; *: $p < 0,05$.

3.8.2 Atividade Antioxidante

A superfície de resposta e o perfil de predição de valor e desejabilidade (*profile of predict value and desirability*) para a atividade antioxidante são apresentados na Figura 4. De acordo com as análises estatísticas, a formulação composta por 0.25 (0,5%) de levana, 0.75 de soforolipídio (0,75%) e 0.0 de OCP seria a ideal para obter a melhor atividade antioxidante do produto. As estimativas do modelo são apresentadas na Tabela 7. LEV, SOF e OCP foram significantes ($p < 0,05$) para a atividade antioxidante, apresentando efeito positivo. A combinação SOF, LEV e OCP apresentou melhor efeito na atividade antioxidante das formulações (98,94%). Efeitos negativos foram presenciados quando da combinação do OCP com SOF ou LEV (-7,58% e -5,50%, respectivamente). A ANOVA do modelo obtido para descrever a atividade antioxidante exibiu coeficiente de determinação (R^2) de 0,9879 e foi significativa ao nível de 5%.

Figura 4 - Superfície de resposta e perfil de predição de valor e desejabilidade para a atividade antioxidante das formulações.



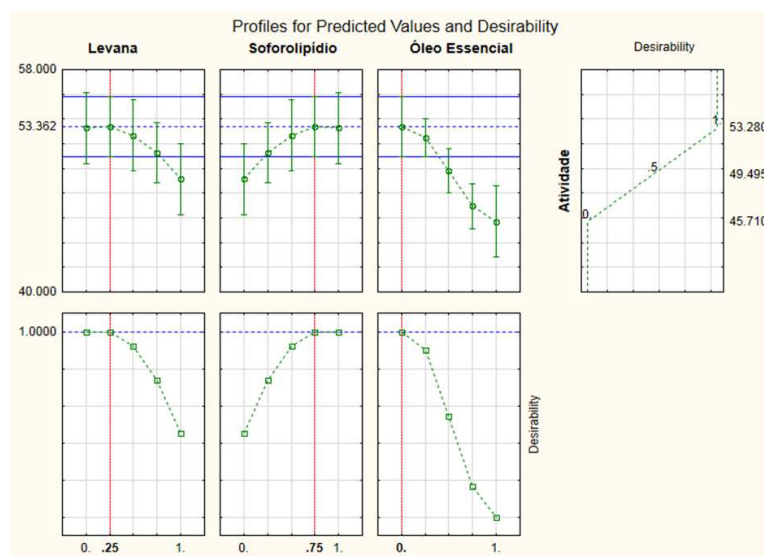


Tabela 7 - Estimativas do modelo para o parâmetro atividade antioxidante das formulações.

Fatores	Estimativa	Erro padrão	T-valor	p-valor
LEV (x1)	49.14	0.67	73.34	0.000186*
SOF (x2)	53.28	0.67	79.52	0.000158*
OCP (x3)	45.71	0.67	68.22	0.000215*
x1x2	5.96	3.28	1.82	0.211055
x1x3	-5.50	3.28	-1.67	0.235796
x2x3	-7.58	3.28	-2.31	0.147203
x1x2x3	98.94	17.75	5.57	0.030716*

R^2 : 0,9879, $R^2_{ajustado}$:0,9518; Lack-of-fit: p : 0,2358; *: $p < 0,05$.

3.8.3 Retenção de Umidade

A superfície de resposta e o perfil de predição de valor e desejabilidade (*profile of predict value and desirability*) para a retenção de umidade são apresentados na Figura 5. De acordo com as análises estatísticas, a formulação composta por 0.0 de levana, 0.5 de sofrorolípido (0,5%) e 0.5 de OCP (0,15%) seria a ideal para obter a melhor retenção de umidade do produto. As estimativas do modelo são apresentadas na Tabela 8. LEV, SOF e OCP foram significantes ($p < 0,05$) para a retenção de umidade, apresentando efeito positivo. Efeitos negativos foram presenciados quando da combinação de LEV com SOF ou com o OCP (-6,78% e -0,36%, respectivamente), bem como, quando da combinação dos três ativos (-7,35%). Efeito positivo foi encontrado para a mistura do SOF com o OCP (3,62%), porém, este não foi significativo. A ANOVA do modelo obtido para descrever a retenção de umidade exibiu coeficiente de determinação (R^2) de 0,9659 e foi significativa ao nível de 5%.

Figura 5 - Superfície de resposta e perfil de predição de valor e desejabilidade para a retenção de umidade das formulações.

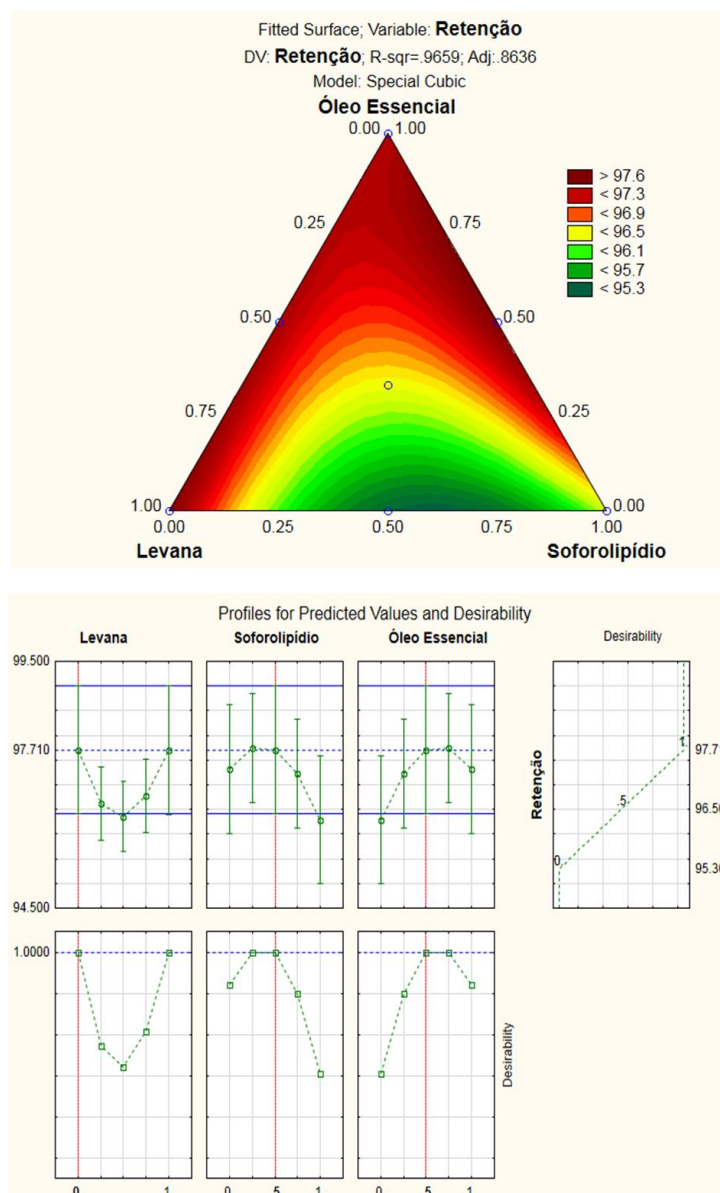


Tabela 8 - Estimativas do modelo para o parâmetro retenção de umidade das formulações.

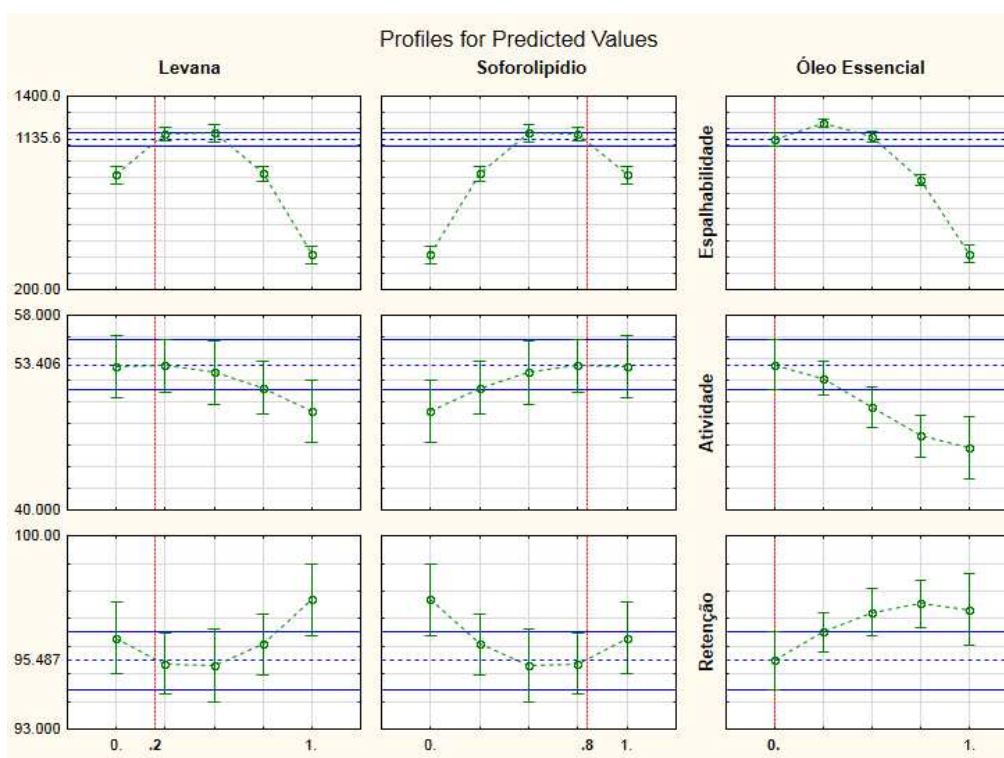
Fatores	Estimativa	Erro padrão	T-valor	p-valor
LEV (x1)	97.70	0.30	322.81	0.000010*
SOF (x2)	96.29	0.30	318.15	0.000010*
OCP (x3)	97.32	0.30	321.55	0.000010*
x1x2	-6.78	1.48	-4.57	0.044646*
x1x3	-0.36	1.48	-0.24	0.830790
x2x3	3.62	1.48	2.44	0.134684
x1x2x3	-7.35	8.02	-0.92	0.456121

R²: 0,9659, R²_{ajusted}: 0,8636; Lack-of-fit: p: 0.830790; * p < 0,05.

3.8.4 Seleção da Formulação do Estudo

Baseado nos resultados obtidos para a análise de superfície de resposta, foi possível prever a formulação otimizada do estudo (Figura 6), a qual é composta por LEV (0,4%) e SOF (0,8%), sem OCP, de modo a obter as melhores respostas para os parâmetros espalhabilidade (1135,6 mm²), atividade antioxidante (53,41%) e retenção de umidade (95,49%). A concentração dos ativos na formulação otimizada foi baseada na concentração inicial empregada no planejamento simplex-centróide (2,0% de LEV e 1,0% de SOF), sendo que 0.2 LEV corresponde a 0,4% e 0.8 SOF corresponde a 0,8%.

Figura 6 - Otimização conjunta dos ativos.



4. DISCUSSÃO

A busca e o desenvolvimento de insumos naturais, sustentáveis e biodegradáveis têm despontado entre os mercados cosmético e farmacêutico, em alternativa aos compostos sintéticos disponíveis. Moléculas obtidas por biotecnologia, como LEV de *B. subtilis* natto e SOF de *S. bombicola*, através de processos fermentativos, são exemplos de ativos que atendem a esta tendência (Dahmer et al., 2022). Neste trabalho, a produção de LEV a partir da enzima levanasacarase foi de 42,93 g·L⁻¹. Esta foi superior aos descritos por Pei et al. (2020), em que levana proveniente de *B. megaterium* apresentou produção de 4,82 g·L⁻¹, por Bouallegue et al. (2020), em que levana proveniente de *B. subtilis* A17 apresentou produção de 2,85 g·L⁻¹, e por Gojgic-Cvijovic et al. (2019), em que a produção de levana por *B. licheniformis* NS032 apresentou produção entre 6,53 – 52,85 g·L⁻¹, variando de acordo com os parâmetros fermentativos empregados. A produção da LEV neste trabalho foi elevada devido a estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, relacionado aos parâmetros fermentativos (Dos Santos et al., 2013; Bersaneti et al., 2018), e pelo uso da enzima levanasacarase para sua produção.

A produção de SOF foi de 87,10 g·L⁻¹. Este foi superior aos descritos por Silveira et al. (2019), em que soforolipídio proveniente de *S. bombicola* apresentou produção de 69,83 g·L⁻¹, e por Hipólito et al. (2020) com produção de 67,0 g·L⁻¹, e foi inferior ao descrito por Caretta et al. (2022), em que soforolipídio apresentou produção de 111,25 g·L⁻¹. Como pode ser verificado, a produção do SOF neste trabalho foi semelhante aos demais encontrados na literatura. A utilização do ácido oleico e da glicose como substratos permite a otimização da produção deste biossurfactante, levando a melhores resultados, como já foi previamente estudado pelo grupo de pesquisa. Além disso, favorecem a produção de soforolipídio lactônico, o qual tem sido reconhecido na literatura como potente agente antimicrobiano (Caretta et al., 2022).

Os testes antimicrobianos foram realizados com os ativos SOF e OCP. Conforme Tabela 1, o SOF apresentou CIM de 0,012 - 0,048 mg·mL⁻¹ para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. mutans*, enquanto o OCP apresentou CIM de 10,44 - 41,75 mg·mL⁻¹ para os mesmos microrganismos. Da Fontoura et al. (2020) demonstraram que soforolipídio proveniente de *S. bombicola* apresentou CIM de 500 µg·mL⁻¹ para *S. aureus* ATCC 6336 e *S. mutans* ATCC 25175, enquanto Filipe et al. (2022) verificaram que soforolipídio proveniente de *S. bombicola* apresentou CIM de 31,25 µg·mL⁻¹ para *S. aureus* e de 125,0 µg·mL⁻¹ para *S. epidermidis*. A atividade antimicrobiana do SOF frente a diversos microrganismos já foi demonstrada na literatura (Ashby et al., 2018; Silveira et al., 2019; Caretta et al., 2022; Cho et al., 2022) e esta ocorre, principalmente, pela desestabilização ou alteração da membrana celular dos patógenos, o que acarreta mudanças em sua permeabilidade, induzindo possíveis extrusões citoplasmáticas e, conseqüentemente, a morte. Este mecanismo de ação dos SOFs é relacionado ao seu efeito surfactante, ocasionado devido à natureza anfifílica de sua molécula, a qual permite que ocorram interações entre o açúcar (soforose) e as porções lipídicas, resultando em danos à membrana celular. Os SOFs apresentam ação contra bactérias Gram-negativas e positivas, mas seu efeito é mais presenciado em Gram-positivas, o que indica que a ação antimicrobiana desta biomolécula se relaciona a composição específica da membrana celular de certas cepas microbianas (Silveira et al., 2019; Da Fontoura et al., 2020; Caretta et al., 2022; Filipe et al., 2022).

O OCP não demonstrou ter boa atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. mutans*, sendo sua CIM muito superior quando comparada ao do

soforolipídio. Denkova-Kostova et al. (2021) demonstraram que o OCP apresentou CIM contra *S. aureus* de 6 ppm, enquanto para Deng et al. (2020) este foi de 6.25 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Filoche, Soma e Sissons (2005) demonstraram o efeito do OCP contra *S. mutans*, em que o CIM foi maior que 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Este baixo potencial antimicrobiano verificado em nosso estudo pode ter ocorrido devido ao OCP ter sido adquirido de forma comercial (ViaAroma). A atividade antimicrobiana do OCP frente a diversos microrganismos já foi comprovada na literatura (Viuda-Martos et al., 2007; Uysal et al., 2011; Okunowo et al., 2013; Vasek et al., 2015). Esta propriedade apresentada está relacionada à composição química (metabólitos secundários) e a hidrofobicidade do óleo essencial. O limoneno é o componente mais abundante no OCP, bem como, na maior parte dos óleos essenciais da família *Citrus*, e este é relacionado às atividades antimicrobiana e antifúngica apresentadas pelos óleos. A presença de flavonoides e compostos fenólicos pode auxiliar no efeito inibitório apresentado pelo limoneno. Quanto a hidrofobicidade, esta permite que o óleo essencial seja dissolvido na porção lipídica da membrana celular das bactérias, provocando mudanças estruturais que tornam estas mais permeáveis, permitindo assim, a liberação de componentes celulares que causam a morte celular (Viuda-Martos et al., 2007; Uysal et al., 2011; Okunowo et al., 2013; Denkova-Kostova et al., 2021).

Radicais livres apresentam em sua estrutura elétrons desemparelhados que podem ser estabilizados pela ação de um antioxidante. O OCP é descrito na literatura pela sua atividade antioxidante, a qual varia de acordo com o método de extração empregado para a obtenção do óleo. Denkova-Kostova et al. (2021) relataram que o OCP obtido por destilação apresentou potencial antioxidante de 87,5% frente ao radical DPPH, na concentração de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ou et al. (2015) apresentaram em seu estudo que o OCP obtido por destilação apresentou melhor potencial antioxidante (51,24%, na concentração de 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) do que aquele obtido por prensagem a frio (7,75%, na mesma concentração). Lin et al. (2009) relataram em seu estudo que o OCP obtido por compressão à frio, na concentração de 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, apresentou atividade antioxidante de 6,3% frente ao radical DPPH. Yang et al. (2010) relataram em seu estudo que o OCP obtido por expressão apresentou baixo potencial antioxidante (18,3%), na concentração de 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, frente ao radical DPPH. A atividade antioxidante apresentada pelo OCP é proveniente de sua composição química. Óleos essenciais ricos em monoterpenos (limoneno e α -pineno), como é o caso do OCP, apresentam significativa atividade antioxidante, devido ao fato desses metabólitos secundários serem monoterpenos oxigenados, os quais apresentam grupos metilenos fortemente ativos em sua molécula (Ou et al., 2015; Denkova-Kostova et al., 2021). Em nosso estudo, o OCP não apresentou expressiva atividade antioxidante, sendo esta, concentração-dependente. O fato de o OCP ter sido obtido comercialmente (ViaAroma) pode influenciar na resposta antioxidante apresentada por este.

A atividade antioxidante do SOF é pouco descrita na literatura. Filipe et al. (2022) relataram em seu estudo que SOF obtido de *S. bombycolina*, apresentou baixo potencial antioxidante (28,31%), nas concentrações de 2,0 - 6,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Kumari et al. (2021) demonstraram em seu estudo a atividade antioxidante apresentada por soforolipídio proveniente de *Metschnikowia churdharensis*, a qual foi de 62,98% (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Costa et al. (2022) demonstraram em seu estudo que o soforolipídio obtido de *Starmerella bombycolina* apresentou capacidade inibitória de 59,40%, frente ao radical DPPH, na concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta propriedade é atribuída aos soforolipídios devido a capacidade que estes apresentam de doar hidrogênios, estabilizando assim, radicais livres como o DPPH (Kumari et al., 2021). Esta ação

antioxidante pode auxiliar no retardo do envelhecimento cutâneo, o qual é fortemente relacionado à radicais livres (Filipe et al., 2022). O sofrorolipídio obtido em nosso estudo apresentou um potencial antioxidante mediano, o qual era concentração-dependente.

Diversos autores já descreveram na literatura a atividade antioxidante apresentada pela levana. Pei et al. (2020) relataram em seu estudo que a levana proveniente de *Bacillus megaterium* PFY-147 apresentou atividade antioxidante de 35,34% e 94,78%, frente ao radical DPPH, nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg·mL⁻¹, respectivamente. Srikanth et al. (2015) descreveram em seu estudo que a levana proveniente de *Acetobacter xylinum* NCIM2526 apresentou atividade antioxidante de 81,26%, na concentração de 1,0 mg·mL⁻¹, frente ao radical DPPH. Domżał-Kędzia et al. (2019) relataram em seu estudo que levana proveniente de *B. subtilis* natto KB1 apresentou atividade antioxidante de 31,70%, frente ao radical DPPH, na concentração de 0,1 mg·mL⁻¹. A atividade antioxidante apresentada por exopolissacarídeos depende de fatores estruturais, como seu peso molecular, o conteúdo de monossacarídeos e a configuração das ligações glicosídicas (Pei et al., 2020). A hipótese que atribui atividade antioxidante à levana se relaciona à presença de muitos grupos hidroxilas em sua estrutura, os quais podem reagir com os radicais livres e gerar reações em cadeia (Kim; Chung, 2016; Hertadi; Amari; Ratnaningsih, 2020). A atividade antioxidante apresentada pela levana, assim como do SOF, foi mediana e concentração-dependente.

A escolha da concentração dos ativos (variáveis) empregada no planejamento experimental foi baseada na resposta das análises antioxidante e antimicrobiana, e em informações da literatura. A concentração de OCP foi definida como 0,3% (2,5 mg·mL⁻¹), pois este não apresentou atividade antioxidante relevante nas concentrações testadas e, como os valores de CIM encontrados foram muito elevados (acima de 5,22 mg·mL⁻¹ quando combinado ao sofrorolipídio e acima de 10,44 mg·mL⁻¹ quando isolado) e, conseqüentemente, a concentração de uso do óleo, para um produto destinado a ser aplicado nos lábios, o que pode gerar gosto e odor desagradáveis, a concentração de OCP teve que ser reduzida. Normalmente, em cosméticos, a concentração de óleo essencial empregada é de no máximo 2%, para reduzir o risco de ocorrerem reações alérgicas (Kaczmarczyk et al., 2015). A concentração de SOF a ser empregada foi definida como 1,0%. O SOF demonstrou ter uma excelente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, sendo a maior concentração de CIM 0,048 mg·mL⁻¹ (0,0048%). Normalmente, em produtos cosméticos, incorpora-se dez vezes mais a concentração do ativo na base para garantir a eficácia deste na formulação (ou seja, 0,048%). Porém, como o sofrorolipídio demonstrou não ter toxicidade em concentrações até 25 mg·mL⁻¹ (2,5%) e sua atividade antioxidante foi próxima a 40% na concentração de 10 mg·mL⁻¹ (1,0%), optou-se por aumentar a concentração do ativo para 1,0%. Em nosso grupo de pesquisa, outro trabalho empregando esta concentração de SOF também foi desenvolvido (Costa et al., 2022). A concentração de LEV empregada no planejamento experimental foi de 2,0%. A LEV demonstrou ter potencial antioxidante mediano, sendo que as concentrações de 1,0% e 2,0% não apresentaram muita divergência em relação ao sequestro do radical DPPH (33,63 e 34,37%, respectivamente). A levana também apresenta uma excelente atividade hidratante (Kim et al., 2005), a qual é semelhante ao do ácido hialurônico. Como está não é citotóxica (Domżał-Kędzia et al., 2019) e não foram encontradas contraindicações de concentrações para o uso desta na literatura, optou-se por empregar 2% desta nas formulações.

As oito formulações desenvolvidas a partir do planejamento experimental simplex-centróide foram submetidas às caracterizações farmacotécnicas e mantiveram-se estáveis frente aos parâmetros analisados, conforme Tabela 3. No quesito espalhabilidade, a incorporação do SOF nas formulações permitiu uma melhora nesta propriedade das formulações, sendo que estas apresentaram diferença estatística significativa em relação a base ($p < 0,05$), enquanto àquelas sem este biossurfactante não apresentaram diferença estatística significativa em relação a base (Tabela 3). Os SOFs, por serem formados por uma porção hidrofílica (soforose) e uma cauda hidrofóbica, são biomoléculas capazes de modificar as características físico-químicas apresentadas pelas formulações, tal como a espalhabilidade, ao reduzirem a tensão superficial e interfacial do sistema, aumentarem a dissolução de hidrocarbonetos e facilitarem a solubilização e absorção de compostos (Cho et al., 2022). Quanto a retenção de umidade, a formulação contendo 1,0% de LEV e 0,5% de SOF foi a única a apresentar diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à FB, conforme Tabela 3. Todas as formulações apresentaram excelente capacidade de retenção de umidade, o que pode auxiliar na manutenção dos níveis de hidratação do estrato córneo labial. Após a realização das caracterizações farmacotécnicas, todas as formulações foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar, durante um período de 15 dias, as quais se mantiveram estáveis ao serem submetidas a condições de estresse.

As formulações do estudo também foram submetidas ao teste de capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, conforme descrito na Tabela 4. Como é possível verificar, até mesmo a FB apresentou boa capacidade antioxidante, o que é bastante incomum. Com exceção do BHT, o qual é um excelente antioxidante e não foi incorporado às formulações submetidas ao teste do DPPH, as formulações apresentaram em sua composição emolientes de origem natural, como a manteiga de karité e o óleo de rícino, os quais apresentam propriedades antioxidantes devido a presença de tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos em sua composição, em diferentes concentrações, os quais são metabólitos secundários que agregam esta função antioxidante aos insumos (Moharram et al, 2006; Yeboah et al., 2021). O emprego dos ativos soforolipídio, levana e óleo essencial como agentes antioxidantes não gerou muita diferença na capacidade antioxidante total das formulações em comparação com a FB.

A otimização das formulações do estudo foi realizada a partir de análise estatística de Superfície de Resposta, conforme Tabela 5. A capacidade de espalhamento que um produto apresenta está relacionada a área que este irá abranger ao ser espalhado durante sua aplicação sobre a pele (Budiasih et al. 2018). De acordo com a Tabela 5, os ensaios 1, 3 e 6 (contendo apenas LEV e OCP, e a combinação destes) foram os únicos que apresentaram uma baixa capacidade de espalhamento, em comparação aos demais ensaios realizados (contendo SOF), os quais apresentaram resposta excelente para este parâmetro. O ensaio 5 (contendo OCP e SOF) apresentou o maior valor de espalhabilidade. A incorporação do soforolipídio nas formulações auxiliou na melhora da capacidade de espalhamento das formulações, pois este biossurfactante tem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial do sistema, modificando suas características físico-químicas (Cho et al., 2022). A superfície de resposta e o perfil de predição de valor e desejabilidade (*profile of predict value and desirability*) são apresentados na Figura 3. De acordo com as análises estatísticas, a formulação composta por 0.0 de levana, 0.5 de soforolipídio (0,5%) e 0.5 de OCP (0,15%) seria a ideal para obter a melhor espalhabilidade do produto. De fato, a incorporação do SOF e do OCP poderia auxiliar na melhora deste parâmetro, por se tratar de substâncias

compostas por porções hidrofóbicas ou em sua totalidade (OCP), que atuam reduzindo a tensão interfacial e superficial do sistema, além de serem ativos emolientes, facilitando assim o espalhamento das formulações. Em geral, os emolientes apresentam grande impacto sobre as características físico-químicas de produtos formulados, tais como a espalhabilidade. Estes atuam na diminuição do coeficiente de atrito da formulação, modificando seu desempenho durante o espalhamento, além de influenciarem na consistência final obtida (Gore et al. 2018).

De acordo com a Tabela 5, todas as formulações apresentaram uma boa capacidade antioxidante, sendo o ensaio 2 (contendo apenas SOF) aquele que apresentou melhor resposta (53,28%). A atividade antioxidante apresentada por SOFs é pouco descrita na literatura, porém, nosso grupo de pesquisa já realizou estudos demonstrando que na concentração de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 59,40% de inibição do radical DPPH foi obtida (Costa et al., 2022). Esta propriedade pode ser atribuída ao fato de os sofrólipídios doarem hidrogênios às espécies reativas, estabilizando-as (Kumari et al., 2021). A superfície de resposta e o perfil de predição de valor e desejabilidade (*profile of predict value and desirability*) são apresentados na Figura 4. De acordo com as análises estatísticas, a formulação composta por 0.25 (0,5%) de levana, 0.75 de sofrólipídio (0,75%) e 0.0 de OCP seria a ideal para obter a melhor atividade antioxidante do produto. De fato, a incorporação da levana e do sofrólipídio poderia auxiliar no incremento desta resposta, visto que suas propriedades antioxidantes já são descritas na literatura (Srikanth et al., 2015; Domżał-Kędzia et al., 2019; Pei et al., 2020; Costa et al., 2022).

De acordo com a Tabela 5, todas as formulações apresentaram uma boa retenção de umidade (acima de 95%), sendo os ensaios 1 (contendo apenas LEV) e 5 (contendo SOF e OCP) aqueles que apresentaram melhor resposta (97,70% e 97,71%, respectivamente). O efeito hidratante apresentado pela LEV já foi estudado por diversos autores. Devido as ligações de hidrogênio existentes em sua molécula, a LEV pode reter uma vasta quantidade de água, apresentando atividade hidratante semelhante à do ácido hialurônico (Kim et al., 2005). Quanto aos SOFs, estes biossurfactantes também apresentam efeitos potenciais no que diz respeito aos cuidados com a pele, especialmente no quesito hidratação. Os SOFs podem auxiliar na estimulação de colágeno e na manutenção das funções da pele, e isto é possível devido sua porção lipídica, a qual permite maior penetração destes ativos na pele (Adu et al., 2020). A associação do SOF com o OCP demonstrou apresentar boa retenção de umidade, o que pode ser promissor. A superfície de resposta e o perfil de predição de valor e desejabilidade (*profile of predict value and desirability*) são apresentados na Figura 5. De acordo com as análises estatísticas, a formulação composta por 0.0 de levana, 0.5 de sofrólipídio (0,5%) e 0.5 de OCP (0,15%) seria a ideal para obter a melhor retenção de umidade do produto.

Baseado nos resultados obtidos para a análise de superfície de resposta, foi possível prever a formulação otimizada do estudo, a qual é composta por 0.2 de LEV (0,4%), 0.8 de SOF (0,8%) e 0.0 de OCP (Figura 6). Como demonstrado neste trabalho, o OCP não demonstrou apresentar boas atividades antioxidante e antimicrobiana, e seria empregado apenas com o intuito de fornecer fragrância para a formulação, diferentemente do SOF e da LEV, os quais apresentaram um potencial mediano para a atividade antioxidante e um excelente potencial antimicrobiano (SOF). Embora o OCP tenha auxiliado nas respostas espalhabilidade e retenção de umidade, quando em combinação com os demais ativos, seu efeito de modo isolado foi inferior frente ao SOF e a LEV para todas as respostas, além deste ter demonstrado efeito negativo quando combinado ao SOF e a LEV na resposta de atividade antioxidante.

Além destes fatores, embora o OCP seja descrito na literatura como GRAS, em diversos estudos de revisão este é relatado como fototóxico, devido aos compostos não-voláteis presentes em sua composição, mesmo que o risco seja considerado baixo (Dosoki et al., 2018).

CONCLUSÃO

Formulações de hidratante labial multifuncional contendo LEV de *Bacillus subtilis* natto, SOF de *Starmerella bombicola* e OCP foram desenvolvidas neste trabalho. A produção dos ativos por fermentação foi de 42,93 g·L⁻¹ para LEV e de 87,10 g·L⁻¹ para SOF. O SOF apresentou CIM entre 0,006-0,048 mg·mL⁻¹ e o OCP entre 5,22-41,75 mg·mL⁻¹ para todos os microrganismos testados. A combinação destes apresentou resposta aditiva e redução da CIM individual dos ativos. A resposta antioxidante dos ativos foi baixa para o OCP e mediana para a LEV e o SOF (acima de 30%). As oito formulações se apresentaram estáveis frente às caracterizações farmacotécnicas desenvolvidas, o que foi confirmado pelo estudo de estabilidade preliminar. As formulações também apresentaram bom potencial antioxidante frente ao radical DPPH. Através da análise estatística de Superfície de Resposta, foi possível selecionar a formulação otimizada do projeto, com base nos resultados de espalhabilidade, retenção de umidade e antioxidante obtidos, a qual apresenta concentrações de 0,4% LEV e 0,8% SOF em sua composição.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem à Universidade Estadual de Londrina pelo apoio e infraestrutura, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, à BIOTEC Magistral pela aquisição do insumo Lecigel® e à Pharmadelle – Farmácia de Manipulação pelo apoio material.

CONFLITOS DE INTERESSE: Nenhum conflito de interesse declarado.

REFERÊNCIAS:

- ABIHPEC. A Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (2023). Disponível em: < https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2023/01/Panorama_do_Setor_Atualizado_15.02.23.pdf>.
- Adu, S. A.; Naughton, P. J.; Marchant, R.; Banat, I. M. (2020) Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. *Pharmaceutics*, 12, 11, 1–21.
- Alkhars, N.; Zeng, Y.; Alomeir, N.; et al. (2022) Oral Candida Predicts Streptococcus mutans Emergence in Underserved US Infants. *Journal of Dental Research*, 101, 1, 54–62.
- Amin, D.; Satishchandran, S.; Drew, S.; Abramowicz, S. (2021) Diagnosis and Treatment of Lip Infections. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 79, 1, 133–140.
- Ashby, R. D.; Solaiman, D. K. Y.; Fan, X.; Olanya, M. (2018) Antimicrobial Potential of Sophorolipids for Anti-Acne, Anti-Dental Caries, Hide Preservation, and Food Safety Applications. *ACS Symposium Series*, 1287, 193–208.
- Bersaneti, G. T.; Pan, N. C.; Baldo, C.; Celligoi, M. A. P. C. (2018) Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with

- Potential Application in the Food Industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 3, 838–851.
- Bersaneti, G. T.; Pan, N. C.; Baldo, C.; Celligoi, M. A. P. C. (2017) Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis natto* with Potential Application in the Food Industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 3, 838–851.
- Bielfeldt, S.; Blaak, J.; Laing, S.; et al. (2019a) Deposition of plant lipids after single application of a lip care product determined by confocal raman spectroscopy, corneometry and transepidermal water-loss. *International Journal of Cosmetic Science*, 41, 3, 281–291.
- Bielfeldt, S.; Laing, S.; Sadowski, T.; Gunt, H.; Wilhelm, K. P. (2019b) Characterization and validation of an in vivo confocal Raman spectroscopy led tri-method approach in the evaluation of the lip barrier. *Skin Research and Technology*, 26, 3, 390–397.
- Bouallegue, A.; Casillo, A.; Chaari, F.; et al. (2020) Levan from a new isolated *Bacillus subtilis* AF17: Purification, structural analysis and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 316–324.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. (2004) 1. ed., 1, 52.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos*. (2008)
- Budiasih, S.; Masyitah, I.; Jiyaudin, K.; et al. (2019) Formulation and Characterization of Cosmetic Serum Containing Argan Oil as Moisturizing Agent. *Science and Technology Publications*, 297–304.
- Caretta, T. O.; I Silveira, V. A.; Andrade, G.; Macedo, F.; P C Celligoi, M. A. (2022) Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against phytopathogens from cherry tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102, 3, 1245–1254.
- Cho, W. Y.; Ng, J. F.; Yap, W. H. (2022) Sophorolipids — Bio-Based Antimicrobial Formulating Agents. *Molecules*, 1–24.
- CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute). (2021) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. CLSI standard M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costa, E. M.; Bigotto, B. G.; Dahmer, D.; et al. (2022) Development of a Multifunctional Lipstick With Sophorolipids Produced By *Starmerella Bombicola*. *International Journal of Health Science*, 2, 44, 2–10.
- Cunha, C.; Ribeiro, H. M.; Rodrigues, M.; Araujo, A. R. T. S. (2022) Essential oils used in dermocosmetics: Review about its biological activities. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21, 2, 513–529.
- Da Fontoura, I. C. C.; Saikawa, G. I. A.; Silveira, V. A. I.; et al. (2020) Antibacterial activity of sophorolipids from *Candida bombicola* against human pathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63, 1–10.
- Da Silva, R. T.; Bersaneti, G. T.; Lonni, A. A. S. G.; Celligoi, M. A. P. C. (2019) Produção de levana e sua aplicação em cosméticos. In: De Oliveira Junior, J. M. B. (org). *A produção do conhecimento nas ciências biológicas*. Ponta Grossa: Editora Atena, cap 4, 22-35.
- Dahmer, D.; Bergamini, T. A.; Bigotto, B. G.; Celligoi, M. A. P. C.; Lonni, A. A. S. G. (2022) Cosméticos labiais: tendência verde e o emprego da biotecnologia. In: PESSOA, D. L. R. *Farmácia Hospitalar e Clínica e Prescrição Farmacêutica*. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 56-70.
- Deng, W.; Liu, K.; Cao, S.; et al. (2020) Antiproliferative Properties of Grapefruit.

Molecules, 1-12.

Denkova-Kostova, R.; Teneva, D.; Tomova, T.; et al. (2021) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 76, 5, 175–185.

Dos Santos, L. F.; Bazani Cabral De Melo, F. C.; Martins Paiva, W. J.; et al. (2013) Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* NATTO. *Romanian Biotechnological Letters*, 18, 4, 8413–8422.

Dosoky, N. S.; Setzer, W. N. (2018) Biological activities and safety of citrus spp. Essential oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 7, 1–25.

Filipe, G. A.; Bigotto, B. G.; Baldo, C.; et al. (2022) Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil against acne-causing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 1–9.

Filoche, S. K.; Soma, K.; Sissons, C. H. (2005) Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology*, 20, 4, 221–225.

García-García, R.; López-Malo, A.; Palou, E. (2011) Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 76, 2, 95–100.

Gfeller, C. F.; Wanser, R.; Mahalingam, H.; et al. (2019) A series of in vitro and human studies of a novel lip cream formulation for protecting against environmental triggers of recurrent herpes labialis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 12, 193–208.

Gojic-Cvijovic, G. D.; Jakovljevic, D. M.; Loncarevic, B. D.; Todorovic, N. M.; et al. (2019) Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 142–151.

Gore, E.; Picard, C.; Savary, G. (2018) Spreading behavior of cosmetic emulsions: Impact of the oil phase. *Biotribology*, 16, 17–24.

Helenas, J. K.; Bersaneti, G. T.; Silva, R. T. Da; et al. (2023) Development of Facial Cosmetic Formulations Using Microbial Levan in Association with Plant-Derived Compounds Using Simple Lattice Design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, 1–11.

Hertadi, R.; Umriani Permatasari, N.; Ratnaningsih, E. (2021) Box-Wilson Design for Optimization of in vitro Levan Production and Levan Application as Antioxidant and Antibacterial Agents. *Iranian Biomedical Journal*, 1, 25: 202-12.

Hipólito, A.; Alves Da Silva, R. A.; Caretta, T. De O.; et al. (2020) Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101797.

Jung, I. H.; Kim, J. H.; Yoo, Y. J.; et al. (2019) A pilot study of occupational exposure to pathogenic microorganisms through lip cosmetics among dental hygienists. *Journal of Occupational Health*, 61, 4, 297–304.

Kaczmarczyk, D.; Strub, D. J.; Polowy, A.; Wilk, K. A.; Lochyński, S. (2015) Selected Essential Oils in Cosmetic Emulsions: Process Oriented Stability Studies and Antimicrobial Activity. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 2, 4, 27–39.

Kar, M.; Muluk, N. B.; Bafaqeeh, S. A.; Cingi, C. (2018) È Possibile Definire Le Labbra Ideali? *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 38, 1, 67–72.

Kim, H.; Lee, M.; Park, S. Y.; et al. (2018) Age-related changes in lip morphological and physiological characteristics in Korean women. *Skin Research and Technology*, 25, 3, 277–282.

- Kim, K. H.; Chung, C. B.; Kim, Y. H.; et al. (2005) Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Cosmetic Science*, 56, 6, 395–406.
- Kim, S. J.; Chung, B. H. (2016) Antioxidant activity of levan coated cerium oxide nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 5; 150:400-7.
- Kim, S. H. (2019) Analysis of Correlation among Oral Environment, Oral Myofunction, and Oral Microorganisms. *Journal of Dental Hygiene Science*, 19, 2, 96–106.
- Knorst, M. T. (1991) Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Compositae - marcela, 228. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.
- Kumari, A.; Kumari, S.; Prasad, G. S.; Pinnaka, A. K. (2021) Production of Sophorolipid Biosurfactant by Insect Derived Novel Yeast *Metschnikowia churdharensis* f.a., sp. nov., and Its Antifungal Activity Against Plant and Human Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–13.
- Moharram, H.; Ray, J.; Ozbas, S.; Juliani, H.; Simon, J. (2006) Shea butter: Chemistry, quality, and new market potentials. *ACS Symposium Series*, 925, 326–340.
- Okunowo, W. O.; Oyedeji, O.; Afolabi, L. O.; Matanmi, E. (2013) Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and Its Antimicrobial Activities. *American Journal of Plant Sciences*, 04, 07, 1–9.
- Ou, M. C.; Liu, Y. H.; Sun, Y. W.; Chan, C. F. (2015) The Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Cold-Pressed and Distilled Essential Oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Pei, F.; Ma, Y.; Chen, X.; Liu, H. (2020) Purification and structural characterization and antioxidant activity of levan from *Bacillus megaterium* PFY-147. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1181–1188.
- Ragab, T. I. M.; Malek, R. A.; Elsehemy, I. A.; Farag, M. M. S.; Salama, B. M.; Abd El-Baseer, M. A.; Gamal-Eldeen, A. M.; El Enshasy, H. A.; Esawy, M. A. (2019) Scaling up of levan yield in *Bacillus subtilis* M and cytotoxicity study on levan and its derivatives. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127, 6, 655-662.
- Sharmeen, J. B.; Mahomoodally, F. M.; Zengin, G.; Maggi, F. (2021) Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules*, 26, 3.
- Silveira, V. A. I.; Nishio, E. K.; Freitas, C. A. U. Q.; et al. (2019) Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21.
- Srikanth, R.; Reddy, C. H. S. S. S.; Siddartha, G.; Ramaiah, M. J.; Uppuluri, K. B. (2015) Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102–114.
- Srikanth, R.; Siddartha, G.; Sundhar Reddy, C. H. S. S.; et al. (2015) Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate Polymers*, 123, 8–16.
- Tamura, E.; Ishikawa, J.; Naoe, A.; Yamamoto, T. (2016) The roughness of lip skin is related to the ceramide profile in the stratum corneum. *International Journal of Cosmetic Science*, 38, 6, 615–621.
- Tamura, E.; Ishikawa, J.; Yasuda, Y.; Yamamoto, T. (2021) The efficacy of synthetic pseudo-ceramide for dry and rough lips. *International Journal of Cosmetic Science*, 43, 2, 158–164.
- Uysal, B.; Sozmen, F.; Aktas, O.; Oksal, B. S.; Kose, E. O. (2011) Essential oil

- composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi*. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 7, 1455–1461.
- Varvaresou, A.; Iakovou, K. (2015) Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. *Letters in Applied Microbiology*, 61, 3, 214–223.
- Vasek, O. M.; Cáceres, L. M.; Chamorro, E. R.; Velasco, G. A. (2015) Antibacterial activity of *Citrus paradisi* essential oil. *Journal of Natural Products*, 8, 16–26.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Perez-Álvarez, J. (2008) Antibacterial activity of lemon. *Journal of Food Safety*, 28, 2008, 567–576.
- Yang, S. A.; Jeon, S. K.; Lee, E. J.; Shim, C. H.; Lee, I. S. (2010) Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24, 2, 140–151.
- Yeboah, A.; Ying, S.; Lu, J.; et al. (2021) Castor oil (*Ricinus communis*): A review on the chemical composition and physicochemical properties. *Food Science and Technology (Brazil)*, 41, 399–413.
- Zhang, Z.; Wang, X.; Han, Z.; Zhao, M.; Yin, L. (2012) Purification, antioxidant and moisture preserving activities of polysaccharides from papaya. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2332–2337.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *in vivo* E ANÁLISE SENSORIAL DE BÁLSAMO LABIAL MULTIFUNCIONAL BIOTECNOLÓGICO CONTENDO LEVANA DE *Bacillus subtilis* NATTO E SOFOROLIPÍDIO DE *Stammerella bombicola* PARA REPARAÇÃO E HIDRATAÇÃO DOS LÁBIOS

Débora Dahmer^a, Briani Gisele Bigotto^b, Sara Scandorieiro^a, Thays Amélio Bergamini^c, Renata Kobayashi^d, Gerson Nakazato^d, Sandra Helena Prudêncio^e, Marina Leite Mitterer Daltoé^f, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^b, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni^{a,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^cAcadêmica de Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^dDepartamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^eDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

^fDepartamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Brasil

***Autor Correspondente:**

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Av. Robert Koch, 60 Vila Operária, CEP: 86038-350, Londrina, Brasil, e-mail: audrey@uel.br.

RESUMO: Técnicas não-invasivas para a avaliação da eficácia de cosméticos são uma alternativa às experimentações animais e auxiliam na comprovação dos *claims* atribuídos aos produtos. Em associação com técnicas sensoriais, estes podem auxiliar no desenvolvimento de novos cosméticos e na verificação da aceitação pelo público consumidor. O presente trabalho propõe a avaliação da eficácia de um bálsamo labial multifuncional contendo levana e soforolipídios, por meio da verificação de características biofísicas dos lábios, antes e após 7 dias de uso, com aparelho Skin Analyser Digital (SkinUp[®] Devices), bem como, emprego de análise sensorial para averiguação de atributos, aceitação por escala hedônica e intenção de compra dos produtos. As formulações auxiliaram na manutenção da hidratação e oleosidade labiais já apresentadas pelos participantes, sendo que 85% destes verificaram melhora no ressecamento e aspereza labial, além de demonstrarem ter bom índice de aceitação e de intenção de compra pelos avaliadores. Com relação aos atributos, não foram verificadas diferenças entre a formulação teste e o controle empregado. Desta forma, este estudo auxilia no desenvolvimento de trabalhos futuros com cosméticos, por meio da utilização de uma nova técnica não-invasiva e de baixo custo, em associação a análises sensoriais relevantes no ramo da cosmetologia.

PALAVRAS-CHAVE: Emulsão Labial. Ativos Biotecnológicos. Bioimpedância. Atributos. Aceitação. Intenção de Compra. Cosméticos.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido verificada uma crescente demanda pelo desenvolvimento de cosméticos mais naturais e sustentáveis, principalmente, pela disseminação destes ideais por meio das mídias sociais, as quais influenciam na opinião e na aquisição de produtos pelos consumidores [1]. Desta forma, a pesquisa de ativos e insumos naturais pela indústria cosmética, que sejam seguros para uso humano, tem apresentado destaque [2].

A pesquisa de moléculas bioativas, que apresentem propriedades biológicas e características renováveis, tem sido realizada pela indústria cosmética em associação à biotecnologia, ciência que permite o desenvolvimento de novos insumos e produtos, de modo eficiente [3], por meio de processos fermentativos ou de engenharia genética, empregando microrganismos e enzimas, e a qual pode auxiliar na avaliação destes componentes na pele [4].

Exemplos de moléculas biotecnológicas empregadas em formulações cosméticas correspondem a polissacarídeos e lipídios derivados, como a levana (LEV) e os soforolipídios (SOF) [5]. A LEV corresponde a um exopolissacarídeo (EPS) de frutose, formado por meio de ligações glicosídicas do tipo $\beta(2\rightarrow6)$ [6], que pode ser obtido por processos fermentativos a partir de uma variedade de microrganismos, como *Bacillus subtilis natto*. Este EPS apresenta diversas propriedades bioativas de interesse cosmético, como efeitos hidratante, antioxidante e *filler* [7]. Os SOFs correspondem a biossurfactantes, que consistem em soforoses dissacarídicas (2'-O- β -D-glucopiranosil-1- β -D-glucopiranosose) unidas por ligações glicosídicas até uma cadeia de ácido graxo [8], os quais são obtidos de cepas fúngicas não patogênicas, como *Starmmerella bombicola*. Estes apresentam propriedades hidratante, antioxidante e antimicrobiana, que possuem elevada aplicabilidade na indústria cosmética [9, 8, 10, 11, 12].

Os lábios são uma extensão da mucosa oral em contato com o ambiente externo [13]. Estes apresentam uma histologia bem definida, sendo formados por fino estrato córneo (EC), constituído por células de rápida renovação, as quais permitem que corneócitos imaturos sejam expostos a superfície da pele, o que acarreta maior perda transepidermica de água, e conseqüentemente, ressecamento e aspereza labial [14]. Além disso, sua proeminente localização propicia a influência de agentes externos, como radiação UV e baixas temperaturas, sobre a hidratação desta região [15].

Devido a estas características, os lábios necessitam de cuidados especializados, como a utilização de cosméticos labiais que auxiliem na manutenção e/ou reposição da hidratação [16]. Grande parte dos produtos labiais disponíveis no mercado possuem formulação anidra [17]. Uma exceção à regra são os produtos labiais emulsivos, os quais podem prover benefícios adicionais pela incorporação de ativos, tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, como vitaminas, antioxidantes e regeneradores labiais [5].

A qualidade de um produto cosmético envolve sua eficácia e segurança de uso, a estabilidade da fórmula e o aspecto sensorial. Com a finalidade de avaliar efeitos de formulação, o estudo biofísico da pele têm sido amplamente empregado, pois permite a aplicação de métodos que avaliam as características cutâneas *in vivo* por meio de técnicas não invasivas, rápidas e seguras [18], como a hidratação e a oleosidade. Além da comprovação da eficácia clínica apresentada por produtos cosméticos, é

imprescindível que a formulação apresente um bom sensorial, o que implica no bem-estar do consumidor, na aceitação do produto e no seu uso a longo prazo [19], sendo a análise sensorial uma ferramenta útil e relevante, que garante a qualidade dos produtos desenvolvidos considerando as expectativas do consumidor e os benefícios frisados [20].

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia clínica de formulação de bálsamo labial multifuncional, contendo moléculas biotecnológicas (LEV e SOF), frente aos parâmetros de hidratação e oleosidade labial, por meio de técnica não invasiva, bem como, avaliar aspectos sensoriais desta, como intensidade de atributos, aceitação e intenção de compra, sendo um trabalho inovador, que agrega conhecimentos no ramo da cosmetologia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção das Biomoléculas

A levana (LEV) produzida pelo microrganismo *Bacillus subtilis* natto e os sofrorolipídios (SOF) produzidos pela levedura *Starmerella bombicola* foram fornecidos pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil).

2.2. Desenvolvimento do Bálsamo Labial Multifuncional

Formulações do tipo emulsão O/A foram desenvolvidas, empregando como ativos LEV (0,4%) e SOF (0,8%), os quais as concentrações foram otimizadas em trabalho anterior. As formulações foram preparadas pelo método de inversão de fases, empregando agitação mecânica e aquecimento, conforme metodologia descrita por Do Rosário et al. [21], com algumas modificações. As formulações foram desenvolvidas conforme patente depositada no INPI sob nº BR 10 2023 008390 0.

2.3. Avaliação da Eficácia *in vivo* e Análise Sensorial das Formulações

O estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, segundo a Resolução nº446/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e tem como CAAE 58720522.9.0000.5231.

2.3.1. População do Estudo

A população do estudo foi composta por 61 voluntários sadios, do sexo feminino, com idades entre 18 e 37 anos ($24,6 \pm 5,05$), que apresentavam lábios ressecados [22, 23]. Estes foram selecionados a partir de convite verbal e em meio digital pela equipe de pesquisadores e aqueles que atenderam aos critérios de inclusão, foram convidados a fazer parte do estudo, sendo instruídos dos objetivos e métodos deste. Em caso de aceite, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi solicitada.

Foram excluídos da amostragem participantes que estivessem grávidas ou com suspeita de gravidez, lactantes, com histórico de hipersensibilidade previamente conhecida a algum componente das formulações, que fizessem uso de medicação que pudesse alterar as respostas da pele, que apresentassem algum distúrbio crônico, sistêmico ou de pele, com sinais de irritação cutânea no local de aplicação, que tivessem feito o uso de tratamentos labiais, dermatológicos ou estéticos nos 40 dias antecedentes ao estudo, que participaram de estudos similares nos 30 dias

anteriores ou que apresentassem sinais de dermatite ou irritação durante o período de avaliação [24, 13].

2.3.2. Delineamento do Estudo

O delineamento empregado no estudo foi experimental, do tipo ensaio clínico randomizado. A eficácia de duas diferentes formulações semissólidas foi avaliada frente a hidratação cutânea. Técnica de escala de intensidade foi aplicada para levantar atributos e perfis das formulações [20]. A aceitação e intenção de compra das formulações também foram avaliadas através de análise sensorial [25, 26], bem como, o efeito (regeneração labial) destas. O equipamento utilizado para a avaliação dos parâmetros biofísicos foi o Analisador de Pele Digital Facial Skin Analyser (SkinUp Beauty Devices) [27].

Os participantes foram divididos aleatoriamente em dois grupos de tratamento, sendo eles: grupo experimental, que utilizou exclusivamente a FT, composto por 26 participantes; grupo controle, que utilizou exclusivamente a FB, composto por 30 participantes. Estes estavam “cegos” em relação ao conteúdo dos produtos aplicados. Foi solicitado aos voluntários que durante o período de estudo apenas utilizassem na região labial os cosméticos fornecidos, de modo a evitar possíveis interferências.

Os participantes foram orientados sobre o modo de aplicação dos produtos, o qual deveria ocorrer diretamente sobre os lábios previamente higienizados com água micelar, sendo em seguida enxaguados e secos com toalha macia, e aplicando suavemente e de modo uniforme, duas vezes ao dia (manhã e noite), o hidratante labial, durante um período de 7 dias [24]. A aplicação ocorreu a partir do próprio aplicador da bismaga labial, sem contato de outras partes corporais, como as mãos, do participante com a formulação. Foi recomendado que um *wash-out* sem cosméticos labiais ou qualquer terapia tópica labial fosse realizado 12 horas antes da aplicação dos produtos em estudo.

2.3.3. Análise de Hidratação

A coleta das medidas foi efetuada no tempo zero (valor basal) e 7 dias após autoaplicação diária do bálsamo labial. A região do lábio inferior foi selecionada para as medidas [28, 13, 15], sendo higienizada com água micelar previamente à coleta dos dados. Foram empregadas seis repetições para a análise de hidratação. O acompanhamento do tratamento também foi feito por meio de Fotodocumentação dos lábios em condições padronizadas de iluminação, fundo e posicionamento. O registro fotográfico ocorreu no tempo zero e 7 dias.

2.3.4. Análise Sensorial

A análise sensorial ocorreu por meio dos testes afetivos de aceitação por escala hedônica de sete pontos e intenção de compra, escala de intensidade e avaliação do efeito do hidratante labial. Esta foi realizada com avaliadores não treinados, porém, potenciais consumidores do produto.

Cada participante recebeu duas amostras de hidratante labial (teste e controle), acondicionadas em *ependorf* e previamente codificadas com número de três dígitos em ordem aleatória, bem como, as fichas de avaliação contendo as instruções do método. No teste de escala de intensidade, os atributos avaliados foram: facilidade de espalhar, absorção, hidratação, frescor, formação de filme aveludado e fragrância [20, 29]. No teste de aceitação, os avaliadores classificaram as amostras utilizando a escala hedônica estruturada de 7 pontos: 7- Gostei muitíssimo, 6- Gostei muito, 5- Gostei, 4- Não gostei, nem desgostei, 3- Desgostei, 2- Desgostei muito e 1- Desgostei muitíssimo. Em paralelo, no teste de intenção de compra, foi requerido que os

avaliadores indicassem sua intenção de compra das amostras apresentadas, usando a escala de 5 pontos: 5- Certamente compraria, 4- Provavelmente compraria, 3- Talvez comprasse, talvez não comprasse, 2- Provavelmente não compraria e 1- Certamente não compraria.

O teste de efeito do hidratante labial foi realizado após os demais. Os avaliadores receberam uma amostra codificada na forma de bisnaga contendo a formulação teste do estudo (com as biomoléculas), a qual aplicaram diariamente, duas vezes ao dia, por um período de 7 dias, procedendo com os mesmos cuidados indicados para o teste de avaliação da hidratação. Ao final deste período, estes avaliaram o efeito do produto através do questionamento “Após os sete dias de aplicação do produto, você percebeu que houve melhoras na aspereza e ressecamento dos lábios?”, escolhendo como resposta uma das alternativas: sim ou não [29].

2.4. Análise Estatística

Teste de Shapiro-Wilk foi empregado para verificação da normalidade dos resultados de hidratação e oleosidade labial. Como a distribuição era normal, Teste t paramétrico foi utilizado para avaliação de diferença estatística. Para avaliação da intensidade dos atributos, escala hedônica e intenção de compra, assumiu-se que os dados eram paramétricos, sendo utilizado Teste t para avaliação de diferença estatística.

3. RESULTADOS

Este estudo foi realizado entre os meses de abril e maio de 2023, no Laboratório de Análise Sensorial, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA, da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Na Figura 1, é possível observar o diagrama do estudo que foi desenvolvido. No início da pesquisa, 61 participantes demonstraram interesse em participar do estudo. Após aplicação de *checklist* sobre os critérios de inclusão e exclusão, houve exclusão de 5 participantes: 1 participante apresentava idade maior que 40 anos e 4 participantes faziam uso de medicação para tireoide. Desta forma, apenas 56 participantes estavam aptos a participar. Estes foram randomizados em dois grupos, sendo o grupo experimental composto por 26 participantes, que realizaram a aplicação da FT, e o grupo controle composto por 30 participantes, que realizaram a aplicação da FB. Após 7 dias de aplicação diária dos bálsamos labiais, 5 participantes do grupo experimental e 5 participantes do grupo controle não retornaram para a avaliação final de hidratação. Além disso, 5 participantes relataram não terem feito a aplicação correta dos produtos (grupo experimental: n=3; grupo controle: n=2), totalizando assim, 18 participantes aptos no grupo experimental e 23 participantes aptos no grupo controle. As análises sensorial e de efeito da formulação foram realizadas com os mesmos participantes do estudo. Dos 56 participantes aptos inicialmente, apenas 46 retornaram para a realização dos testes sensoriais e de avaliação do efeito da FT, sendo que para este último, houve desistência de 4 participantes, pelo fato do teste apresentar duração de mais 7 dias, e 2 não realizaram a aplicação correta do produto neste período, resultando em 40 participantes aptos.

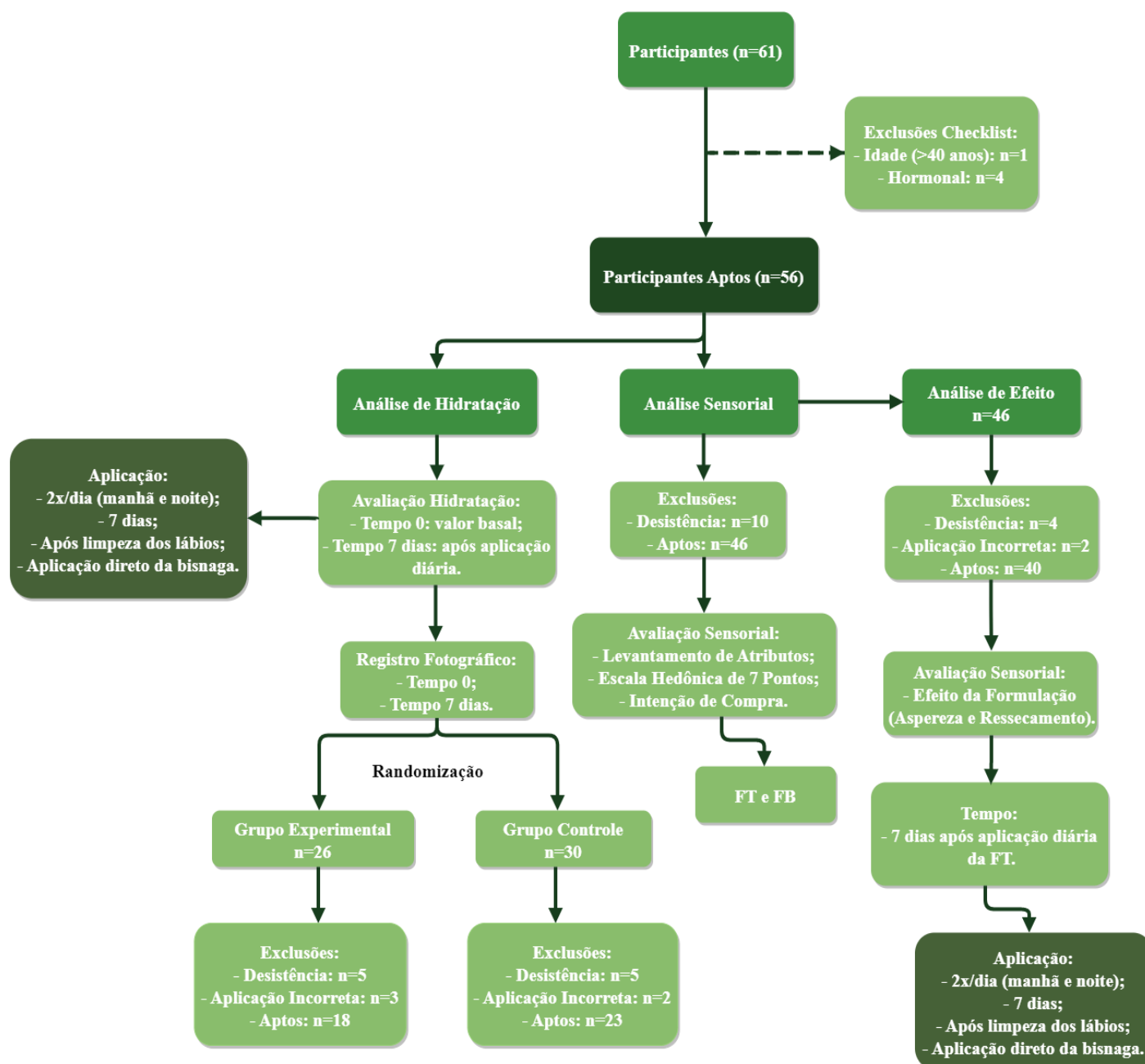


Figura 1 - Diagrama das análises desenvolvidas nos testes *in vivo*, ressaltando as exclusões de participantes ocorridas em cada etapa.

Fonte: [30].

Os resultados para hidratação e oleosidade da região labial dos participantes do estudo se encontram descritos na Tabela 1. Não houve diferença estatística significativa entre a hidratação ($p = 0,9089$) e a oleosidade ($p = 0,8082$) dos participantes do grupo experimental em relação aos participantes do grupo controle, no tempo zero, sendo que as médias de hidratação e oleosidade foram de $41,93 \pm 11,4\%$ e $28,61 \pm 4,40\%$, respectivamente, para o grupo experimental, e de $41,53 \pm 10,6\%$ e $28,95 \pm 4,64\%$, respectivamente, para o grupo controle. Após a aplicação do bálsamo labial durante 7 dias, não foi verificada diferença estatística significativa para a hidratação ($p = 0,8520$) e a oleosidade ($p = 0,2552$) entre o grupo experimental e o grupo controle, sendo que as médias de hidratação e oleosidade foram de $45,15 \pm 9,8\%$ e $25,95 \pm 4,04\%$, respectivamente, para o grupo experimental, e de $44,55 \pm$

10,3% e $27,87 \pm 6,03\%$, respectivamente, para o grupo controle. Não foi verificada diferença estatística significativa ($p > 0,05$), também, entre os tempos 0 e 7, para a hidratação e a oleosidade, tanto do grupo experimental quanto do grupo controle. Conforme o *score* de Heinrich [39], o qual realiza a classificação da pele de acordo com a hidratação, baseado nas médias de hidratação obtidas para o grupo experimental e o grupo controle, no tempo 0 e no tempo 7, foi verificado que os participantes apresentavam pele normal (hidratação $> 40,0$) na região dos lábios.

Tabela 1 - Resultados para a hidratação e oleosidade da região labial dos participantes, nos tempos 0 e 7 dias.

	Grupo Experimental		Grupo Controle	
	Hidratação (%)	Oleosidade (%)	Hidratação (%)	Oleosidade (%)
Tempo 0	$41,93 \pm 11,4$	$28,61 \pm 4,40$	$41,53 \pm 10,6$	$28,95 \pm 4,64$
Tempo 7	$45,15 \pm 9,80$	$25,95 \pm 4,04$	$44,55 \pm 10,3$	$27,87 \pm 6,03$

Na Figura 2 é possível verificar alguns registros fotográficos da região labial realizados ao longo do estudo, nos tempos 0 e 7 dias, para participantes do grupo experimental e do grupo controle. O aspecto de ressecamento apresentou melhoras a nível visual, com a redução de rachaduras e feridas.



Figura 2 - Fotodocumentação da região labial durante o período de desenvolvimento do estudo. FB: formulação base; FT: formulação teste.

A frequência de uso de hidratantes labiais pelos participantes do estudo é representada na Figura 3. Dos 46 participantes que realizaram as análises sensoriais, 23 (50%) realizavam uso de hidratantes labiais mais de uma vez ao dia, 8 (17%) realizavam uso diariamente, 5 (11%) realizavam uso várias vezes durante a semana, 3 (7%) realizavam uso semanalmente, 5 (11%) realizavam uso menos de uma vez ao mês e 2 (4%) nunca realizavam uso.

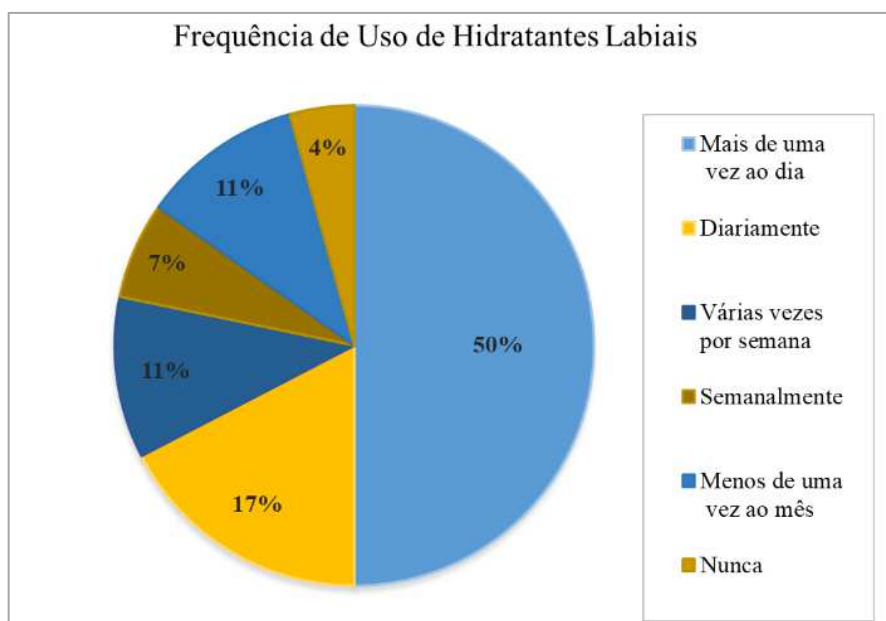


Figura 3 - Frequência de uso de hidratantes labiais pelos participantes do estudo.

Os atributos avaliados na análise sensorial foram: facilidade de espalhar, absorção, hidratação, frescor, formação de filme aveludado e fragrância. A descrição destes se encontra no Quadro 1.

Quadro 1 - Descrição dos atributos avaliados durante análise sensorial.

ATRIBUTO	DESCRIÇÃO
Facilidade de Espalhar	Quão fácil é para realizar a aplicação da amostra nos lábios
Absorção	A amostra é absorvida pelos lábios, desaparece na pele
Hidratação	A amostra hidrata os lábios, repondo a umidade destes
Frescor	Sensação agradável produzida pela amostra em contato com os lábios; remete a algo fresco
Formação de Filme Aveludado	A superfície dos lábios apresenta textura macia e suave após aplicação da amostra
Fragrância	O aroma/perfume que a amostra apresenta

Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 2. Não foi possível verificar diferença estatística significativa entre FT e FB para todos os atributos avaliados, conforme Figura 4, sendo que os p valores foram: facilidade de espalhar, 0,9234; absorção, 0,7626; hidratação, 0,8752; frescor, 0,2957; formação de filme aveludado, 0,2047; e fragrância, 0,9840.

Tabela 2 - Intensidade dos atributos avaliados na análise sensorial de acordo com os participantes.

	Facilidade de Espalhar	Absorção	Hidratação	Frescor	Formação de Filme Aveludado	Fragrância
FT	6,874 ± 1,94	6,363 ± 1,90	7,086 ± 1,54	7,773 ± 1,28	6,865 ± 1,56	4,955 ± 2,51
FB	6,835 ± 1,95	6,238 ± 2,05	7,036 ± 1,51	7,479 ± 1,39	7,341 ± 1,71	4,945 ± 2,68

FB: formulação base; FT: formulação teste.

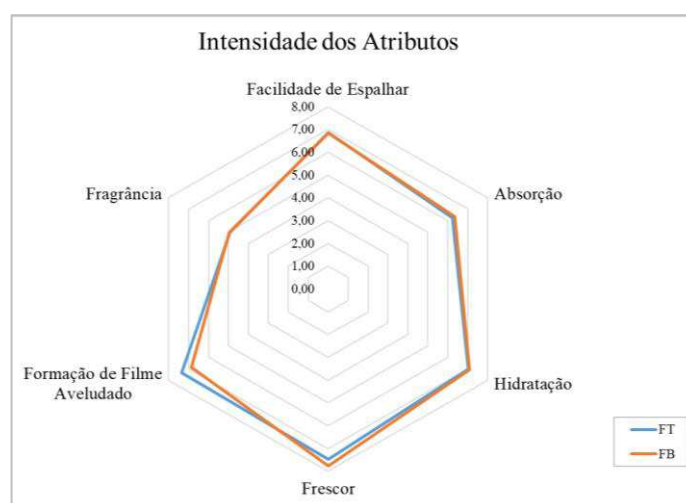


Figura 4 - Gráfico radar para a intensidade dos atributos verificados.

Teste de aceitação por escala hedônica de 7 pontos foi aplicado para as formulações FT e FB pelos avaliadores. A média de aceitação para FT foi de $5,935 \pm 0,83$, o que representa um índice de aceitação de 84,71%, e para FB foi de $5,522 \pm 1,00$, o que representa um índice de aceitação de 78,86%. Foi verificada diferença estatística significativa entre FT e FB ($p = 0,0341$), ou seja, houve melhor aceitação da FT pelos avaliadores. A intenção de compra das formulações também foi avaliada, sendo que para FT foi de $4,087 \pm 0,78$, o que representa um índice de compra de 81,8%, e para FB foi de $3,848 \pm 0,87$, o que representa um índice de compra de 77,0%. Não foi verificada diferença estatística significativa ($p = 0,1691$) frente a este parâmetro.

O efeito de auxílio no ressecamento e aspereza dos lábios foi verificado para a FT, por meio de análise sensorial, e os resultados se encontram descritos na Figura 5. Dos 40 participantes aptos para a realização deste teste, 34 (85%) perceberam que a formulação auxiliou na hidratação dos lábios, enquanto 6 (15%) descreveram que não observaram efeito hidratante e de auxílio no ressecamento labial. Para estes últimos, a quantidade limitada de aplicações (duas vezes ao dia) prejudicou na verificação da propriedade hidratante pelo bálsamo labial, pois ao longo do dia, os lábios acabavam ressecando devido a ingestão de alimentos e bebidas. Outro fator determinante foi a modificação do clima, com quedas abruptas de temperatura, as quais auxiliaram no ressecamento labial.

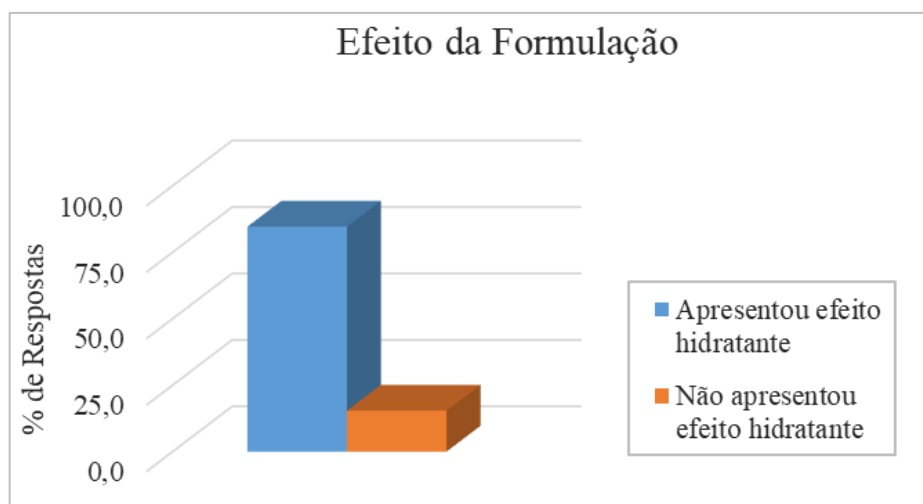


Figura 5 - Avaliação do efeito hidratante da formulação teste pelos participantes.

4. DISCUSSÃO

A verificação da eficácia de formulações cosméticas é de extrema importância, pois implica na confirmação dos *claims* que estão sendo propostos pelo produto, como auxílio na hidratação, redução de linhas finas, retenção da oleosidade, dentre outros. Diversas técnicas podem ser empregadas com este objetivo, dentre elas, análise biofísicas não invasivas, por meio de avaliação instrumental, as quais são seguras, não prejudicam a pele dos participantes e podem simular situações de uso real da formulação [31], além de serem uma alternativa aos estudos de eficácia em animais [32]. Neste trabalho, hidratação e oleosidade labial foram verificados por meio de equipamento não invasivo e portátil Skin Analyser Digital (SkinUp® Devices), o qual é baseado no método de bioimpedância. Este é um equipamento de elevada sensibilidade, que apresenta boa correlação ao Corneometer®, o qual é amplamente empregado para análises de hidratação da pele, e boa reprodutibilidade dos dados [27], sendo eficiente para verificações como as propostas neste trabalho.

De acordo com os resultados descritos na Tabela 2, é possível observar que os participantes do grupo experimental e do grupo controle apresentavam bom nível de hidratação labial no tempo 0, com teores acima de 41,0%, os quais são descritos pelo score de Heinrich [39] como normal. O mesmo para oleosidade, com teores acima de 28,0%. Após a aplicação das formulações FT e FB, no tempo 7 dias, é possível observar que houve um pequeno incremento na hidratação labial, com teores próximos a 45%, no entanto, sem diferença estatística em relação ao tempo 0. A oleosidade reduziu, mantendo teores próximos a 25,0%, mas também não foi verificada significância estatística. Quando comparados os grupos experimental e controle, após a aplicação dos bálsamos labiais, não foi verificada diferença estatística nos teores de hidratação e oleosidade, os quais foram bem próximos. Nenhum efeito adverso ou irritabilidade foram descritos pelos participantes ao longo do estudo.

Alguns fatores influenciaram negativamente nestes resultados, como o número limitado de aplicações diárias das formulações, como descrito por diversos participantes, o que permitia que ao longo do dia ocorressem períodos de ressecamento, devido a ingestão de alimentos/bebidas e a não reaplicação do produto, e as mudanças de temperatura presenciadas nos meses de abril e maio (de 30 °C para 15 °C, por exemplo), que favoreciam o ressecamento labial, com o

surgimento de rachaduras e feridas. Para contornar estes problemas, um maior número de aplicações diárias seria o ideal, como 3 a 4, o que permitiria que o produto formasse uma barreira protetora nos lábios ao longo do dia todo. Porém, mesmo com estes acontecimentos, é possível observar que o emprego das formulações auxiliou na manutenção da hidratação e oleosidade labiais já exibida pelos participantes, o que é um resultado muito promissor.

Estudos avaliando a hidratação e oleosidade labial pelo aparelho Skin Analyser Digital não são descritos na literatura, pois este é um método recente, o que permite que este trabalho possa auxiliar no desenvolvimento de estudos futuros sobre hidratação labial e avaliação da eficácia de cosméticos para os lábios, empregando um aparelho portátil e mais barato como o da SkinUp® Devices. Há relatos na literatura envolvendo outros métodos instrumentais, como o emprego do Corneometer®, em estudos de eficácia de produtos labiais. Gfeller et al. [16] desenvolveram um creme labial contendo tecnologia micro reparadora que permitiu melhora no ressecamento em relação ao grupo não tratado. Bielfeldt et al. [15] desenvolveram um cosmético labial contendo emolientes naturais que auxiliou na melhora da hidratação, bem como, na redução da perda transepidérmica de água dos lábios. Fisher e Fisher [24] desenvolveram estudo com cosmético labial contendo ácido hialurônico e este auxiliou na melhora da elasticidade e hidratação labial (equipamento empregado: MoistureMeterSC – Delfin Technologies). Não há estudos na literatura que abordem o desenvolvimento de produtos labiais contendo LEV e SOF em associação, sendo o cosmético desenvolvido neste trabalho inovador.

A análise sensorial é uma ferramenta útil e de grande importância na indústria cosmética, pois auxilia no desenvolvimento de produtos, na garantia da qualidade destes e no marketing agregado, além de permitir avaliar a aceitação dos produtos frente ao público consumidor [33], neste caso, usuários de hidratantes labiais. No presente trabalho, avaliadores não treinados mas potenciais consumidores de produtos labiais, participaram do desenvolvimento das análises sensoriais, o que pode ser verificado por meio da Figura 3, em que 50% das participantes faziam uso diário, diversas vezes ao dia, 17% das participantes utilizavam diariamente, uma vez ao dia, e 7% faziam uso semanalmente, de hidratantes labiais.

Determinação da intensidade dos atributos apresentados pelas amostras de bálsamo labial foi realizada. Conforme Tabela 3, é possível verificar que não houve diferença estatística significativa entre FT e FB para todos os parâmetros avaliados, sendo que estes apresentaram valores acima de 6,2, ou seja, tendendo a “muito intenso”, com exceção da fragrância, a qual apresentou valores próximos a 5,0, ou seja, “nem muito intenso, nem pouco intenso”, devido a não incorporação de óleos essenciais ou aromas, mantendo o odor característico das formulações. Avaliando os desvios padrões obtidos, os quais estão entre 1,28 e 2,68, é possível verificar uma grande variabilidade na resposta dos avaliadores, a qual ocorre devido à dificuldade presenciada em descrever e discriminar aspectos de formulações que são muito parecidas, como é o caso dos bálsamos labiais [20]. A não significância estatística obtida nesta análise apenas confirma a dificuldade de diferenciação entre FB e FT, o que demonstra que a incorporação dos ativos LEV e SOF não modifica a percepção dos avaliadores e nem resulta em grandes mudanças sensoriais de formulação quando comparado ao controle.

As formulações apresentaram bom índice de aceitação, sendo de 84,71% para FT e de 78,86% para FB, variando entre “gostei” e “gostei muito”. Os resultados obtidos por meio de escala hedônica apresentaram significância estatística, demonstrando que houve preferência pela FT quando comparada à FB, mesmo com as dificuldades

enfrentadas na diferenciação das formulações frente aos atributos. De fato, a escala hedônica permite que os avaliadores escolham as respostas que se adequam com suas preferências e que refletem sua opinião frente aos produtos testados, sem ser necessária a formação de um grupo painalista treinado, auxiliando assim, no desenvolvimento de diversos estudos em que se destina conhecer uma amostra de preferência [26]. Estudo de desenvolvimento de lip balm, conduzido por Azmin, Jaine e Nor [34], empregou escala hedônica para avaliar a espalhabilidade, cor, odor e aceitação geral de diferentes amostras, comparando os resultados com análises instrumentais previamente realizadas. Estudo desenvolvido por Esposito e Kirilov [35] empregou escala hedônica de 9 pontos para avaliar espalhabilidade, dureza, opacidade, efeito *gloss* e de oleosidade de diferentes amostras de batom.

O índice de aceitação é confirmado através da intenção de compra, a qual também apresentou valores elevados, sendo que para FT foi de $4,087 \pm 0,78$ e para FB foi de $3,848 \pm 0,87$, ou seja, variando entre “talvez comprasse, talvez não comprasse” para FB e “provavelmente compraria” para FT. A probabilidade de os consumidores virem a obter comercialmente um produto cosmético é determinada, majoritariamente, pela sensorialidade deste, e quando se refere a produtos labiais, a sensação obtida durante a aplicação [36]. Todos os atributos avaliados neste trabalho apresentaram boa aceitação frente aos avaliadores, o que influencia, conseqüentemente, na intenção de compra positiva das amostras analisadas.

Após um período de 7 dias aplicando diariamente o bálsamo labial FT, teste de autoavaliação foi submetido aos participantes, para ser possível verificar a eficácia do produto a longo prazo [29]. Estes avaliaram se o produto auxiliou na melhora do ressecamento e aspereza labial, e os resultados obtidos foram: 85% das participantes perceberam que a formulação auxiliou na hidratação dos lábios, enquanto 15% descreveram que não observaram este efeito (Figura 5). Este é um resultado promissor, pois demonstra que o atributo da hidratação pode não ser percebido logo em seguida a aplicação, porém, ao longo dos dias, promove efeito no ressecamento e aspereza labiais.

Como é possível verificar neste trabalho, a análise sensorial é uma ferramenta que auxilia no desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos. Diversos estudos sobre produtos labiais, como os realizados por Abidh et al. [36], Kasparaviciene et al. [37], e Rafferty et al. [38], demonstram a importância desta ciência na determinação e na ponderação de propriedades e atributos de cosméticos destinados aos lábios.

CONCLUSÃO

Avaliação de eficácia e análise sensorial foram desenvolvidos neste estudo para formulação de bálsamo labial multifuncional, contendo as moléculas biotecnológicas levana e sofrorolipídios. Estas análises auxiliaram na identificação dos atributos e na aceitação do produto pelos consumidores, além de permitir avaliar o efeito na hidratação e oleosidade labiais, antes e após as aplicações. O bálsamo labial desenvolvido auxiliou na manutenção da hidratação e oleosidade labial já apresentadas pelos participantes, o que foi melhor verificado através da análise sensorial de efeito, realizada ao longo de 7 dias, com 85% de respostas positivas, além de apresentar boa aceitação frente aos avaliadores. Alto índice de intenção de compra também foi confirmado. Desta forma, é possível constatar que o bálsamo labial desenvolvido neste trabalho apresenta potencial de mercado e corresponde a um produto inovador, de características sustentáveis e naturais, com boa aceitação

frente aos consumidores. Além disso, este trabalho pode auxiliar no desenvolvimento de estudos futuros sobre o sensorial de produtos cosméticos e na avaliação da eficácia clínica, através da proposta de uso do aparelho Skin Analyser Digital, o qual é pouco descrito na literatura, porém apresenta elevada sensibilidade e baixo custo.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem à Universidade Estadual de Londrina pelo apoio e infraestrutura, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, à BIOTEC Magistral pela aquisição do insumo Lecigel® e à Pharmadelle – Farmácia de Manipulação pelo apoio material.

CONFLITOS DE INTERESSE: Nenhum conflito de interesse declarado.

REFERÊNCIAS

1. Pop, R. A; Săplăcan, Z.; Alt, M. Social Media Goes Green—The Impact of Social Media on Green Cosmetics Purchase Motivation and Intention. *Information* **2020**, *11*, 447, 1-16, doi:10.3390/info11090447.
2. Amberg, N.; Fogarassy, C. Green Consumer Behaviour in Cosmetic Market. *Resources* **2019**, *8*, 137, 1–19, doi:10.3390/resources8030137.
3. Bianchet, R.T.; Vieira Cubas, A.L.; Machado, M.M.; Siegel Moecke, E.H. Applicability of Bacterial Cellulose in Cosmetics – Bibliometric Review. *Biotechnology Reports* **2020**, *27*, e00502, doi:10.1016/j.btre.2020.e00502.
4. Gomes, C.; Silva, A.C.; Marques, A.C.; Lobo, J.S.; Amaral, M.H. Biotechnology Applied to Cosmetics and Aesthetic Medicines. *Cosmetics* **2020**, *7*, 1–14, doi:10.3390/COSMETICS7020033.
5. Dahmer, D.; Bergamini, T. A.; Bigotto, B. G.; Celligoi, M. A. P. C.; Lonni, A. A. S. G. Cosméticos labiais: Tendência verde e emprego da biotecnologia. In *Farmácia hospitalar e clínica e prescrição farmacêutica*, Edition 1; Pessoa, D. L. R.; Ponta Grossa, Brazil, 2022; pp. 56-70, ISBN 978-65-258-0665-5.
6. De Siqueira, E. C.; Rebouças, J. De S.; Pinheiro, I. O.; Formiga, F. R. Levam-based nanostructured systems: An overview. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *580*, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119242.
7. Da 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*, Edition 1; De Oliveira Junior, J. M. B. (org.); Ponta Grossa: Editora Atena, 2019; pp. 22-35, ISBN 978-85-7247-279-1.
8. Hipólito, A.; Alves da Silva, R.A.; Caretta, T. de O.; Silveira, V.A.I.; Amador, I.R.; Panagio, L.A.; Borsato, D.; Celligoi, M.A.P.C. Evaluation of the Antifungal Activity of Sophorolipids from *Starmerella Bombicola* against Food Spoilage Fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2020**, *29*, 101797, doi:10.1016/j.bcab.2020.101797.
9. Gaur, V.K.; Regar, R.K.; Dhiman, N.; Gautam, K.; Srivastava, J.K.; Patnaik, S.; Kamthan, M.; Manickam, N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresource Technology* **2019**, *285*, 121314, doi: 10.1016/j.biortech.2019.121314.
10. Hipólito, A.; Caretta, T. de O.; Silveira, V.A.I.; Bersaneti, G.T.; Mali, S.; Celligoi, M.A.P.C. Active Biodegradable Cassava Starch Films Containing Sophorolipids Produced by *Starmerella Bombicola* ATCC® 22214™. *Journal of Polymers and the*

- Environment **2021**, *29*, 3199–3209, doi:10.1007/s10924-021-02103-8.
11. Costa, E.M.; Bigotto, B.G.; Dahmer, D.; Queiroz, C.A.U. de; Baldo, C.; Lonni, A.A.S.G.; Celligoi, M.A.P.C. Development of a Multifunctional Lipstick With Sophorolipids Produced By *Starmerella Bombicola*. *International Journal of Health Science* **2022**, *2*, 2–10, doi:10.22533/at.ed.15924422020810.
12. Filipe, G. A.; Bigotto, B. G.; Baldo, C.; Gonçalves, M. C.; Kobayashi, R. K. T.; Lonni, A. A. S. L.; Celligoi, M. A. P. C. Development of a Multifunctional and Self- - Preserving Cosmetic Formulation Using Sophorolipids and Palmarosa Essential Oil against Acne- Causing Bacteria. *Journal of Applied Biotechnology* **2022**, 1–9, doi:10.1111/jam.15659.
13. Bielfeldt, S.; Laing, S.; Sadowski, T.; Gunt, H.; Wilhelm, K.P. Characterization and Validation of an in Vivo Confocal Raman Spectroscopy Led Tri-Method Approach in the Evaluation of the Lip Barrier. *Skin Research and Technology* **2020**, *26*, 390–397, doi:10.1111/srt.12814.
14. Tamura, E.; Ishikawa, J.; Sugata, K.; Tsukahara, K.; Yasumori, H.; Yamamoto, T. Age-Related Differences in the Functional Properties of Lips Compared with Skin. *Skin Research and Technology* **2018**, *24*, 472–478, doi:10.1111/srt.12456.
15. Bielfeldt, S.; Blaak, J.; Laing, S.; Schleißinger, M.; Theiss, C.; Wilhelm, K.P.; Staib, P. Deposition of Plant Lipids after Single Application of a Lip Care Product Determined by Confocal Raman Spectroscopy, Corneometry and Transepidermal Water-Loss. *International Journal of Cosmetic Science* **2019**, *41*, 281–291, doi:10.1111/ics.12533.
16. Gfeller, C.F.; Wanser, R.; Mahalingam, H.; Moore, D.J.; Wang, X.; Lin, C.B.; Shanga, G.; Grove, G.; Rawlings, A. V. A Series of in Vitro and Human Studies of a Novel Lip Cream Formulation for Protecting against Environmental Triggers of Recurrent Herpes Labialis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* **2019**, *12*, 193–208, doi:10.2147/CCID.S179430.
17. Sango, D.; Binder, D. Lip Care Product Formulation Strategies. *Handbook of Formulating Dermal Applications* **2016**, 511–537, doi:10.1002/9781119364221.ch19.
18. Melo, M.O. De; Campos, P.M.M. Técnicas de Biofísica e Imagens Da Pele Na Pesquisa Clínica. *Cosmetics & Toiletries* **2016**, *28*, 36–39.
19. Fossa Shirata, M.M.; Campos, P.M.B.G.M. Importância Do Perfil de Textura e Sensorial No Desenvolvimento de Formulações Cosméticas. *Surgical & Cosmetic Dermatology* **2016**, *8*, 223–230, doi:10.5935/scd1984-8773.201683861.
20. Martins, V.B.; Bordim, J.; Bom, G.A.P.; Carvalho, J.G.D.S.; Parabocz, C.R.B.; Mitterer Daltoé, M.L. Consumer Profiling Techniques for Cosmetic Formulation Definition. *Journal of Sensory Studie*. **2020**, *35*, doi:10.1111/joss.12557.
21. Rosário, M.S. do; Gauto, M.I.R.; Silva, A.C.L.N.; Sales, J.S.; Pereira, F. dos S.; Santos, E.P. dos; Júnior, E.R.; Costa, M.C.P. Study of Stability of Cosmetic Emulsion With Potential of Hydrating Cream for the Treatment of Cutaneous Xerosis Using Babassu Oil (*Orbignya Phalerata Martius*). *Brazilian Journal of Development* **2021**, *7*, 29552–29570, doi:10.34117/bjdv7n3-596.
22. Gunt, H.; Levy, S.B. Efficacy of a Nature-Based Lip Treatment to Repair Dry Damaged Lips: Clinical and Biophysical Assessments. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2020**, *83*, AB168, doi:10.1016/j.jaad.2020.06.762.
23. Isoda, K.; Nakamura, T.; Yoshida, K.; Tamura, E.; Atsuta, N.; Ishida, K.; Takagi, Y.; Mizutani, H. The Efficacy of a Lip Balm Containing Pseudo-Ceramide on the Dry Lips of Sensitive Skin-Conscious Subjects. *Journal of Cosmetic Dermatology* **2018**, *17*, 84–89, doi:10.1111/jocd.12351.
24. Fisher, N.; Fisher, N. An Open Observational Trial of a Novel Peptide and Hyaluronic Acid Based Lip Cosmetic. *Journal Of Plastic And Pathology Dermatology*

2020, *16*, 179–184.

25. Isaac, V.; Chiari, B.G.; Magnani, C.; Corrêa, M.A. Análise Sensorial Como Ferramenta Útil No Desenvolvimento de Cosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2012**, *33*, 479–488.

26. Mosquera Tayupanta, T. de los Á.; Espadero, M.; Mancheno, M.; Peña, S.; Uguña, A.; Álvarez, S.; Vega, M.A. Sensory Analysis of Cosmetic Formulations Made with Essential Oils of *Aristeguietia Glutinosa* (Matico) and *Ocotea Quixos* (Ishpingo). *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* **2018**, *5*, 5–5, doi:10.15171/ijpni.2018.05.

27. Westermann, T.V.A.; Viana, V.R.; Berto Junior, C.; Detoni da Silva, C.B.; Carvalho, E.L.S.; Pupe, C.G. Measurement of Skin Hydration with a Portable Device (SkinUp® Beauty Device) and Comparison with the Corneometer®. *Skin Research and Technology* **2020**, *26*, 571–576, doi:10.1111/srt.12833.

28. Guest, S.; Essick, G.K.; Mehrabyan, A.; Dessirier, J.M.; McGlone, F. Effect of Hydration on the Tactile and Thermal Sensitivity of the Lip. *Physiology & Behavior* **2014**, *123*, 127–135, doi:10.1016/j.physbeh.2013.10.013.

29. Richard, C. Lipstick Adhesion Measurement. *Surface Science and Adhesion in Cosmetics* **2021**, 635–662, doi:10.1002/9781119654926.ch18.

30. Schulz, K.F.; Altman, D. G.; Moher, D. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *British Medical Journal* **2010**, *340*:c332–c332, doi: 10.1136/bmj.c332.

31. Infante, V.H.P.; Leite, M.G.A.; Maia Campos, P.M.B.G. Film-Forming Properties of Topical Formulations for Skin and Hair: In Vivo and In Vitro Studies Using Biophysical and Imaging Techniques. *AAPS PharmSciTech* **2023**, *24*, 1–10, doi:10.1208/s12249-022-02472-w.

32. Barthe, M.; Bavoux, C.; Finot, F.; Mouche, I.; Cuceu-Petrenci, C.; Forreryd, A.; Hansson, A.C.; Johansson, H.; Lemkine, G.F.; Thénot, J.P.; et al. Safety Testing of Cosmetic Products: Overview of Established Methods and New Approach Methodologies (Nams). *Cosmetics* **2021**, *8*, 1–18, doi:10.3390/cosmetics8020050.

33. Böger, B.R.; Lonni, A.A.S.G.; Benassi, M. de T. Characterization and Sensory Evaluation of a Cosmeceutical Formulation for the Eye Area with Roasted Coffee Oil Microcapsules. *Cosmetics* **2023**, *10*, doi:10.3390/cosmetics10010024.

34. Azmin, S.N.H.M.; Jaïne, N.I.M.; Nor, M.S.M. Physicochemical and Sensory Evaluations of Moisturising Lip Balm Using Natural Pigment from *Beta Vulgaris*. *Cogent Engineering* **2020**, *7*, doi:10.1080/23311916.2020.1788297.

35. Esposito, C.L.; Kirilov, P. Preliminary Study of the Potential Photoprotective Effect of Organogel-Based Lipstick Formulations: Texture Analysis, Rheological, Thermal and Sensory Properties. *Preprints* **2021**, doi:10.20944/preprints202105.0661.v1.

36. Abidh, S.; Cuvelier, G.; de Clermont-Gallerande, H.; Navarro, S.; Delarue, J. The Role of Lipid Composition in the Sensory and Physical Properties of Lipsticks. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2019**, *96*, 1143–1152, doi:10.1002/aocs.12271.

37. Kasparaviciene, G.; Savickas, A.; Kalveniene, Z.; Velziene, S.; Kubiliene, L.; Bernatoniene, J. Evaluation of Beeswax Influence on Physical Properties of Lipstick Using Instrumental and Sensory Methods. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2016**, doi:10.1155/2016/3816460.

38. Rafferty, D.W.; Dupin, L.; Zellia, J.; Giovannitti-Jensen, A. Predicting Lipstick Sensory Properties with Laboratory Tests. *International Journal of Cosmetic Science* **2018**, *40*, 451–460, doi:10.1111/ics.12482.

39. Heinrich, U.; Koop, U.; Leneveu-Duchemin, M.-C.; Osterrieder, K.; Bielfeldt, S.; Chkarnat, C.; Degwert, J.; Hantschel, D.; Jaspers, S.; Nissen, H.-P. Multicentre

comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). *International Journal Of Cosmetic Science* **2003**, 25, 45-53.

CONCLUSÃO

Formulações de hidratante labial multifuncional contendo levana de *Bacillus subtilis natto*, soforolipídio de *Stammerella bombicola* e óleo essencial de *Citrus paradisi* foram desenvolvidas neste trabalho. A produção dos ativos por fermentação foi de 42,93 g·L⁻¹ para a levana e de 87,10 g·L⁻¹ para os soforolipídios. Os SOFs apresentaram CIM entre 0,006-0,048 mg·mL⁻¹ e o OCP entre 5,22-41,75 mg·mL⁻¹ para todos os microrganismos testados. A combinação destes por apresentou resposta aditiva e redução da CIM individual dos ativos. A resposta antioxidante dos ativos foi baixa para o OCP e mediana para a LEV e o SOF (acima de 30%). As oito formulações se apresentaram estáveis frente as caracterizações farmacotécnicas desenvolvidas, o que foi confirmado pelo estudo de estabilidade preliminar. As formulações também apresentaram bom potencial antioxidante frente ao radical DPPH. Através da análise estatística de Superfície de Resposta, foi possível selecionar a formulação otimizada do projeto, com base nos resultados de espalhabilidade, retenção de umidade e antioxidante obtidos, a qual apresenta concentrações de 0,4% LEV e 0,8% SOF em sua composição. Esta formulação foi avaliada *in vivo*, por meio de análise não-invasiva, e auxiliou na manutenção dos níveis de hidratação e oleosidade labiais já apresentados pelos participantes. Além disso, bons índices de aceitação e de intenção de compra foram obtidos, o que demonstra que o hidratante labial desenvolvido apresenta promissor potencial no mercado cosmético, além de ser uma formulação inovadora, sustentável e com emprego de ativos naturais, de acordo com as exigências do público consumidor.

REFERÊNCIAS

ABELAN, U. S.; DE OLIVEIRA, A. C.; CACOCCI, É. S. P.; et al. Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, n. 4, p. 1407–1418, 2022.

ABIDH, S.; CUVELIER, G.; DE CLERMONT-GALLERANDE, H.; NAVARRO, S.; DELARUE, J. The Role of Lipid Composition in the Sensory and Physical Properties of Lipsticks. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 96, p. 1143–1152, 2019.

ABIHPEC. **A Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**, 2023. Disponível em: <https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2023/01/Panorama_do_Setor_Atualizado_15.02.23.pdf>.

ADU, S. A.; NAUGHTON, P. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1–21, 2020.

ALKHARS, N.; ZENG, Y.; ALOMEIR, N.; et al. Oral Candida Predicts Streptococcus mutans Emergence in Underserved US Infants. **Journal of Dental Research**, v. 101, n. 1, p. 54–62, 2022.

AMBERG, N.; FOGARASSY, C. Green Consumer Behaviour in Cosmetic Market. **Resources**, v.8, n.137, p.1–19, 2019. doi:10.3390/resources8030137.

AMIN, D.; SATISHCHANDRAN, S.; DREW, S.; ABRAMOWICZ, S. Diagnosis and Treatment of Lip Infections. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 79, n. 1, p. 133–140, 2021. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.06.025>>.

ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FAN, X.; OLANYA, M. Antimicrobial Potential of Sophorolipids for Anti-Acne, Anti-Dental Caries, Hide Preservation, and Food Safety Applications. **ACS Symposium Series**, v. 1287, p. 193–208, 2018.

AZMIN, S.N.H.M.; JAINE, N.I.M.; NOR, M.S.M. Physicochemical and Sensory Evaluations of Moisturising Lip Balm Using Natural Pigment from Beta Vulgaris. **Cogent Engineering**, v.7, 2020. doi:10.1080/23311916.2020.1788297.

BAJAJ, V. K.; ANNAPURE, U. S. Castor Oil as Secondary Carbon Source for Production of Sophorolipids Using Starmerella Bombicola NRRLY-17069. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 3, p. 315–323, 2015.

BARTHE, M.; BAVOUX, C.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; CUCEU-PETRENCI, C.; FORRERYD, A.; HANSSON, A.C.; JOHANSSON, H.; LEMKINE, G.F.; THÉNOT, J.P.; et al. Safety Testing of Cosmetic Products: Overview of Established Methods and New Approach Methodologies (Nams). **Cosmetics**, v.8, p.1–18, 2021. doi:10.3390/cosmetics8020050.

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, 2018.

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.

BIANCHET, R. T.; VIEIRA CUBAS, A. L.; MACHADO, M. M.; SIEGEL MOECKE, E. H. Applicability of bacterial cellulose in cosmetics – bibliometric review. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00502, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00502>>.

BIELFELDT, S.; BLAAK, J.; LAING, S.; et al. Deposition of plant lipids after single application of a lip care product determined by confocal raman spectroscopy, corneometry and transepidermal water-loss. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 41, n. 3, p. 281–291, 2019a.

BIELFELDT, S.; LAING, S.; SADOWSKI, T.; GUNT, H.; WILHELM, K. P. Characterization and validation of an in vivo confocal Raman spectroscopy led tri-method approach in the evaluation of the lip barrier. **Skin Research and Technology**, v. 26, n. 3, p. 390–397, 2019b.

BÖGER, B.R.; LONNI, A.A.S.G.; BENASSI, M. DE T. Characterization and Sensory Evaluation of a Cosmeceutical Formulation for the Eye Area with Roasted Coffee Oil Microcapsules. **Cosmetics**, v.10, 2023. doi:10.3390/cosmetics10010024.

BOUALLEGUE, A.; CASILLO, A.; CHAARI, F.; et al. Levan from a new isolated *Bacillus subtilis* AF17: Purification, structural analysis and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 316–324, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.108>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. v. 1, 52 p. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2008.

BUDIASIH, S.; MASYITAH, I.; JIYAUDDIN, K.; et al. Formulation and Characterization of Cosmetic Serum Containing Argan Oil as Moisturizing Agent. **Science and Technology Publications**, p. 297–304, 2019.

CALAZANS, G., LIMA, C., FRANÇA, F. P., LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245–247, 2000.

CARETTA, T.; I SILVEIRA, V. A.; ANDRADE, G.; MACEDO, F.; P C CELLIGOI, M. A. Antimicrobial activity of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* against

phytopathogens from cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 3, p. 1245–1254, 2022.

CARVALHO, I. T.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 2, p. 109–119, 2016.

CHO, W. Y.; NG, J. F.; YAP, W. H. Sophorolipids — Bio-Based Antimicrobial Formulating Agents. **Molecules**, p. 1–24, 2022.

CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. **CLSI standard M07-A10**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.

COSTA, E. M.; BIGOTTO, B. G.; DAHMER, D.; et al. Development of a Multifunctional Lipstick With Sophorolipids Produced By *Starmerella Bombicola*. **International Journal of Health Science**, v. 2, n. 44, p. 2–10, 2022.

CUNHA, C.; RIBEIRO, H. M.; RODRIGUES, M.; ARAUJO, A. R. T. S. Essential oils used in dermocosmetics: Review about its biological activities. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 513–529, 2022.

DA FONTOURA, I. C. C.; SAIKAWA, G. I. A.; SILVEIRA, V. A. I.; et al. Antibacterial activity of sophorolipids from *Candida bombicola* against human pathogens. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. 1–10, 2020.

DA 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: DE OLIVEIRA JUNIOR, J. M. B. (org). **A produção do conhecimento nas ciências biológicas**. Ponta Grossa: Editora Atena, 2019. cap 4, p. 22-35.

DA 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**; De Oliveira Junior, J. M. B. (org).; Ponta Grossa: Editora Atena, 2019; pp. 22-35, ISBN 978-85-7247-279-1.

DAHMER, D.; BERGAMINI, T. A.; BIGOTTO, B. G.; CELLIGOI, M. A. P. C.; LONNI, A. A. S. G. Cosméticos labiais: tendência verde e o emprego da biotecnologia. In: PESSOA, D. L. R. **Farmácia Hospitalar e Clínica e Prescrição Farmacêutica**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2022, p. 56-70.

DE MELO, F. C. B. C.; ZAIA, C. T. B. V.; CELLIGOI, M. A. P. C. Levan from *Bacillus subtilis* Natto: Its effects in normal and in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1613–1619, 2012.

DE SIQUEIRA, E. C.; REBOUÇAS, J. DE S.; PINHEIRO, I. O.; FORMIGA, F. R. Levan-based nanostructured systems: An overview. **Int J Pharm**, v. 580, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119242>.

DENG, W.; LIU, K.; CAO, S.; et al. and Antiproliferative Properties of Grapefruit.

Molecules, p. 1-12, 2020.

DENKOVA-KOSTOVA, R.; TENEVA, D.; TOMOVA, T.; et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 76, n. 5, p. 175–185, 2021.

DOS SANTOS, L. F.; BAZANI CABRAL DE MELO, F. C.; MARTINS PAIVA, W. J.; et al. Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* NATTO. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 4, p. 8413–8422, 2013.

DOS SANTOS; L. F.; CAVALCANTI, O. A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Produção e aplicação de exopolissacarídeos: um enfoque na levana e os potenciais dispositivos de liberação modificada de fármacos. **Revista Saúde e Pesquisa**, [S.I.], v. 4, n. 2, p. 254–270, 2011.

DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Biological activities and safety of citrus spp. Essential oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1–25, 2018.

ESPOSITO, C.L.; KIRILOV, P. Preliminary Study of the Potential Photoprotective Effect of Organogel-Based Lipstick Formulations: Texture Analysis, Rheological, Thermal and Sensory Properties. **Preprints**, 2021. doi:10.20944/preprints202105.0661.v1.

FILIFE, G. A.; BIGOTTO, B. G.; BALDO, C.; et al. Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil against acne-causing bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–9, 2022.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 4, p. 221–225, 2005.

FISHER, N.; FISHER, N. An Open Observational Trial of a Novel Peptide and Hyaluronic Acid Based Lip Cosmetic. **Journal Of Plastic And Pathology Dermatology**, v.16, p.179–184, 2020.

FOSSA SHIRATA, M.M.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Importância Do Perfil de Textura e Sensorial No Desenvolvimento de Formulações Cosméticas. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v.8, p.223–230, 2016. doi:10.5935/scd1984-8773.201683861.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 95–100, 2011.

GAUR, V. K.; REGAR, R. K.; DHIMAN, N.; GAUTAM, K.; SRIVASTAVA, J. K.; PATNAIK, S.; KAMTHAN, M.; MANICKAM, N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: application as food emulsifier and antibacterial agent. **Bioresour Technol** 285:121314, 2019.

GFELLER, C. F.; WANSER, R.; MAHALINGAM, H.; et al. A series of in vitro and human studies of a novel lip cream formulation for protecting against environmental triggers of recurrent herpes labialis. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 12, p. 193–208, 2019.

GHASEMI, S.; AKBARI, Z. Lip Augmentation. **Dental Clinics of North America**, v. 66, n. 3, p. 431–442, 2022.

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. **Int J Biol Macromol**. v.121, p.142-151, 2019.

GOMES, C.; SILVA, A. C.; MARQUES, A. C.; LOBO, J. S.; AMARAL, M. H. Biotechnology applied to cosmetics and aesthetic medicines. **Cosmetics**, v. 7, n. 2, p. 1–14, 2020.

GORE, E.; PICARD, C.; SAVARY, G. Spreading behavior of cosmetic emulsions: Impact of the oil phase. **Biotribology**, v. 16, n. May, p. 17–24, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotri.2018.09.003>>.

GUEST, S.; ESSICK, G. K.; MEHRABYAN, A.; DESSIRIER, J. M.; MCGLONE, F. Effect of hydration on the tactile and thermal sensitivity of the lip. **Physiology and Behavior**, v. 123, p. 127–135, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.013>>.

GUNT, H.; LEVY, S.B. Efficacy of a Nature-Based Lip Treatment to Repair Dry Damaged Lips: Clinical and Biophysical Assessments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.83, AB168, 2020. doi:10.1016/j.jaad.2020.06.762.

GUPTA, P. L.; RAJPUT, M.; OZA, T.; TRIVEDI, U.; SANGHVI, G. Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 4, p. 267–278, 2019.

GUZMÁN, E.; LUCIA, A. Essential oils and their individual components in cosmetic products. **Cosmetics**, v. 8, n. 4, p. 1–28, 2021.

HEINRICH, U.; KOOP, U.; LENEVEU-DUCHEMIN, M.-C.; OSTERRIEDER, K.; BIELFELDT, S.; CHKARNAT, C.; DEGWERT, J.; HANTSCHHEL, D.; JASPERS, S.; NISSEN, H.-P. Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological- and product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). **International Journal Of Cosmetic Science**, [S.L.], v. 25, n. 1-2, p. 45-53, abr. 2003.

HELENAS, J. K.; BERSANETI, G. T.; SILVA, R. T. DA; et al. Development of Facial Cosmetic Formulations Using Microbial Levan in Association with Plant-Derived Compounds Using Simple Lattice Design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, p. 1–11, 2023.

HERTADI, R.; UMRIANI PERMATASARI, N.; RATNANINGSIH, E. Box-Wilson Design

for Optimization of in vitro Levan Production and Levan Application as Antioxidant and Antibacterial Agents. **Iran Biomed J.** 2021; 1,25: 202-12.

HIPÓLITO, A.; ALVES DA SILVA, R. A.; CARETTA, T. DE O.; et al. Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, n. June, p. 101797, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101797>>.

HIPÓLITO, A.; CARETTA, T. DE O.; SILVEIRA, V.A.I.; BERSANETI, G.T.; MALI, S.; CELLIGOI, M.A.P.C. Active Biodegradable Cassava Starch Films Containing Sophorolipids Produced by *Starmerella Bombicola* ATCC® 22214™. **Journal of Polymers and the Environment**, v.29, p.3199–3209, 2021.doi:10.1007/s10924-021-02103-8.

INFANTE, V.H.P.; LEITE, M.G.A.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Film-Forming Properties of Topical Formulations for Skin and Hair: In Vivo and In Vitro Studies Using Biophysical and Imaging Techniques. **AAPS PharmSciTech**, v.24, p.1–10, 2023. doi:10.1208/s12249-022-02472-w.

ISAAC, V.; CHIARI, B.G.; MAGNANI, C.; CORRÊA, M.A. Análise Sensorial Como Ferramenta Útil No Desenvolvimento de Cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, p.479–488, 2012.

ISODA, K.; NAKAMURA, T.; YOSHIDA, K.; et al. The efficacy of a lip balm containing pseudo-ceramide on the dry lips of sensitive skin-conscious subjects. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 1, p. 84–89, 2018.

JUNG, I. H.; KIM, J. H.; YOO, Y. J.; et al. A pilot study of occupational exposure to pathogenic microorganisms through lip cosmetics among dental hygienists. **Journal of Occupational Health**, v. 61, n. 4, p. 297–304, 2019.

KACZMARCZYK, D.; STRUB, D. J.; POLOWY, A.; WILK, K. A.; LOCHYŃSKI, S. Selected Essential Oils in Cosmetic Emulsions : Process Oriented Stability Studies and Antimicrobial Activity. **Nat. Volatiles & Essent. Oils**, v. 2, n. 4, p. 27–39, 2015.

KAR, M.; MULUK, N. B.; BAFAQEEH, S. A.; CINGI, C. È Possibile Definire Le Labbra Ideali? **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 38, n. 1, p. 67–72, 2018.

KASPARAVICIENE, G.; SAVICKAS, A.; KALVENIENE, Z.; VELZIENE, S.; KUBILIENE, L.; BERNATONIENE, J. Evaluation of Beeswax Influence on Physical Properties of Lipstick Using Instrumental and Sensory Methods. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016. doi:10.1155/2016/3816460.

KHAN, B. A.; AKHTAR, N.; KHAN, H. M. S.; et al. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 25, p. 2715–2725, 2011.

KIM, H.; LEE, M.; PARK, S. Y.; et al. Age-related changes in lip morphological and physiological characteristics in Korean women. **Skin Research and Technology**, v. 25, n. 3, p. 277–282, 2018.

KIM, K. H.; CHUNG, C. B.; KIM, Y. H.; et al. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Cosmetic Science**, v. 56, n. 6, p. 395–406, 2005.

KIM, S. J.; CHUNG, B. H. Antioxidant activity of levan coated cerium oxide nanoparticles. **Carbohydr Polym.** 2016 Oct 5;150:400-7. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.021. Epub 2016 May 17. PMID: 27312651.

KIM, S.H. Analysis of Correlation among Oral Environment, Oral Myofunction, and Oral Microorganisms. **Journal of Dental Hygiene Science**, v. 19, n. 2, p. 96–106, 2019.

KNORST, M. T. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Compositae - marcela, 1991. 228 f. **Dissertação** (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

KUMARI, A.; KUMARI, S.; PRASAD, G. S.; PINNAKA, A. K. Production of Sophorolipid Biosurfactant by Insect Derived Novel Yeast *Metschnikowia churdharensis* f.a., sp. nov., and Its Antifungal Activity Against Plant and Human Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. June, p. 1–13, 2021.

LIN, C. W.; YU, C. W.; WU, S. C.; YIH, K. H. DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 17, n. 5, 2009.

MAENG, Y.; KIM, K. T.; ZHOU, X.; et al. A novel microbial technique for producing high-quality sophorolipids from horse oil suitable for cosmetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 917–929, 2018.

MARTINS, V.B.; BORDIM, J.; BOM, G.A.P.; CARVALHO, J.G.D.S.; PARABOCZ, C.R.B.; MITTERER DALTOÉ, M.L. Consumer Profiling Techniques for Cosmetic Formulation Definition. **Journal of Sensory Studies**, v.35, 2020. doi:10.1111/joss.12557.

MELO, M.O. DE; CAMPOS, P.M.M. Técnicas de Biofísica e Imagens Da Pele Na Pesquisa Clínica. **Cosmetics & Toiletries**, v.28, p.36–39, 2016.

MINUCELLI, T., RIBEIRO - VIANA, R. M., BORSATO, D., ANDRADE, G., CELY, M. V. T., DE OLIVEIRA, M. R., BALDO, C., CELLIGOI, M. A. P. C. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. **Waste Biomass Valori.** v. 8, p. 743 – 753, 2017.

MOHARRAM, H.; RAY, J.; OZBAS, S.; JULIANI, H.; SIMON, J. Shea butter: Chemistry, quality, and new market potentials. **ACS Symposium Series**, v. 925, n. June 2019, p. 326–340, 2006.

MOSQUERA TAYUPANTA, T. DE LOS Á.; ESPADERO, M.; MANCHENO, M.; et al. Sensory analysis of cosmetic formulations made with essential oils of *Aristeguetia glutinosa* (matico) and *Ocotea quixos* (ishpingo). **International Journal of**

Phytocosmetics and Natural Ingredients, v. 5, n. 1, p. 5–5, 2018.

NIAMTU, J. Cosmetic Lip Surgery. *In*: NIAMTU, J. **Cosmetic Facial Surgery**. 2. ed. Elsevier Inc., 2018. p. 639-655.

OKUNOWO, W. O.; OYEDEJI, O.; AFOLABI, L. O.; MATANMI, E. Essential Oil of Grape Fruit (<i>Citrus paradisi&/i>) Peels and Its Antimicrobial Activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 04, n. 07, p. 1–9, 2013.

OLIVEIRA, S.; PEDRIALI MORAES, C. A. Desenvolvimento de uma emulsão o/a associada ao óleo essencial de gerânio (*Pelargonium graveolens*) e ao óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 3, p. 127, 2019.

OU, M. C.; LIU, Y. H.; SUN, Y. W.; CHAN, C. F. The Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Cold-Pressed and Distilled Essential Oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

PEI, F.; MA, Y.; CHEN, X.; LIU, H. Purification and structural characterization and antioxidant activity of levan from *Bacillus megaterium* PFY-147. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1181–1188, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.140>>.

POP, R. A; SĂPLĂCAN, Z.; ALT, M. Social Media Goes Green—The Impact of Social Media on Green Cosmetics Purchase Motivation and Intention. **Information**, v.11, n.447, p.1-16, 2020. doi:10.3390/info11090447.

RAFFERTY, D.W.; DUPIN, L.; ZELLIA, J.; GIOVANNITTI-JENSEN, A. Predicting Lipstick Sensory Properties with Laboratory Tests. **International Journal of Cosmetic Science**, v.40, p.451–460, 2018. doi:10.1111/ics.12482.

RAGAB ,T. I. M.; MALEK, R. A.; ELSEHEMY, I. A.; FARAG, M. M. S.; SALAMA, B. M.; ABD EL-BASEER, M. A.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; EL ENSHASY, H. A.; ESAWY, M. A. Scaling up of levan yield in *Bacillus subtilis* M and cytotoxicity study on levan and its derivatives. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V.127, n.6, p.655-662, 2019.

RAVERA, F.; DZIZA, K.; SANTINI, E.; CRISTOFOLINI, L.; LIGGIERI, L. Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102344, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102344>>.

RICHARD, C. Lipstick Adhesion Measurement. *Surface Science and Adhesion in Cosmetics*, p.635–662, 2021. doi:10.1002/9781119654926.ch18.

ROSÁRIO, M.S. DO; GAUTO, M.I.R.; SILVA, A.C.L.N.; SALES, J.S.; PEREIRA, F. DOS S.; SANTOS, E.P. DOS; JÚNIOR, E.R.; COSTA, M.C.P. Study of Stability of Cosmetic Emulsion With Potential of Hydrating Cream for the Treatment of Cutaneous Xerosis Using Babassu Oil (*Orbignya Phalerata* Martius). **Brazilian Journal of**

Development, v.7, p.29552–29570, 2021. doi:10.34117/bjdv7n3-596.

SAJNA, K. V.; GOTTUMUKKALA, L. D.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. White Biotechnology in Cosmetics. In: PANDEY, A.; HÖFER, R.; TAHERZADEH, M., et al. (org). **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**. Elsevier, 2015. cap. 18, p. 607-652.

SANGO, D.; BINDER, D. Lip Care Product Formulation Strategies. *In*: DAYAN, N. **Handbook of Formulating Dermal Applications**, 2016, p. 511–537.

SARKIC, A.; STAPPEN, I. Essential oils and their single compounds in cosmetics-a critical review. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, p. 1–21, 2018.

SCHULZ, K.F.; ALTMAN, D. G.; MOHER, D. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **British Medical Journal**, 340:c332–c332, 2010. doi: 10.1136/bmj.c332.

SHARMEEN, J. B.; MAHOMOODALLY, F. M.; ZENGIN, G.; MAGGI, F. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, 2021.

SILVA, R. T.; BERSANETI, G. T.; CHIDEROLI, R. T.; et al. Propriedades biológicas da levana de *Bacillus subtilis natto* e do óleo essencial de canela para aplicação em formulações cosmecêuticas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 23009–23024, 2020.

SILVEIRA, V. A. I.; NISHIO, E. K.; FREITAS, C. A. U. Q.; et al. Production and antimicrobial activity of sophorolipid against *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* and their additive interaction with lactic acid. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, n. August, 2019.

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. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003>>.

SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; SUNDHAR REDDY, C. H. S. S.; et al. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 8–16, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.079>>.

TAMURA, E.; ISHIKAWA, J.; NAOE, A.; YAMAMOTO, T. The roughness of lip skin is related to the ceramide profile in the stratum corneum. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 6, p. 615–621, 2016.

TAMURA, E.; ISHIKAWA, J.; SUGATA, K.; et al. Age-related differences in the functional properties of lips compared with skin. **Skin Research and Technology**, v. 24, n. 3, p. 472–478, 2018.

TAMURA, E.; ISHIKAWA, J.; YASUDA, Y.; YAMAMOTO, T. The efficacy of synthetic

pseudo-ceramide for dry and rough lips. **International Journal of Cosmetic Science**, v.43, n.2, p.158–164, 2021.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. Essential oil safety. 2 ed. © 2014, Elsevier Ltd. All rights reserved., 2014.

UYSAL, B.; SOZMEN, F.; AKTAS, O.; OKSAL, B. S.; KOSE, E. O. Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi*. L) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 7, p. 1455–1461, 2011.

VARVARESOU, A.; IAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 214–223, 2015.

VASEK, O. M.; CÁCERES, L. M.; CHAMORRO, E. R.; VELASCO, G. A. Antibacterial activity of *Citrus paradisi* essential oil. **Journal of Natural Products**, v. 8, p. 16–26, 2015. Disponível em: <www.JournalofNaturalProducts.Com>.

VENKATARAMANI, D.; TSULAIA, A.; AMIN, S. Fundamentals and applications of particle stabilized emulsions in cosmetic formulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 102234, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102234>>.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PEREZ-ÁLVAREZ, J. Antibacterial activity of lemon. **Journal of Food Safety**, v. 28, n. 2008, p. 567–576, 2008.

WANG, Y.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Levan-chitosan blend films: Preparation, structural, physical properties and application in pork packaging. **Int J Biol Macromol**. 2022 Sep 30;217:624-632. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.049. Epub 2022 Jul 11. PMID: 35835307.

WESTERMANN, T.V.A.; VIANA, V.R.; BERTO JUNIOR, C.; DETONI DA SILVA, C.B.; CARVALHO, E.L.S.; PUPE, C.G. Measurement of Skin Hydration with a Portable Device (SkinUp® Beauty Device) and Comparison with the Corneometer®. **Skin Research and Technology**, v.26, p.571–576, 2020. doi:10.1111/srt.12833.

WU, F. C.; CHOU, S. Z.; SHIH, I. L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. **J Taiwan Inst Chem Eng**, v. 44, n. 6, p. 846–853, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2013.03.009>.

YANG, S. A.; JEON, S. K.; LEE, E. J.; SHIM, C. H.; LEE, I. S. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. **Natural Product Research**, v. 24, n. 2, p. 140–151, 2010.

YEBOAH, A.; YING, S.; LU, J.; et al. Castor oil (*Ricinus communis*): A review on the chemical composition and physicochemical properties. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 41, n. December, p. 399–413, 2021.

YEO, J.; SHAHIDI, F. Critical Re-Evaluation of DPPH assay: Presence of Pigments Affects the Results. **J Agric Food Chem.** 2019 Jul 3;67(26):7526-7529. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02462. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31184887.

ZERHUSEN, C.; BOLLMANN, T.; GÖDDERZ, A.; FLEISCHER, P.; GLÜSEN, B.; SCHÖRKEN, U. Microbial Synthesis of Nonionic Long-Chain Sophorolipid Emulsifiers Obtained from Fatty Alcohol and Mixed Lipid Feeding. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** 2020, 122, 1900110.

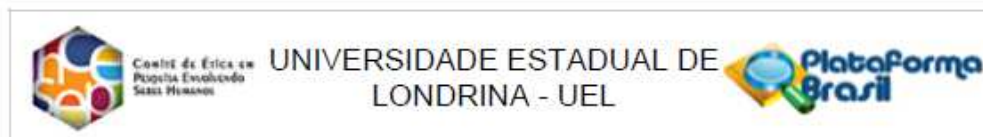
ZHANG, T.; LI, R.; QIAN, H.; MU, W.; MIAO, M.; JIANG, B. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. **Carbohydr Polym**, v. 101, n. 1, p. 975–981, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.045>.

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.

ZHU, Q.; PAN, Y.; JIA, X.; et al. Review on the Stability Mechanism and Application of Water-in-Oil Emulsions Encapsulating Various Additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 6, p. 1660–1675, 2019.

ANEXOS

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-UEL) (1/9)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE HIDRATANTE E REPARADOR LABIAL CONTENDO ATIVO BIOTECNOLÓGICO

Pesquisador: DEBORA DAHMER

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58720522.9.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.474.738

Apresentação do Projeto:

Segundo a pesquisadora, "O consumo de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos alavancou o mercado brasileiro nos últimos anos. Com um público consumidor cada vez mais exigente, a demanda por ingredientes multifuncionais na indústria cosmética influencia a busca de novas matérias-primas inovadoras que possam atuar possibilitando benefícios adicionais nas formulações. Molécula biotecnológica, como a levana, representa grande interesse no ramo da cosmetologia devido às inúmeras funções de cuidados com a pele, além disso, oferece biocompatibilidade, natureza ecológica e atividade versátil, sendo potencialmente inovadora e capaz de substituir os compostos sintéticos. O perfil determinante de qualidade de um produto cosmético engloba a sua eficácia e segurança no uso, a estabilidade da formulação e o aspecto sensorial. Com a finalidade de avaliar efeitos de formulação, o estudo biofísico da pele tem sido amplamente empregado, pois permite analisar as características cutâneas in vivo por meio de técnicas não invasivas, rápidas e seguras. Além da comprovação da eficácia clínica, é imprescindível que formulações cosméticas apresentem um bom sensorial, o que implica no bem-estar do consumidor, na aceitação do produto e no seu uso a longo prazo. No presente trabalho, o parâmetro biofísico de hidratação cutânea será avaliado, de modo não invasivo, para uma formulação de hidratante labial emulsiva, semissólida, e de uso tópico, contendo levana de *Bacillus subtilis natto*. O perfil sensorial da formulação e seu índice de aceitação perante o consumidor também serão avaliados por meio de análise sensorial. Trata-se de um estudo do tipo

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 5.474.738

ensaio A

clínico randomizado e cego, com população formada por indivíduos adultos e saudáveis, do sexo feminino, com idades entre 18 e 40 anos. O tamanho da amostra será de 60 participantes. Os voluntários fornecerão seu consentimento livre e esclarecido por escrito (modelo em anexo), após informação para participação voluntária no estudo, e sobre os objetivos e metodologias a serem empregadas neste. Os dados obtidos serão avaliados de modo descritivo e os testes estatísticos adequados serão empregados. Serão respeitados os aspectos éticos conforme determina a Resolução CNS 466/2012."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar em pacientes do sexo feminino a eficácia *in vivo* de um hidratante labial multifuncional contendo levana de "Bacillus subtilis natto" quanto à hidratação dos lábios, bem como, proceder com análise sensorial e de intenção de compra deste.

Objetivo Secundário:

Otimizar por meio de planejamento simplex-centróide a obtenção de formulações do hidratante labial; Caracterizar as formulações quanto aos aspectos farmacotécnicos; Avaliar a eficácia clínica *in vivo* do hidratante labial multifuncional teste quanto à hidratação e em comparação a uma amostra convencional comercial; Realizar análise sensorial para os produtos desenvolvidos através de aplicação de questionário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

• Riscos: Quanto aos riscos, serão tomados todos os cuidados necessários para prevenir quaisquer danos ou prejuízos que possam ocorrer aos voluntários durante a realização do estudo. A biomolécula (levana) incorporada ao cosmético é de origem microbiana, sem aditivos animais e reconhecida como segura para a saúde humana e animal. No entanto, mesmo se tratando de uma análise não invasiva, segura e rápida, não se pode descartar a possibilidade de que algum voluntário possa vir a apresentar hipersensibilidade a algum componente da formulação, ou algum tipo de reação adversa ao dermocosmético, como sintomas de irritação ou dermatite de contato. Caso haja a necessidade de assistência médica, o voluntário será acompanhado por um membro da equipe para atendimento médico, sendo que qualquer despesa referente à assistência médica será de

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

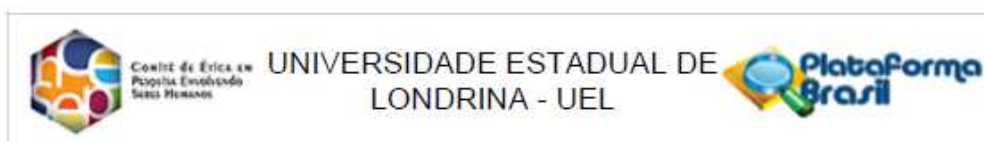
UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.474.738

responsabilidade do grupo de pesquisa, sem prejuízo financeiro aos voluntários.

• **Benefícios:** Não haverá benefícios diretos aos voluntários e vale ressaltar que estes não pagarão ou serão remunerados por sua participação na pesquisa. No entanto, se espera que os resultados deste estudo contribuam para o desenvolvimento de um produto cosmético que promova melhora nos níveis de hidratação labial, evitando sinais de ressecamento e aspereza dos lábios. Além disso, o presente trabalho permitirá uma colaboração frutífera entre a equipe de pesquisa, avanço científico na área da cosmetologia pela divulgação dos resultados por meio de artigos científicos e participação em eventos, e a promoção do desenvolvimento tecnológico com inovação através do pedido de depósito de patente, incentivando a interação universidade empresa.

Análise de Risco x Benefício A pesquisadora descreve adequadamente os riscos, mas apesar de esperar que haja uma melhor hidratação dos lábios a pesquisadora afirma que não haverá benefícios. Considera-se aceitável a relação risco - benefício.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Hipótese depreendida do texto apresentado pela pesquisadora seria de que o Produto testado teria a mesma ação de produto já comercializado. A pesquisadora, assim descreve as hipótese do estudo "Os lábios correspondem a uma estrutura que se apresenta como uma extensão da mucosa oral para a região externa da face, estando constantemente susceptíveis a influências do ambiente externo (BIELFELDT et al., 2019). Devido a diferente histologia em comparação às demais regiões faciais e a rápida renovação celular apresentada pelo estrato córneo (EC), os lábios comumente sofrem alterações em seu estado de hidratação, resultando em ressecamento e aspereza (LÓPEZ-JORNET; CAMACHO-ALONSO; RODRÍGUEZ-ESPIN, 2010; GUEST et al, 2013; TAMURA et al., 2016). Com o intuito de auxiliar na manutenção do equilíbrio hídrico apresentado pelo EC, o emprego de produtos cosméticos labiais é uma excelente alternativa (BIELFELDT et al., 2019). As indústrias cosmética e farmacêutica cada vez mais prezam pelo desenvolvimento de produtos com matérias-primas mais naturais e que confirmam proventos adicionais as formulações (DA SILVA et al., 2019). A levana, uma molécula bioativa, segura aos seres humanos, apresenta diversas potencialidades farmacológicas descritas na literatura, como sua capacidade hidratante, a qual é similar à verificada pelo ácido hialurônico (AH), bem como, sua capacidade de proliferação de fibroblastos humanos e queratinócitos (KIM, et al., 2005). O desenvolvimento de um produto cosmético labial em associação com a levana, o qual pode contribuir na manutenção dos níveis de

Endereço: LABESC - Sala 14	
Bairro: Campus Universitário	CEP: 86.057-970
UF: PR	Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 5.474.738

hidratação do EC, é proposto neste trabalho. A avaliação da eficácia in vivo, por método de bioimpedância, em conjunto com a caracterização sensorial deste produto, podem auxiliar nesta verificação e na criação de um produto inovador e tecnológico."

Os seguintes métodos e análises serão empregados para testar esta hipótese:

Metodologia Proposta: O estudo será desenvolvido na Clínica Talita Oliveira de Estética Avançada, constituindo o trabalho de uma dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina. Trata-se de um estudo experimental, do tipo ensaio clínico randomizado e cego. Inicialmente, os voluntários serão submetidos a avaliação para verificar se não apresentam nenhuma espécie de irritação ou distúrbio nos locais de aplicação. Em seguida, serão divididos aleatoriamente em 3 grupos de tratamento: G1: constituído de 20 indivíduos que utilizarão exclusivamente a formulação do estudo (hidratante labial contendo levana); G2: constituído de 20 indivíduos que utilizarão exclusivamente a formulação controle do estudo (hidratante labial sem levana e ativos); G3: constituído de 20 indivíduos que utilizarão exclusivamente a formulação comercial já comercializada em mercado. Os participantes irão proceder com a aplicação de uma quantidade fixa das formulações labiais (cerca de 0,1 g) diretamente nos lábios, previamente higienizados, duas vezes ao dia (manhã e noite), durante um período de 14 dias. Estes receberão uma planilha para controle de auto aplicação diária dos hidratantes. A coleta das medidas ocorrerá no tempo zero (basal) e 14 dias após o uso das formulações, bem como, o registro de Foto documentação. A região selecionada para as medidas será o lábio inferior. -O aparelho empregado para as medições será o Analisador de Pele Digital Facial Skin Analyser, o qual é baseado no método da impedância bioelétrica (bioimpedância), que consiste na passagem de uma corrente elétrica de baixa intensidade (500 a 800 Å) e de alta frequência (50 kHz) pela região labial (que se apresenta como condutora), gerando assim, os resultados da análise. Posteriormente ao estudo de hidratação, análise sensorial, que ocorrerá por meio dos testes afetivos de aceitação por escala hedônica de sete pontos e intenção de compra, escala de intensidade e avaliação do efeito do hidratante labial, será realizada com os mesmos voluntários do teste anterior. Esta etapa do estudo também será realizada na Clínica Talita Oliveira de Estética Avançada, com supervisão da equipe do projeto. Cada voluntário irá receber quatro amostras de hidratante labial, previamente codificadas, e uma ficha contendo as instruções dos testes e as escalas para avaliação. No teste de escala de intensidade, os atributos avaliados serão: espalhabilidade/facilidade para espalhar, absorção, hidratação, frescor, força de aderência/pegajosidade, resíduo/filme branco, fragrância e formação de filme aveludado. No teste de aceitação, os avaliadores irão classificar as amostras utilizando a

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 5.474.738

escala hedônica estruturada de 7 pontos: 7- Adorei, 6- Gostei muito, 5- Gostei um pouco, 4- Nem gostei, nem desgostei, 3- Desgostei um pouco, 2- Desgostei muito e 1-Detestei. Em paralelo, no teste de intenção de compra, será requerido que os avaliadores indiquem sua intenção de compra das amostras apresentadas, usando a escala de 5 pontos: 5- Certamente compraria, 4- Provavelmente compraria, 3- Talvez comprasse, talvez não comprasse, 2- Provavelmente não compraria e 1- Certamente não compraria. Para o teste sensorial de efeito (regeneração labial) da aplicação do hidratante labial contendo levana, o qual será realizado posteriormente aos demais, os avaliadores irão informar através de um simples questionamento se a formulação auxiliou a evitar o ressecamento e a aspereza dos lábios. Para isto, os avaliadores receberão uma amostra codificada contendo a formulação teste do estudo, a qual irão aplicar diariamente, duas vezes ao dia, por um período de sete dias, e ao final deste, irão avaliar o efeito do produto. As formulações do estudo serão previamente caracterizadas quanto aos ensaios de centrifugação e organolépticos, farmacotécnicos (pH, espalhabilidade e hidratação) e de estabilidade.

-Critério de Inclusão: Serão selecionados 60 adultos saudáveis, do sexo feminino, entre 18 e 40 anos. Os voluntários serão capazes de fornecer por escrito seu consentimento livre e esclarecido (modelo em anexo), permitindo assim sua participação no estudo. Os participantes selecionados precisam ser capazes de seguir os protocolos do estudo, como não realizar o emprego de nenhum outro dermocosmético no local de medição (lábios) durante o período em questão, ou qualquer procedimento estético ou dermatológico labial que poderá vir a interferir nos resultados. Precisam também apresentar como característica "lábios ressecados". Além disso, os voluntários não podem apresentar qualquer tipo de hipersensibilidade ou alergia aos componentes das formulações, injúria no local de medição ou saúde debilitada. Os participantes selecionados serão previamente avaliados pela colaboradora deste estudo, Talita Oliveira, que tem conhecimento nas áreas estética e cosmetológica. Devido a pandemia iniciada pelo vírus SARSCoV-2, mais conhecida por Coronavírus ou COVID-19, oriunda no ano de 2020, e levando em consideração a saúde e bem-estar dos voluntários, somente participarão do estudo aqueles participantes que tiverem tomado a 2ª dose ou acima da vacina para o COVID-19, após comprovação por meio de carteirinha de vacinação ou comprovante expedido pelo aplicativo Conecte SUS

-Critério de Exclusão: Serão excluídos da amostragem voluntários gestantes ou com suspeita de gravidez, lactantes, com histórico de hipersensibilidade previamente conhecida a cosméticos, surfactantes ou algum componente das formulações, que fizerem uso de medicação que possa alterar as respostas da pele, como anti-inflamatórios, antibióticos e tratamento hormonal, que apresentem algum distúrbio crônico, sistêmico ou de pele, com sinais de irritação cutânea no local

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

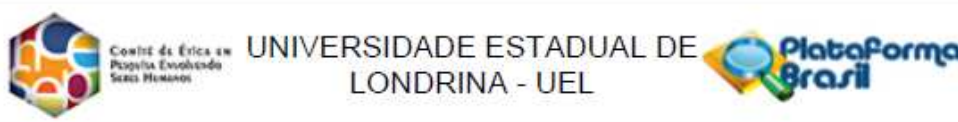
CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.474.738

de aplicação, que tiverem feito o uso de tratamentos labiais, dermatológicos ou estéticos, nos 40 dias antecedentes ao estudo (preenchimento, micro pigmentação), que tenham participado de estudos similares nos 30 dias antecedentes ou que apresentem sinais de dermatite ou irritação durante o período de avaliação. Os voluntários que desistirem do estudo a qualquer momento também serão excluídos do trabalho, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Os voluntários que relatarem não fazer o uso correto dos produtos também serão excluídos do trabalho. Comentários: Trata-se de uma pesquisa na qual serão incluídos 60 participantes, divididos em três grupos testes: G1: Grupo Experimental Utilizará exclusivamente a formulação do estudo (hidratante labial contendo levana) 20; G2: Grupo Controle Utilizará exclusivamente a formulação controle do estudo (hidratante labial sem levana e ativos); G3: Grupo Controle Utilizará exclusivamente uma formulação comercial já comercializada no mercado 20 Segundo o cronograma o estudo será realizado entre 20 de junho a 29 de agosto de 2022; incluindo a defesa do mestrado da candidata do programa de pós Graduação. O orçamento apresentado para execução do estudo, com recursos próprios da pesquisadora, é de 1.675,00 Reais de custeio. 86.057

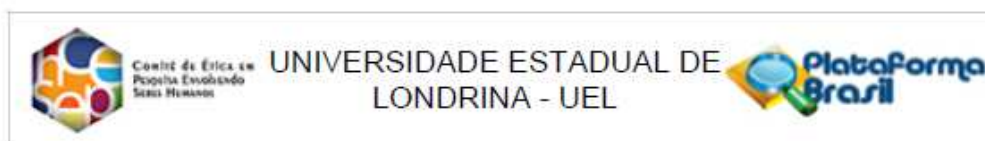
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos:

Folha de rosto devidamente preenchida e assinada pela coordenadora do curso de pós graduação em Ciências Farmacêuticas. Foi apresentado TCLE, com linguagem adequada e contendo todas as medidas de segurança e de respeito ao participante da pesquisa, como sigilo e privacidade, não pressão, coerção, ou gastos com a pesquisa. Destacando o acesso ao melhor tratamento após a finalização das avaliações e resultado final das análises aos participantes dos outros grupos do estudo.

Foi apresentada uma autorização/concordância, assinada por Talita Oliveira da Silva, responsável pela "Clínica Talita Oliveira de Estética Avançada", para a realização das pesquisas em suas dependências. Foi apresentada uma DECLARAÇÃO, Assinado por Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni (Professor Orientador Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) de ciência e de acordo com a apresentação do projeto de pesquisa por sua orientada e que leu e entendeu a resolução CNS 466/2012, responsabilizando me pelo andamento, realização e conclusão deste projeto. "Em caso de desistência ou abandono da mestranda Débora Dahmer, comprometo-me a enviar ao CEP/SD relatório do projeto quando da sua conclusão, ou a qualquer momento, se o

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-970
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR Município: LONDRINA	
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 5.474.738

estudo for interrompido.

Recomendações:

Não se Aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresentá-lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-970
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR Município: LONDRINA	
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Evoluindo
Saberes Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 5.474.736

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1946898.pdf	08/06/2022 12:42:35		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	08/06/2022 12:39:59	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	CARTA_AUTORIZACAO_PESQUISA_CLINICA.pdf	08/06/2022 12:39:26	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	DECLARACAO_COORDENADORA_PO S.pdf	08/06/2022 09:20:25	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	08/06/2022 08:58:09	DEBORA DAHMER	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAO_DE_CONCORDANCIA_LABITEF.pdf	08/06/2022 08:54:18	DEBORA DAHMER	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_DEBORA_DAHMER.pdf	08/06/2022 08:36:51	DEBORA DAHMER	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	08/06/2022 08:35:02	DEBORA DAHMER	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO_TCLE_DEBORA.pdf	08/06/2022 08:34:47	DEBORA DAHMER	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	13/05/2022 16:07:44	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	TERMO_DE_AUTORIZACAO.pdf	13/05/2022 16:05:23	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	TERMO_CONFIDENCIALIDADE_SIGILO.pdf	13/05/2022 16:04:07	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	PLANILHA_CONTROLE_AUTOAPLICACAO_DIARIA_SENSORIAL.pdf	13/05/2022 16:03:14	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	PLANILHA_CONTROLE_AUTOAPLICACAO_DIARIA.pdf	13/05/2022 16:02:35	DEBORA DAHMER	Aceito
Outros	CONVITE.png	13/05/2022 15:57:49	DEBORA DAHMER	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_ORIENTADORA.pdf	13/05/2022 15:56:55	DEBORA DAHMER	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 5.474.738

LONDRINA, 17 de Junho de 2022

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares Russo
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO II – FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL (1/2)

Nome: _____

Idade: _____

FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL

- **INSTRUÇÃO DE USO:** realize a limpeza dos lábios com a água micelar. Em seguida, com o auxílio do aplicador labial, aplique o produto em toda a extensão do lábio, de modo suave e uniforme. Proceda com a avaliação da amostra.



1- Com que frequência você usa hidratantes labiais?

- () Mais de uma vez ao dia
 () Diariamente
 () Várias vezes por semana
 () Semanalmente
 () Várias vezes ao mês
 () Mensalmente
 () Menos de uma vez ao mês
 () Nunca

2- Você está recebendo duas amostras de hidratante labial. Por favor, prove cada uma delas e marque com um traço a intensidade percebida para cada atributo.

FACILIDADE DE ESPALHAR	
ABSORÇÃO	
HIDRATAÇÃO	

FRESCOR	
FORMAÇÃO DE FILME AVELUDADO	
FRAGRÂNCIA	

- 3- Quanto as amostras de hidratante labial, avalie cada uma delas utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou dos produtos.

- 7- Gostei muitíssimo;
 6- Gostei muito;
 5- Gostei;
 4- Não gostei, nem desgostei;
 3- Desgostei;
 2- Desgostei muito;
 1- Desgostei muitíssimo.

ATRIBUTOS	
Amostra	Avaliação

- 4- Use a escala abaixo para indicar sua intenção de compra do produto:

- 5- Certamente compraria;
 4- Provavelmente compraria;
 3- Talvez comprasse, talvez não comprasse;
 2- Provavelmente não compraria;
 1- Certamente não compraria.

Amostra	Intenção de Compra

ANEXO III – FICHA DE EFEITO DA FORMULAÇÃO (1/1)

Nome: _____

Idade: _____

FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL – EFEITO DA FORMULAÇÃO

- **INSTRUÇÃO DE USO:** realize a limpeza dos lábios com a água micelar. Em seguida, com o auxílio do aplicador labial, aplique o produto em toda a extensão do lábio, de modo suave e uniforme. Realize esta aplicação duas vezes ao dia (manhã e noite), durante sete dias. Não realize a aplicação de outro cosmético nos lábios durante o período do estudo e não proceda com nenhum tratamento estético/dermatológico nos lábios (micro pigmentação, preenchimento, etc.) Após o final deste período, proceda com a avaliação da amostra.



1- Após os sete dias de aplicação do produto, você percebeu que houve melhoras na aspereza e ressecamento dos lábios?

() Sim

() Não

Comentários/sugestões (não é obrigatório):

ANEXO IV – CAPÍTULO DE LIVRO (1/24)



DAHMER, D.; BERGAMINI, T. A. ; BIGOTTO, B. G. ; CELLIGOI, M. A. P. C. ; LONNI, A. A. S. G. . COSMÉTICOS LABIAIS: TENDÊNCIA VERDE E O EMPREGO DA BIOTECNOLOGIA. In: Débora Luana Ribeiro Pessoa. (Org.). Farmácia hospitalar e clínica e prescrição farmacêutica. 1ed.Ponta Grossa: Atena Editora, 2022, v. 1, p. 56-70.

CAPÍTULO 6

COSMÉTICOS LABIAIS: TENDÊNCIA VERDE E EMPREGO DA BIOTECNOLOGIA

Data de aceite: 01/09/2022

Débora Dahmer

Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Londrina
Londrina - PR

ORCID: 000-0002-4915-3003

Thays Amélio Bergamini

Departamento de Farmácia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina - PR

ORCID: 0000-0002-0791-1523

Briani Gisele Bigotto

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina - PR

ORCID: 0000-0002-1185-594X

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina - PR

ORCID: 0000-0003-2217-8937

Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni

Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Londrina
Londrina - PR

ORCID: 0000-0001-6498-2806

RESUMO: Devido a adoção de um estilo de vida mais saudável pelos consumidores e a preocupação crescente com a sustentabilidade e o meio ambiente, a busca pelo desenvolvimento de produtos cosméticos naturais têm despontado

como uma tendência no mercado cosmético. A formulação de cosméticos verdes (naturais, orgânicos e veganos) apresenta como aliada o emprego da biotecnologia, ciência que permite o desenvolvimento de moléculas com propriedades biológicas, as quais são de grande interesse para a indústria cosmética. Essa tendência verde também é verificada entre os cosméticos destinados para aplicação labial, os quais necessitam ser seguros para o uso e "eco-friendly". O presente capítulo tem por objetivo descrever a importância do uso de produtos destinados aos lábios, bem como, abordar a temática de produtos cosméticos verdes e o emprego da biotecnologia em sua formulação.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos labiais; cosmeceuticos; tendência verde; biotecnologia; multifuncionalidade.

LIP COSMETICS: GREEN TREND AND USE OF BIOTECHNOLOGY

ABSTRACT: Due to the adoption of a healthier lifestyle by consumers and the growing concern with sustainability and the environment, the search for the development of more natural cosmetic products has emerged as a trend in the cosmetic market. The formulation of green cosmetics (natural, organic and vegan) presents as an ally the use of biotechnology, a science that allows the development of molecules with biological properties, which are of great interest to the cosmetic industry. This green trend is also seen among cosmetics intended for lip application, which need to be safe to use and "eco-friendly". This chapter aims to describe the

importance of using products intended for the lips, as well as to address the issue of green cosmetic products and the use of biotechnology in their formulation.

KEYWORDS: Lip products; cosmeceuticals; green trend; biotechnology; multifunctionality.

1 | INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o Brasil corresponde ao 4º maior mercado consumidor de produtos HPPC (higiene pessoal, perfumaria e cosméticos), despontando na 7ª colocação mundial quanto aos itens de maquiagem (ABIHPEC, 2022). De acordo com esta associação, tanto a nível nacional quanto internacional, têm se observado novas tendências no mercado de cosméticos e os consumidores estão cada vez mais exigentes e atentos aos assuntos relacionados a estas. A busca pela beleza com foco em ingredientes naturais e a promoção da sustentabilidade por meio da biotecnologia apresentam destaque (ABIHPEC, 2019).

Um dos fatores que influenciam a intenção de compra de produtos verdes e “eco-friendly” pelo público-alvo, têm sido as mídias sociais. Estas, desempenham papel fundamental na formação de opinião dos consumidores, influenciando, também, suas atitudes e a aquisição de produtos. Neste sentido, os consumidores e fabricantes de produtos cosméticos têm se mostrado cada vez mais interessados no uso de ingredientes naturais, devido à crescente preocupação com o meio ambiente e a sustentabilidade, o que se reflete na vasta gama de pesquisas em matérias-primas de origem natural (AMBERG; FOGARASSY, 2019; POP; SÄPLÄCAN; ALT, 2020).

Um das tecnologias exploradas pela indústria cosmética na obtenção de insumos sustentáveis tem sido a biotecnologia. A oferta de novas moléculas derivadas de processos biotecnológicos, que apresentem propriedades bioativas e agreguem multifuncionalidade aos cosméticos, permite a produção de novos e/ou melhores produtos, mais rapidamente e de modo eficiente. Algumas das vantagens do emprego de moléculas derivadas de biotecnologia em produtos HPPC correspondem à biocompatibilidade que estas apresentam, natureza “eco-friendly”, atividade versátil e performance superior (SAJNA *et al.*, 2015; BIANCHET *et al.*, 2020).

Uma das categorias dos produtos de maquiagem que apresenta elevada popularidade entre os consumidores, é o de produtos labiais. Estes, apresentam abrangência tanto entre o público feminino quanto o masculino (produtos labiais emulsivos e *lip balms*), são de fácil uso e têm sua distribuição no mercado em amplas formas físicas, de acordo com a necessidade dos consumidores. Por serem aplicados diretamente na extensão da mucosa oral, o público consumidor destes produtos têm apresentado preocupação referente à formulação e segurança no uso de cosméticos labiais, buscando produtos mais naturais, que realizam a substituição de ingredientes sintéticos. Além disso, questões voltadas à preocupação com o meio ambiente e natureza ecológica também são abordadas para essa

gama de produtos (SANDEWICZ, 2007; NORMASARAH; ASRUL, 2014; ANILKUMAR; DHANARAJU, 2020).

Considerando o desenvolvimento de produtos cosméticos labiais e as tendências verificadas no mercado, este capítulo de livro tem por objetivo descrever a importância do uso de produtos destinados aos lábios, bem como, abordar a temática de produtos cosméticos verdes e o emprego da biotecnologia em sua formulação.

2 | IMPORTÂNCIA DO USO DE COSMÉTICOS LABIAIS

Os lábios, também denominados de área vermelha ou borda vermelha dos lábios, correspondem a única região da mucosa oral exposta ao ambiente externo (BIELFELDT *et al.*, 2019), a qual é completamente distinta da pele em seu entorno, por não apresentar glândulas sudoríparas ou pelos (TAMURA *et al.*, 2016). A histologia dos lábios é bem definida, sendo essa região constituída por ténue estrato córneo (EC), formado por células de renovação mais rápida do que aquelas presentes no estrato córneo normal (LÓPEZ-JORNET; CAMACHO-ALONSO; RODRÍGUEZ-ESPIN, 2010; TAMURA *et al.*, 2018), e o epitélio caracterizado como um tecido fino, levemente queratinizado e com menor conteúdo de ceramidas (KIM *et al.*, 2019; GFELLER *et al.*, 2019).

Devido a sua proeminente localização na região facial, os lábios estão constantemente suscetíveis às influências do ambiente externo, como a radiação solar, ventos e temperaturas extremas, bem como, a tratamentos estéticos, incluindo os cosméticos e produtos dentários. Dos diferentes mecanismos da pele, o estado de hidratação do EC é o mais comumente alterado no cotidiano (GUEST *et al.*, 2013) e para que uma barreira intacta seja mantida na epiderme, a quantidade adequada de água precisa estar presente nessa superfície (PALMA *et al.*, 2015). Devido a rápida renovação celular do EC labial, corneócitos imaturos são expostos à superfície cutânea, permitindo que a água presente nos lábios transpire com maior facilidade, o que resulta em uma região seca e áspera (TAMURA *et al.*, 2016).

Devido às propriedades e características diferenciadas, os lábios necessitam de proteção e cuidados especializados. Para prevenir o ressecamento e aspereza destes, mantendo ou elevando os níveis de hidratação do EC, produtos cosméticos para tratamento labial são uma excelente alternativa (BIELFELDT *et al.*, 2019), os quais podem auxiliar a pele a manter sua função de barreira intacta e prevenir, inclusive, infecções, como a herpes labial recorrente (GFELLER, *et al.*, 2019).

3 | COSMÉTICOS LABIAIS: CLASSIFICAÇÃO BÁSICA

Os produtos labiais representam uma parcela significativa do valor total das indústrias cosméticas, com abrangência tanto entre o público feminino quanto o masculino, devido a comercialização de artigos que não apresentam gênero especificado, como os

de tratamento labial e *lip balm*, tornando-os universais. Estes produtos são de fácil uso e podem ser aplicados diariamente, repetidas vezes, além de serem distribuídos no mercado em diversas formas físicas (batom em bala e líquido, *gloss*, *balm* e labiais emulsivos), ficando a critério do público consumidor a escolha daquele que melhor se enquadra às suas necessidades (SANDEWICZ, 2007).

- **Batons em bala:** apresentam formulação anidra, ou seja, constituída por insu-
mos lipofílicos, como ceras (responsáveis pela estrutura), compostos graxos
pastosos (responsáveis pela aderência, como lanolina e manteigas), emolien-
tes (óleos), formadores de filme (polímeros), aromas (sacarose), ativos (filtro
solar, vitaminas, dentre outros) conservantes e pigmentos. Os batons sólidos
na forma de bala correspondem a uma das formas mais tradicionais de produ-
tos labiais e são comercializados em uma vasta seleção de cores, texturas e
brilho (KAMARUDIN *et al.*, 2014). Através de seu uso, agregam cor e realçam
os lábios, promovendo destaque a esta região, além de proporcionar proteção
contra agentes externos (ENGASSER, 2000).

Estes cosméticos são formados por uma mistura sólida de lipídeos com a dispersão de agentes colorantes (pigmentos). Quando em contato com a temperatura corporal, amolecem, permitindo um melhor deslizamento e suave aplicação. Por esta razão, são denominados termoplásticos (ENGASSER, 2000; SANGO; BINDER, 2017).

As embalagens mais comuns para este tipo de cosmético são as giratórias, as quais permitem que o consumidor levante a bala para aplicação do produto e, após o uso, abaixe está para que fique protegida dentro do invólucro. Nos dias atuais, as embalagens são fabricadas em uma enorme variedade de formatos, cores e texturas, agregando beleza estética ao produto a ser comercializado e atendendo à padronização normalmente encontrada nas marcas (SANGO; BINDER, 2017).

Para um batom ser considerado bom e exibir grande aceitação perante o público consumidor, este precisa: apresentar uma aparência homogênea, com uma superfície lisa e de cor uniforme; permitir uma aplicação suave, que traga conforto ao usuário (textura agradável); transferir a cor desejada aos lábios e que apresente longa duração. Além disso, ser de fácil remoção; apresentar aparência rígida, mas que não quebre durante a aplicação e não possuir mau cheiro ou sabor (SANDEWICZ, 2007; SANGO; BINDER, 2017; GIOVANNINI *et al.*, 2019).

- **Batons líquidos:** correspondem a uma variante líquida dos batons em bala. Estes produtos também apresentam composição anidra, mas o que os diferencia dos batons sólidos é a menor concentração de espessantes na formulação (ceras) (ENGASSER, 2000). Por não serem moldados na forma de bala, seu envase ocorre em embalagens que permitem aplicação posterior diretamente sobre os lábios, por meio de aplicadores labiais. Os batons líquidos contêm um alto teor de pigmento, baixa concentração de ceras, emolientes voláteis, formadores de filme e promovem alta cobertura. Além disso, são comercializa-

dos em diversas texturas (*matte*, brilhante, cremosa, cintilante, dentre outras) e podem ser resistentes à transferência, o que é uma característica bem-vista pelo público consumidor.

- **Gloss labial:** Sua formulação semissólida é voltada para fornecer brilho aos lábios, agregando uma aparência úmida e sedutora a estes. No quesito composição, o *gloss* apresenta menor ou nenhum conteúdo de cera em sua formulação, sendo constituído majoritariamente por óleos, emolientes de alta viscosidade, agentes gelificantes e formadores de filmes, os quais conferem aderência, maior transparência e textura fluida aos brilhos labiais. Estes produtos são menos intensos no quesito pigmentação, transferindo geralmente apenas uma cor sutil aos lábios, o que torna o público jovem o maior alvo consumidor de brilhos labiais (GARG, 2016; SANGO; BINDER, 2017; SHARMA; SAROTA; DRAELOS, 2019).

O *gloss* pode apresentar diferentes acabamentos, como fosco, brilhante, vítreo e metálico. Uma característica que apresenta destaque nestes produtos é a fragrância, geralmente frutal, e bem intensa. Devido a sua forma líquida ou semilíquida, os brilhos labiais normalmente são envasados em embalagens que contenham aplicadores labiais inclusos, o que facilita sua aplicação (ENGASSER, 2000; SANGO; BINDER, 2017).

Para ser considerado bem aceito pelo público consumidor, um *gloss* precisa apresentar certas características: ser de fácil aplicação; apresentar boa aderência aos lábios, mas não ser muito pegajoso; prover um brilho intenso e de longa duração (DRAKONTIS; AMIN, 2020).

- **Lip balms:** conhecidos como bálsamos labiais, os *lip balms* são cosméticos que tem por objetivo formar uma película protetora sobre os lábios, de modo a evitar seu ressecamento, aliviar a aspereza e preservar estes contra danos causados por agentes externos, como situações de baixa umidade do ar e frio extremo (ENGASSER, 2000; ANISA; SUKMAWARDANI; WINDAYAN, 2019; KUSRINI *et al.*, 2020; P; FARIDA; FAIZATUN, 2021).

Os bálsamos labiais proporcionam um efeito hidratante aos lábios, agregando beleza a estes e, por não terem gênero específico, podem ser utilizados por homens e mulheres (KADU; VISHWASRAO; SINGH, 2014; KUSRINI *et al.*, 2020). Os *lip balms* são muitas vezes comparados aos batons em bala devido ao formato que apresentam (o qual pode ser em bastão), porém, ambos diferem entre si, principalmente no quesito hidratação. A semelhança entre eles é presenciada em quesitos sensoriais e de estabilidade, como manter-se resistente às variações de temperatura, apresentar aplicação suave e ter aderência labial (FERNANDES *et al.*, 2013).

A composição de um *lip balm* é constituída basicamente por emolientes, óleos, manteigas e ceras (KADU; VISHWASRAO; SINGH, 2014), com a presença de pouco ou nenhum pigmento. Antioxidantes e protetores solares muitas vezes são adicionados à formulação para prover benefícios extras (SANGO; BINDER, 2017; DRAELOS, 2018).

- **Produtos labiais emulsivos:** grande parte dos cosméticos labiais disponíveis no mercado são anídeos, ou seja, são constituídos por insumos lipofílicos sem a presença de água na formulação. Porém, esta característica não é verificada em produtos emulsivos, os quais necessitam de água em sua composição. Produtos labiais emulsivos atuam na hidratação dos lábios e podem ser compostos por diversos ativos, como vitaminas, regeneradores labiais e antioxidantes (EN-GASSER, 2000; SANGO; BINDER, 2017).

Estes cosméticos exigem maior empenho ao serem formulados, pois necessitam de surfactantes que realizem a emulsificação dos óleos com a água (formulações óleo em água, O/A) ou da água com os óleos (formulações água em óleo, A/O), e esta escolha é baseada no Equilíbrio Lipofílico-Hidrofílico (EHL) da formulação. Além disso, precisam apresentar um sistema conservante adequado, devido a presença de água na composição, e serem testados severamente frente à segurança microbiológica, e não serem instáveis frente à adição de cor (pigmentos) na formulação, caso esta ocorra (SANDEWICZ, 2007; SANGO; BINDER, 2017). Produtos emulsivos labiais normalmente apresentam uma textura agradável e podem prover benefícios de tratamento adicionais aos lábios.

4 | COSMÉTICOS LABIAIS NATURAIS, ORGÂNICOS E VEGANOS: EXISTE DIFERENÇA?

Atualmente, o público consumidor de cosméticos vem se mostrando cada vez mais preocupado com a procedência e formulação dos produtos que estão sendo distribuídos no mercado, devido à adoção de um estilo de vida mais sustentável. Os cuidados com a saúde e com o meio ambiente são refletidos na busca por cosméticos desenvolvidos com responsabilidade ambiental e baseados em ingredientes naturais, que evitem possíveis reações alérgicas e efeitos colaterais, sendo considerados seguros para o uso humano (AZWANIDA; NORMASARAH; AFANDI, 2014; KAMAIRUDIN *et al.*, 2014; SHIMIZU; NOMURA; BUI, 2021).

Baseado nesta mudança de comportamento, novos produtos têm sido formulados pela indústria cosmética para atender às expectativas e necessidades dos consumidores, bem como, a adoção de modificações no processo produtivo e o cuidado com a origem das matérias-primas. Essa tendência apresenta elevado crescimento e é denominada de "green products", traduzido para o português, produtos verdes. Estes são considerados ecologicamente corretos por não gerarem efeitos negativos ao meio ambiente, por meio do emprego de tecnologias limpas durante sua produção, pelo uso racional de recursos naturais, através da certificação dos produtos e, inclusive, no quesito embalagem, as quais podem ser reutilizadas e recicladas, com preferência pelas biodegradáveis (FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015).

Este mercado de produtos verdes abrange os cosméticos veganos, orgânicos e naturais. Para ser considerado natural, um cosmético tem que ter pelo menos 95% de

ingredientes naturais na composição, que podem ser compostos por extratos de plantas e metabólitos de bactérias, fungos e algas. Já o cosmético orgânico é o produto cuja composição tem 95% de matérias-primas certificadas como orgânicas. E por fim, o cosmético vegano é totalmente isento de ingredientes de origem animal e não foi testado em animais (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019).

No Brasil, bem como na grande maioria dos países, não há nenhuma regulamentação específica para estes produtos, pois sua definição é bastante ampla, o que permite aos fabricantes explorarem estas terminologias. Em prol da padronização de conceitos, certificações têm sido emitidas para esta gama de cosméticos por organizações de cunho nacional e internacional. Para alcançar este reconhecimento, diversas regras precisam ser seguidas pelos fabricantes, englobando todo o processo produtivo (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019). Algumas dessas certificadoras são:

- **Natru** (**The International Natural and Organic Cosmetics Association**): organização europeia e sem fins lucrativos, criada com o intuito de padronizar a produção de cosméticos orgânicos e naturais, bem como, auxiliar no combate do "Greenwash", publicidade desenvolvida com apelo sustentável apenas por estratégia de marketing, com o intuito de atrair a atenção do público consumidor. No Brasil, este selo é geralmente encontrado em produtos importados ou que são produzidos com esse intuito (BARROS; BARROS, 2020).
- **Instituto Biodinâmico de Certificações (IBD)**: conhecida como a maior certificadora da América Latina, essa organização apresenta elevada influência no mercado brasileiro de produtos verdes e segue as diretrizes estabelecidas pela Natru (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019).
- **Cosmetic Organic Standard (COSMOS)**: associação internacional sem fins lucrativos, criada com o intuito de disseminar conceitos e padronizar regras de certificação de cosméticos naturais e orgânicos. Constituída por cinco organizações europeias: BDIH (Alemanha), Cosmebio (França), Ecocert (França), ICEA (Itália) e Soil Association (Reino Unido). A certificação COSMOS é pouco presente no Brasil, mas constitui referência em diversos países (BARROS; BARROS, 2020).
- **Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB)**: Confere o selo vegano para os produtos que sejam isentos de ingredientes de origem animal e que não realizam testes em animais, o que inclui a empresa produtora e os fabricantes dos ingredientes (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019).
- **People for the Ethical Treatment of Animals (PETA)**: ONG comprometida na causa de proteção dos animais desde 1980 Apresenta dois selos certificadores que podem ser atribuídos a produtos cosméticos: o "Cruelty-free", que garante que os produtos e as matérias-primas não são testadas em animais, e o "Approved Vegan", que garante que o produto não foi testado e nem apresenta insumos de origem animal (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019).

Para um produto ser considerado vegano, de acordo com as organizações certificadoras, este precisa apresentar em sua composição matérias-primas que não sejam provenientes de origem animal (cera de abelha, queratina, lanolina, derivados do mel, entre outros) e/ou que não tenham sido testadas em animais. Além disso, o cosmético por si só também não pode ter sido testado em animais. Estas regras são muito semelhantes entre todas as entidades certificadoras e facilitam aos fabricantes desenvolverem produtos que se enquadrem neste critério. Devido a questões como a proteção ambiental, muitos consumidores têm adotado nos últimos anos o veganismo em seu estilo de vida. (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019; BARROS; BARROS, 2020; LEE; KWON, 2022).

Os cosméticos orgânicos apresentam uma definição mais estrita, que varia de acordo com a entidade certificadora, e seu desenvolvimento pode apresentar grandes desafios, que envolvem desde as matérias-primas até o envase (AMBERG; FOGARASSY, 2019). Insumos certificados como orgânicos são produzidos em um sistema agrícola controlado, que segue rígidas regras, como o não uso de agrotóxicos, preservação dos recursos naturais e condições adequadas de trabalho no campo (FERNANDES *et al.*, 2013). No Brasil, para ser considerado orgânico, de acordo com o IBD, um cosmético precisa apresentar, no mínimo 95% de matérias-primas orgânicas em sua composição, provenientes de manejo orgânico ou extrativismo controlado (de acordo com a lei BR 10.831/2003 ou pelo Programa Orgânico Nacional USDA ou ainda de uma norma da Família IFOAM de Normas) (IBD, 2021). O restante da formulação pode ser composto por água e insumos naturais. Além disso, o produto precisa ter impacto mínimo sobre o meio ambiente, o que inclui seu uso e descarte, apresentar uma rotulagem clara, não ser testado em animais e ser seguro para uso humano (FERNANDES *et al.*, 2013; FONSECA-SANTOS; CORRÊA; CHORILLI, 2015; BARROS; BARROS, 2020).

Para um cosmético ser considerado natural, este precisa apresentar em sua composição insumos de origem natural, certificados ou não. De acordo com a certificadora COSMOS, não é necessária a presença de insumos orgânicos em sua composição, porém, segundo o IBD, estes cosméticos precisam apresentar, ao menos, 5% de insumos orgânicos em sua constituição (FERNANDES *et al.*, 2013; FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019; BARROS; BARROS, 2020). Os insumos de origem natural são aqueles provenientes de vegetais, minerais (inorgânico), animais (que não causem sofrimento e exceto vertebrados) ou microrganismos (idênticos aos encontrados na natureza), e seus derivados ou misturas, que não resultem em modificações químicas intencionais. Matérias-primas idênticas às naturais, como pigmentos e conservantes, só podem ser empregadas quando as substâncias naturais não podem ser recuperadas da natureza. O uso de matérias-primas derivadas das naturais (gorduras, óleos, ceras, polissacarídeos, proteínas, entre outros) só ocorre se a função especificada não for alcançada pelo insumo natural. Além disso, só podem ser empregados se produzidos por processos com reações químicas, como os biotecnológicos. Insumos sintéticos são proibidos em produtos desta natureza,

bem como, derivados de petróleo, polietilenoglicóis, quaternários de amônio e silicones. Desta forma, a lista de ingredientes permitidos se torna reduzida e o custo de produção, conseqüentemente, maior (cerca de 50% ou mais no valor) (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019; IBD, 2021).

CLASSIFICAÇÃO	REQUISITO	MATÉRIAS-PRIMAS
VEGANO	Não ser testado em animais ou apresentar insumos que tenham sido testados em animais e/ou de origem animal	Exceto as de origem animal e testadas em animais
ORGÂNICO	Ao menos 95% de insumos orgânicos certificados em sua composição	Insumos orgânicos certificados e os demais 5%, água e insumos naturais
NATURAL	Insumos de origem natural e, pelo menos 5% de insumos orgânicos	Insumos provenientes de plantas, minerais, animais (que não causem sofrimento e exceto vertebrados) ou microrganismos (idênticos aos encontrados na natureza)

Tabela 1: Classificação dos cosméticos veganos, orgânicos e naturais.

O que difere um produto cosmético labial usual de um vegano, natural ou orgânico, são os insumos empregados em sua composição, os quais podem ser majoritariamente sintéticos ou naturais. Uma das matérias-primas que mais desperta atenção nesse quesito é o pigmento. Pigmentos sintéticos podem causar alergias, dermatites e ressecamento labial, não sendo adequados para consumo humano. Sua substituição por pigmentos derivados de produtos naturais constitui uma alternativa aos sintéticos. Assim, os grupos cromóforos presentes nas plantas podem agregar cor de modo eficiente e não tóxico. Exemplos destes são as antocianinas, presentes em uvas, amoras e ameixas, que podem conferir coloração azulada e roxa, os carotenoides, presentes em abacaxis, mamão, cenouras e laranjas, que podem conferir coloração amarela ou laranja, e os licopenos, presentes em beterrabas, tomates, morangos e melancias, que podem conferir coloração vermelha (AZWANIDA; NORMASARAH; ASRUL, 2014; ANILKUMAR; DHANARAJU, 2020).

Além de pigmentos, produtos labiais podem apresentar em sua composição óleos (que conferem ação emoliente), ceras, ativos (antioxidantes, vitaminas, dentre outros) e tensoativos. A substituição dos insumos tradicionais por naturais, como óleos e ceras vegetais, é uma possibilidade. Exemplos são: cera de carnaúba e candelila, óleos com elevado grau de ácidos graxos saturados (óleo de coco, palma e algodão) e insaturados (óleo de canola, mamona, oliva, amêndoa e abacate) (AZWANIDA; NORMASARAH; ASRUL, 2014; ANILKUMAR; DHANARAJU, 2020).

5 | EMPREGO DA BIOTECNOLOGIA EM PRODUTOS LABIAIS

Moléculas provenientes de fontes biotecnológicas têm sido vastamente estudadas devido às suas propriedades biológicas e características renováveis (FILIPE *et al.*, 2022). De fato, o emprego da biotecnologia é muito vasto, e quase todas as indústrias podem fazer uso desta tecnologia, que permite a produção de novos e/ou melhores produtos, mais rapidamente e de modo eficiente (BIANCHET *et al.*, 2020). E não seria diferente na indústria cosmética, afinal, estas têm empregado a biotecnologia para auxiliar no desenvolvimento e produção de insumos que possam ser utilizados em diferentes formulações e na avaliação da atividade destes componentes na pele, especialmente no que condiz aos efeitos anti-idade (GOMES *et al.*, 2020).

Produtos biotecnológicos têm sido empregados em formulações cosméticas, dentre eles, ácidos orgânicos, polissacarídeos e lipídeos derivados. Diversos aspectos destes produtos são considerados antes da sua aplicação, como a biocompatibilidade com a pele e sua segurança para uso humano, pois não devem gerar nenhuma resposta imunológica. Biocompatibilidade, natureza “eco-friendly”, atividade versátil e performance superior são alguns dos atributos conferidos por ingredientes cosméticos derivados da biotecnologia (SAJNA *et al.*, 2015).

Uma das tecnologias empregadas na produção de insumos cosméticos biotecnológicos é o processo fermentativo, o qual utiliza microrganismos como fungos, bactérias e leveduras, além de enzimas, na conversão de substratos (glicose, dentre outros) em produtos (metabólitos primários e secundários), que são dependentes do microrganismo específico, do substrato e das enzimas empregadas (GOMES *et al.*, 2020). Moléculas que apresentam origem marinha, como as derivadas de algas (polissacarídeos, carotenoides, lipídeos, ácidos graxos, dentre outras), também apresentam promissoras propriedades bioativas, como na prevenção do envelhecimento cutâneo (GOMES *et al.*, 2020; FAVAS *et al.*, 2022).

ATIVO	ORIGEM	PROPRIEDADES COSMÉTICAS	REFERÊNCIA
Ácido Kójico	Fermentação empregando fungos filamentosos (<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>)	Clareador de pele e despigmentante	SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019; GOMES <i>et al.</i> , 2020; KIM <i>et al.</i> , 2012
Ácido Hialurônico	Fermentação microbiana (<i>Streptococcus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)	Hidratante, redutor de rugas e anti-idade	BUKHARI <i>et al.</i> , 2018; GOMES <i>et al.</i> , 2020; DE OLIVEIRA, <i>et al.</i> , 2018; CHIEN; LEE, 2007; GUPTA <i>et al.</i> , 2019
Ceramidas	Fermentação com fungos (<i>Wickerhamomyces ciferrii</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>Yarrowia lipolytica</i>)	Hidratante e redutor da perda transepidérmica de água	SAJNA <i>et al.</i> , 2015; GUPTA <i>et al.</i> , 2019; CODERCH <i>et al.</i> , 2003; KWUN <i>et al.</i> , 2006
Goma Xantana	Fermentação (<i>Xanthomonas campestris</i>)	Agente gelificante e estabilizador de formulações	SAJNA <i>et al.</i> , 2015; GARCIA-OCHOA <i>et al.</i> , 2000
β -glucana	Fermentação de variadas fontes: bactérias, fungos e plantas (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>L. edodes</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>)	Retenção de água, agente reológico/espessante e emoliente	PETRAVIĆ-TOMINAC <i>et al.</i> , 2010; SAJNA <i>et al.</i> , 2015
Levana	Fermentação microbiana (<i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Zymomonas</i>)	Hidratante	KIM <i>et al.</i> , 2005; SAJNA <i>et al.</i> , 2015; DA SILVA <i>et al.</i> , 2020
Sotorolipídio	Fermentação de leveduras (<i>Stammerella bombicola</i> , <i>Candida bombicola</i>)	Biosurfactante, antioxidante, antibacteriano e antiacne	FILIFE <i>et al.</i> , 2022; SAJNA <i>et al.</i> , 2015; VARVARESOU; IAKOVOU, 2015

Tabela 2: Exemplos de ativos biotecnológicos e suas propriedades cosméticas.

Com relação aos produtos destinados aos lábios, a inserção de ativos biotecnológicos ocorre pela substituição de insumos sintéticos por aqueles derivados e provenientes de processos biotecnológicos, bem como, pela incorporação de novos ativos descobertos por esta ciência, os quais agregam diferentes propriedades aos produtos cosméticos, os enquadrando como sustentáveis e multifuncionais. Dentre as funções apresentadas por produtos labiais, apresentam destaque a hidratante, antioxidante, antimicrobiana, emoliente e regeneradora. Alguns dos insumos a serem empregados na composição de produtos destinados aos lábios são descritos na Tabela 2.

6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Cosméticos labiais apresentam grande importância no mercado de maquiagens, despontando como uns dos itens mais populares entre o público feminino e masculino.

Produtos labiais com apelo verde e desenvolvidos com formulação natural, assim como os demais produtos encontrados no mercado cosmético, continuarão sendo uma tendência, a qual é impulsionada pelas mídias sociais e o novo estilo de vida adotado pelos consumidores. O sinergismo entre a indústria cosmética e a biotecnologia, com incentivo à pesquisa de novas moléculas, continuará permitindo o desenvolvimento de novos produtos cosméticos mais sustentáveis e multifuncionais, o que inclui os produtos labiais, de acordo com as necessidades apresentadas pelo mercado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

REFERÊNCIAS

- ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **A Indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**. ABIHPEC, São Paulo, 2022. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2021/04/Panorama-do-Setor-Atualizado-0807.pdf>>.
- ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Caderno de Tendências - Higiene pessoal, perfumaria e cosméticos - 2019-2020**. ABIHPEC, São Paulo, 2019. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>>.
- AMBERG, N.; FOGARASSY, C. Green Consumer Behaviour in Cosmetic Market. *Resources*, v. 8, n. 137, p. 1–19, 2019.
- ANILKUMAR, V.; DHANARAJU, M. D. A review on Herbal lipsticks. *Journal of Pharmaceutical Advanced Research*, v. 4, n. 4, p. 1179-1190, 2021.
- ANISA, H.; SUKMAWARDANI, Y.; WINDAYANI, N. A simple formulation of lip balm using carrot extract as a natural coloring agent. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 1402, n. 5, 2019.
- AZWANIDA, N. N.; NORMASARAH, N.; AFANDI, A. Utilization and Evaluation of Betalain Pigment from Red Dragon Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) as a Natural Colorant for Lipstick. *Jurnal Teknologi*, v. 69, n. 6, p. 139–142, 2014.
- BARROS, C.; BARROS, R. B. G. NATURAL AND ORGANIC COSMETICS: DEFINITION AND CONCEPTS. *Preprints*, 2020. DOI: [doi:10.20944/preprints202005.0374.v2](https://doi.org/10.20944/preprints202005.0374.v2).
- BIANCHET, R. T.; VIEIRA CUBAS, A. L.; MACHADO, M. M.; SIEGEL MOECKE, E. H. Applicability of bacterial cellulose in cosmetics – bibliometric review. *Biotechnology Reports*, v. 27, p. e00502, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00502>>.
- BIELFELDT, S.; BLAAK, J.; LAING, S.; et al. Deposition of plant lipids after single application of a lip care product determined by confocal raman spectroscopy, corneometry and transepidermal water-loss. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 41, n. 3, p. 281–291, 2019.

- BUKHARI, S. N. A.; ROSWANDI, N. L.; WAQAS, M.; et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 1682–1695, 2018.
- CHIEN, L. J.; LEE, C. K. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress*, v. 23, n. 5, p. 1017–1022, 2007.
- CODERCH, L.; LÓPEZ, O.; DE LA MAZA, A.; PARRA, J. L. Ceramides and skin function. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 4, n. 2, p. 107–129, 2003.
- DA SILVA, R. T.; BERSANETI, G. T.; CHIDEROLI, R. T.; et al. Propriedades biológicas da levedura de *Bacillus subtilis* natto e do óleo essencial de canela para aplicação em formulações cosmecêuticas. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 5, p. 23009–23024, 2020.
- DE OLIVEIRA, J. D.; CARVALHO, L. S.; GOMES, A. M. V.; et al. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*, v. 15, n. 1, p. 1–19, 2016.
- DRAELOS, Z. D. Lip care and cosmetics. In: SHARAD, J.; VEDAMURTHY, M. (org). *Aesthetic Dermatology: Current Perspectives*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 2019. cap. 6, p. 50-54.
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Design of Sustainable Lip Gloss Formulation with Biosurfactants and Silica Particles. *International Journal of Cosmetic Science*, Riverdale, 2020.
- ENGASSER, P. G. Lip cosmetics. *Dermatologic Clinics*, v. 18, n. 4, p. 641–649, 2000.
- FAVAS, R.; MORONE, J.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V.; LOPES, G. Cyanobacteria Secondary Metabolites as Biotechnological Ingredients in Natural Anti-Aging Cosmetics: Potential to Overcome Hyperpigmentation, Loss of Skin Density and UV Radiation-Deleterious Effects. *Marine Drugs*, v. 20, n. 3, 2022.
- FERNANDES, A. R.; DARIO, M. F.; PINDO, C. A. S. DE O.; et al. Stability evaluation of organic Lip Balm. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, n. 2, p. 293–299, 2013.
- FILIFE, G. A.; BIGOTTO, B. G.; BALDO, C.; et al. Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil against acne-causing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, p. 1–9, 2022.
- FLOR, J.; MAZIN, M. R.; FERREIRA, L. A. Cosméticos Naturais, Orgânicos e Veganos. *Cosmetics & Toiletries (Brazil)*, v.31, p. 30-36, 2019.
- FONSECA-SANTOS, B.; ANTONIO CORRÊA, M.; CHORILLI, M. Sustainability, natural and organic cosmetics: Consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 51, n. 1, p. 17–26, 2015.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, v. 18, n. 7, p. 549–579, 2000.

- GFELLER, C. F.; WANSEER, R.; MAHALINGAM, H.; et al. A series of in vitro and human studies of a novel lip cream formulation for protecting against environmental triggers of recurrent herpes labialis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 12, p. 193–208, 2019.
- GIOVANINI, I. R. T.; ALVES, P. E.; SIQUEIRA, L. B. DE O. DE; MARTINS, L. L. B.; SANTOS, E. P. DOS. Desenvolvimento De Maquiagem Multifuncional: Batom Com Propriedade Fotoprotetora, Emoliente E Hidratante. *Iniciação Científica Cesumar*, v. 21, n. 1, p. 71, 2019.
- GOMES, C.; SILVA, A. C.; MARQUES, A. C.; LOBO, J. S.; AMARAL, M. H. Biotechnology applied to cosmetics and aesthetic medicines. *Cosmetics*, v. 7, n. 2, p. 1–14, 2020.
- GUEST, S.; ESSICK, G. K.; MEHRABYAN, A.; DESSIRIER, J. M.; MCGLONE, F. Effect of hydration on the tactile and thermal sensitivity of the lip. *Physiology and Behavior*, v. 123, p. 127–135, 2013.
- GUPTA, P. L.; RAJPUT, M.; OZA, T.; TRIVEDI, U.; SANGHVI, G. Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. *Natural Products and Bioprospecting*, v. 9, n. 4, p. 267–278, 2019.
- IBD - Instituto Biodinâmico de Certificações. Diretrizes Ingredientes Orgânicos e Naturais. Botucatu: IBD Certificações Ltda, 2021. 54 p.
- KADU, M.; VISHWASRAO, S.; SINGH, S. Review on Natural Lip Balm. *International Journal of Research In Cosmetic Science*. *International Journal of Research In Cosmetic Science*, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2014.
- KAMAIRUDIN, N.; ABD GANI, S. S.; FARD MASOUMI, H. R.; HASHIM, P. Optimization of natural lipstick formulation based on pitaya (*hylocereus polyrhizus*) seed oil using d-optimal mixture experimental design. *Molecules*, v. 19, n. 10, p. 18672–18683, 2014.
- KIM, H.; LEE, M.; PARK, S. Y.; et al. Age-related changes in lip morphological and physiological characteristics in Korean women. *Skin Research and Technology*, v. 25, n. 3, p. 277–282, 2019.
- KIM, J. H.; CHANG, P. K.; CHAN, K. L.; et al. Enhancement of commercial antifungal agents by Kojic acid. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 11, p. 13887–13880, 2012.
- 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.
- KUSRINI, E.; MAWARNI, D. P.; WULANDARI, D. A.; AYUNINGTYAS, K.; USMAN, A. Formulation and characterization of lip balm made from beeswax, almond oil, virgin coconut oil and honey. *AIP Conference Proceedings*, v. 2255, 2020.
- KWUN, K. H.; LEE, J. H.; RHO, K. H.; YUN, H. S. Production of ceramide with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 133, n. 3, p. 203–210, 2008.
- LEE, J.; KWON, K. H. Good ingredients from foods to vegan cosmetics after COVID-19 pandemic. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2022.
- LÓPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F.; RODRÍGUEZ-ESPIN, A. Study of lip hydration with application of photoprotective lipstick: Influence of skin phototype, size of lips, age, sex and smoking habits. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 15, n. 3, p. 0–5, 2010.

P, A.; FARIDA, Y.; FAIZATUN. Formulation and activity test of extract seaweed lip balm (sargassum binderi) and oil kenanga (cananga oil) as lip moisturizer. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 1, p. e55210111835, 2021.

PALMA, L.; MARQUES, L. T.; BUJAN, J.; RODRIGUES, L. M. Dietary water affects human skin hydration and biomechanics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 8, p. 413–421, 2015.

PETRAVIĆ-TOMINAC, V.; ZECHNER-KRPAN, V.; GRBA, S.; SREČEC, S.; PANJKOTA-KRBAVČIĆ, I.; VIDOVIĆ, L. Biological effects of yeast β -glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, v. 75, p.149–58, 2010.

POP, R.A.; SĂPLĂCAN, Z.; ALT, M.A. Social media goes green - The Impact of social media on green cosmetics purchase motivation and intention. *Information*, v.11, n.447, p.1-16, 2020.

SAEEDI, M.; ESLAMIFAR, M.; KHEZRI, K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 110, n. September 2018, p. 582–593, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.006>>.

SAJNA, K. V.; GOTTUMUKKALA, L. D.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. White Biotechnology in Cosmetics. In: PANDEY, A.; HÖFER, R.; TAHERZADEH, M., et al. (org). *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*. Elsevier, 2015. cap. 18, p. 807-852.

SANDEWICZ, R. W. Surfactants in Lip Products. In: RHEIN, L. D.; O'LENICK, A.; SCHLOSSMAN, M.; SOMASUNDARAN, P. (org). *Surfactants in personal care products and decorative cosmetics*. Boca Raton: CRC Press, 2007. cap. 12, p. 237-242.

SANGO, D.; BINDER, D. Lip Care Product Formulation Strategies. In: DAYAN, N. (org). *Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide*. Scrivener Publishing LLC, 2017. cap. 19, p. 511–537.

SHARMA, S.; SINGH SAHOTA, S.; KUMAR GARG, R. Investigation on the aged lip-gloss stains by TLC and FT-IR. *International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine*, v. 19, n. 1–2, p. 38–41, 2016.

SHIMIZU, M. S.; NOMURA, Y.; BUI, H. S. Effect of Cosmetic Oils on Lipstick Structure and its Deposit. *Surface Science and Adhesion in Cosmetics*, p. 35–71, 2021.

TAMURA, E.; ISHIKAWA, J.; NAOE, A.; YAMAMOTO, T. The roughness of lip skin is related to the ceramide profile in the stratum corneum. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 38, n. 6, p. 615–621, 2016.

TAMURA, E.; ISHIKAWA, J.; SUGATA, K.; et al. Age-related differences in the functional properties of lips compared with skin. *Skin Research and Technology*, v. 24, n. 3, p. 472–478, 2018.

VARVARESOU, A.; IAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. *Letters in Applied Microbiology*, v. 61, n. 3, p. 214–223, 2015.

ANEXO V – PATENTE DE INVENÇÃO (1/2)

Título da Patente: Bálamo Labial Biotecnológico Multifuncional.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 008390 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/05/2023 às 15:41, Petição 870230036523

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Bálamo labial biotecnológico multifuncional

Resumo:

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um bálamo labial multifuncional que possui em sua composição os bioativos levana (LEV) de *Bacillus subtilis natto* e soforolipídios (SOF) de *Starmerella bombicola*, obtidos por processo biotecnológico. Estes possuem efeito antioxidante, hidratante e capacidade de auxiliar na proliferação dos fibroblastos humanos e queratinócitos, aliado a potencial atividade dos soforolipídios de *Starmerella bombicola* como agentes antimicrobianos e conservantes. Além disso, este produto apresenta perfis sustentável e cruelty free, e incorpora ativos biodegradáveis e naturais. Assim, a invenção propõe que esses compostos biotecnológicos possam ser aplicados na cosmetologia, pois apresentam propriedades dermocosméticas relevantes.

Figura a publicar: Fig1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 02/05/2023 às 15:41, Petição 870230036523

Petição 870230036523, de 02/05/2023, pág. 2/31

LONNI, A. A. S. G. ; **DAHMER, D.** ; CELLIGOI, M. A. P. C. ; BIGOTTO, B. G. ; BERGAMINI, T. A. ; KOBAYASHI, R. K. T. ; NAKAZATO, G. ; CARDOZO, J. G. ; BORSATO, D. . Bálamo labial biotecnológico multifuncional. 2023, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202300839, título: "Bálamo labial biotecnológico multifuncional" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 02/05/2023