



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UTILIZAÇÃO DO COGUMELO COSMESTÍVEL *Lentinus strigosus* PARA O
DESENVOLVIMENTO DE BIOCOSMÉTICO CONTENDO ATIVO NATURAL

ANDRÉA CRISTIANE FISCHBORN

MANAUS

2018



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UTILIZAÇÃO DO COGUMELO COSMÉTICO *Lentinus strigosus* PARA O
DESENVOLVIMENTO DE BIOCOSMÉTICO CONTENDO ATIVO NATURAL

ANDRÉA CRISTIANE FISCHBORN

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

MANAUS

2018

ANDRÉA CRISTIANE FISCHBORN

UTILIZAÇÃO DO COGUMELO COSMESTÍVEL *Lentinus strigosus* PARA O
DESENVOLVIMENTO DE BIOCOSMÉTICO CONTENDO ATIVO NATURAL

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Ceci Sales-Campos - INPA
Coorientador: Dr. Geverson Façanha da Silva - UEA

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F528u Fischborn, Andrea Cristiane
Utilização do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* para o desenvolvimento de biocosmético contendo ativo natural / Andrea Cristiane Fischborn . 2018
121 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ceci Sales-Campos
Coorientador: Geverson Façanha da Silva
Tese (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Extrato fúngico enzimático. 2. Fator de proteção solar. 3. Atividade antioxidante. 4. Formulação cosmética. I. Sales-Campos, Ceci. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Dedico este trabalho aos meus pais Rogério e Leocádia,
aos meus irmãos Adriana e André e aos meus dois
sobrinhos Luan e Guilherme que me apoiaram ao longo
deste caminho.



AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM e ao coordenador Dr. Edmar Andrade, pela oportunidade e condição oferecida, que, com toda sua humildade, sempre esteve disposto a formar novos Mestres e Doutores com alta performance.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso, através do Programa Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade.

Ao Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, pelo espaço cedido na realização de parte dos meus experimentos, e em especial à minha orientadora Dra. Ceci Sales-Campos que teve paciência, acreditando no meu trabalho e na minha capacidade de finalizar esta tese.

Ao meu coorientador Dr. Geverson Façanha da Silva, que participou desde o início da minha caminhada e ao longo desses anos de trabalho tornou-se mais que um mentor, tornou-se parte da minha família, o meu grande amigo, acreditando em mim, se dedicando a me ensinar, enfrentando todos os desafios ao meu lado, aguentando cada “piti” que eu tinha, junto à muitas lágrimas e com certeza muitos sorrisos. Esse “cara” aí, sem sombra de dúvidas, foi a minha maior inspiração pra que eu continuasse a terminar esta tese e para que um dia eu pudesse receber o título de Doutora.

À Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas (EST/UEA), pelo espaço cedido dos laboratórios da C37 e C38 para realização de parte dos meus experimentos, em especial à Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque e ao Dr. Sérgio Duvoisin Júnior.

Agradeço aos meus amigos e colegas, MSc. Tatiana Straatmann, MSc. Cristina Isis Buck Silva, Dra. Fernanda Soares, Dr. Rafael Lopes e Oliveira que de algum modo fizeram parte da minha vida, me auxiliaram de forma direta ou indireta na execução das minhas atividades e principalmente, pelos momentos de descontração, festas e muitos outros que ficarão na lembrança.

Agradeço aos meus bebês felinos, Rufino e Maninha, que me fizeram companhia, deixando meus dias mais felizes e cheio de amor. Agradeço também a Deus, pela força e capacidade que sempre me deu para lutar e vencer todos os obstáculos, alcançando os meus objetivos.

Obrigada!

RESUMO

Atualmente muitos produtos de utilidade para o homem são obtidos por processos biotecnológicos, os quais despertam grande interesse aos pesquisadores e à indústria. O campo de bioprocessos aplicados, também denominado por alguns autores de biotransformação ou tecnologia enzimática, é uma das ferramentas mais promissoras da biotecnologia. A cosmetologia, assim como outras áreas da ciência vem evoluindo e cada vez mais utilizando produtos de biotransformação. Tais produtos são detentores de grandes atividades de interesse para o homem e devem ser investigados mais a fundo para assegurar sua estabilidade físico-química e eficácia de uso dos produtos elaborados. O objetivo proposto para este trabalho foi investigar atividades biológicas dos extratos obtidos da espécie fúngica *Lentinus strigosus* e desenvolver um biocosmético contendo ativo biológico, sendo que, após a conclusão da formulação e de todos os testes macroscópicos e físico-químicos, obteve-se uma máscara capilar contendo o extrato fúngico enzimático. Para este fim, foram testados resíduos de açaí, manga e taperebá, sendo avaliados quanto ao crescimento do fungo *Lentinus strigosus* em fermentação líquida e em fermentação sólida. O resíduo do açaí apresentou resultados satisfatórios e devido a isso, o mesmo foi escolhido para o cultivo submerso, sendo elaborada uma matriz de planejamento fatorial que pudesse avaliar a influência dos nutrientes que possibilitassem o crescimento fúngico e a obtenção de compostos biologicamente ativos. Foram avaliadas a atividade antioxidante e enzimática da lacase e fator de proteção solar. Os extratos do resíduo do açaí apresentaram atividade antioxidante, porém não foi observada a atividade nos extratos fúngicos após a fermentação submersa do fungo com uso deste resíduo. A atividade da lacase assim como o fator de proteção solar foram evidenciados com a evolução do bioprocessos, e um dos fatores favoráveis a atividade da enzima, foi a manutenção do fósforo em sua concentração mais elevada de acordo com a matriz de planejamento fatorial. Após a realização dos experimentos em biorreator, onde se utilizou as mesmas condições do melhor resultado da fermentação submersa, determinando-se o fator de proteção solar, a atividade de lacase, proteína, açúcares redutores e atividade antioxidante; foi elaborada uma formulação biocosmética que continha a atividade encontrada no extrato fúngico enzimático. Foram feitos testes físico-químicos para o melhor desempenho e controle de qualidade do bioproduto elaborado, sendo prospectadas qualitativamente, substâncias químicas (alcaloides, esteroides, flavonoides, saponinas e taninos e fenóis) para o conhecimento dos metabólitos secundários produzidos no cultivo em biorreator. O extrato fúngico enzimático incorporado à formulação elaborada apresentou-se como uma matéria-prima viável para o desenvolvimento de uma máscara capilar.

Palavras-chave: Extrato fúngico enzimático; Fator de proteção solar; Atividade antioxidante; Formulação cosmética.

ABSTRACT

Currently, many products useful to man are obtained by biotechnological processes, which arouse great interest among researchers and in the industry. The field of applied bioprocesses, also called biotransformation or enzymatic technology by some authors, is one of the most promising tools of biotechnology. Cosmetology, like other areas of science, has been evolving and increasingly using biotransformation products. Such products are part of activities of great interest to man and should be thoroughly investigated in order to ensure their physicochemical stability and efficacy of use. The objective of this work was to investigate biological activities of extracts obtained from the fungal species *Lentinus strigosus* and develop a biocosmetic containing biologically active substances. After the formulation and all macroscopic and physicochemical tests were completed, a capillary mask containing the enzymatic fungal extract was obtained. For this purpose, *açaí* (*Euterpe oleracea*), mango and *taperebá* (*Spondias mombin*) residues were initially evaluated for the growth of the fungus *Lentinus strigosus* in liquid and solid fermentation. The *açaí* residue presented the best results and therefore was chosen for the submerged cultivation. A factorial design matrix was elaborated to evaluate the influence of the nutrients that allowed the fungal growth and the obtaining of biologically active compounds. The antioxidant and enzymatic activities of laccase and sun protection factor were evaluated. The extracts of the *açaí* residue presented antioxidant activity, but the activity in the fungal extracts was not observed after the submerged fermentation of the fungus with the use of this residue. Laccase activity as well as the sun protection factor were evidenced with the evolution of the bioprocess, and according to the factorial design matrix, one of the factors favorable to the enzyme activity was the maintenance of the phosphorus in its highest concentration. After the experiments were carried out in the bioreactor - where the same conditions of the best submerged fermentation result were used - and having observed the sun protection factor, laccase activity, protein, reducing sugars and antioxidant activity, it was elaborated a biocosmetic formulation that contained the activity found in the enzymatic fungal extract. Physicochemical tests were performed to evaluate the best performance and for quality control of the elaborated bioproduct. A qualitative chemical prospecting was carried out (alkaloids, steroids, flavonoids, saponins and tannins and phenols) for the knowledge of the secondary metabolites produced in bioreactor cultivation. The enzymatic fungal extract incorporated into the elaborated formulation presented as a viable raw material for the development of a capillary mask.

Keywords: Enzymatic fungal extract; Sun protection factor; Antioxidant activity; Cosmetic formulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento médio da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosmético	24
Figura 2. Esquema apresentando o folículo piloso e glândula sebácea.....	29
Figura 3. Estrutura química do aminoácido cisteína	30
Figura 4. Visão da cutícula de diferentes tipos de cabelos. A) estrutura geral das camadas do cabelo; B) cabelo de afrodescendente; C) cabelo de caucasiano; D) cabelo de asiático	30
Figura 5. Anatomia da pele	33
Figura 6. Camadas que compõe a epiderme.....	34
Figura 7. Classificação das emulsões de acordo com a natureza das fases dispersa e interna	36
Figura 8. Fotomicrografia de uma emulsão múltipla	37
Figura 9. Açai, palmeira (A) que produz um fruto; (B) bacáceo de cor roxa utilizado como alimento	39
Figura 10. Estrutura química geral de um flavonóide (A) e um diterpeno (B)	41
Figura 11. Precursores básicos na formação da lignina	46
Figura 12. Ciclo catalítico da lacase.....	47
Figura 13. Estrutura tridimensional da lacase de <i>Trametes versicolor</i>	48
Figura 14. Estrutura química do Tween 80 (Polisorbato 80)	49
Figura 15. Estrutura química do 2,5 - xilidina.....	49
Figura 16. Espécie fúngica selecionada para o trabalho: <i>Lentinus strigosus</i>	52
Figura 17. Cascas de taperebá secas ao sol (A); estufa caseira (B); cascas de taperebá secas na estufa caseira (C)	53
Figura 18. Cascas de manga retiradas da fruta (A); cascas de manga submetidas ao tratamento de secagem em estufa de circulação (B).....	53
Figura 19. Frascos contendo a espécie fúngica e o meio líquido preparado em diferentes concentrações de nutrientes	55
Figura 20. Shaker contendo os ensaios em agitação	56
Figura 21. Frascos contendo amostras diferentes de extratos de <i>Lentinus strigosus</i> após 18 dias de cultivo.....	57
Figura 22. Filtração a vácuo realizada em cada ensaio após o término do período total da fermentação submersa	58
Figura 23. Biomassa final obtida após a filtração de cada ensaio	58

Figura 24. Biorreator de bancada utilizado na fermentação submersa.....	62
Figura 25. Centrífuga, modelo Centrifuge Model 90-1 utilizada na análise de centrifugação das amostras.....	66
Figura 26. PHmetro digital, modelo CG 1800 da marca GEHAKA utilizado na medição do pH.....	66
Figura 27. Condutivímetro digital, modelo CG-1800 da marca GEHAKA utilizado para análise de condutividade elétrica.....	67
Figura 28. Viscosímetro rotativo analógico da marca Quimis, utilizado para determinação da viscosidade dinâmica das amostras	68
Figura 29. Picnômetro usado para determinação da densidade relativa.....	69
Figura 30. Amostra dispersa após o posicionamento da segunda placa.....	70
Figura 31. Espectros de absorção dos extratos etanólicos dos resíduos agroindustriais (A) e extratos etanólicos fúngicos (B) obtidos da biomassa do cultivo submerso nos diferentes resíduos agroindustriais	73
Figura 32. Frascos contendo resíduo de açaí e <i>Lentinus strigosus</i> : quatro dias de crescimento (A) e 20 dias de crescimento (B).....	74
Figura 33. Atividade enzimática da Lacase em função do tempo (escala de 3 dias - 0 à 18 dias) de fermentação dos 19 experimentos submetidos à fermentação submersa utilizando o fungo <i>Lentinus strigosus</i>	75
Figura 34. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} obtido para a resposta dos valores dos efeitos de cada parâmetro estudado sobre a atividade enzimática de lacase	76
Figura 35. Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática de lacase da espécie <i>Lentinus strigosus</i> cultivado em fermentação submersa utilizando diversas concentrações de nutrientes.....	78
Figura 36. Superfícies de resposta para a atividade enzimática de lacase da espécie <i>Lentinus strigosus</i> como uma função do nitrogênio e do cobre (A) e como uma função do fósforo e do cobre (B).....	79
Figura 37. Curva analítica do ácido ascórbico utilizada para determinação da Atividade Antioxidante. As linhas tracejadas representam o limite de confiança em 95%	80
Figura 38. Atividade antioxidante pelo método do DPPH em função do tempo (escala de 3 dias - 0 a 18 dias) de fermentação dos 19 experimentos submetidos à fermentação submersa utilizando o fungo <i>Lentinus strigosus</i>	82

Figura 39. Fator de Proteção Solar em função do tempo (escala de 3 dias - 0 à 18 dias) de fermentação dos 19 experimentos submetidos à fermentação submersa utilizando o fungo <i>Lentinus strigosus</i>	83
Figura 40. Fator de Proteção Solar do experimento 10, realizada no período de 18 dias em shaker.....	84
Figura 41. Biorreator utilizado na fermentação submersa.....	85
Figura 42. Precipitado floculoso no fundo dos tubos das amostras	86
Figura 43. Frasco da amostra 13 com a coloração característica da presença de esteroide	87
Figura 44. Amostra após agitação e com formação de espuma, indicando presença de saponinas	88
Figura 45. Amostras com aspecto leitoso após a adição de cloreto férrico.....	88
Figura 46. Perfil cinético da produção enzimática de lacase pelo tempo de fermentação por <i>Lentinus strigosus</i> em biorreator	89
Figura 47. Perfil cinético da produção de proteínas pelo tempo de fermentação por <i>Lentinus strigosus</i> em biorreator	91
Figura 48. Absorbâncias obtidas para o cálculo de atividade enzimática e para o cálculo da concentração de proteínas em função do tempo de fermentação de <i>Lentinus strigosus</i> em biorreator	91
Figura 49. Consumo dos açúcares em função do tempo de cultivo realizado no biorreator	93
Figura 50. Absorbância da atividade de lacase em função dos açúcares consumidos durante o período do experimento em biorreator	93
Figura 51. Atividade fotoprotetora das amostras coletadas do biorreator no período de 30 dias.....	94
Figura 52. Emulsões O/A (óleo em água) após 24h de sua elaboração em triplicata preparadas com extratos fúngicos contendo lacase por meio de fermentação	96
Figura 53. Emulsões apresentando maior separação de fases	97
Figura 54. Emulsões apresentando menor separação de fases	97
Figura 55. Formulações apresentando as mesmas características macroscópicas	98
Figura 56. Amostras das formulações com bases distintas após o teste de centrifugação .	98
Figura 57. Gráfico com os perfis de espalhabilidade das formulações com diferentes tensoativos	104

Figura 58. Gráfico com os perfis de espalhabilidade para diferentes tipos de bases auto emulsionantes 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipo, aparência da emulsão e tamanho da partícula da fase interna.....	38
Tabela 2. Classificação da proteção UVA em função do comprimento de onda crítico	43
Tabela 3. Variáveis e seus níveis utilizados para os ensaios de fermentação submersa	56
Tabela 4. Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1}	57
Tabela 5. Ponderação empregada no cálculo por espectrofotometria	61
Tabela 6. Faixas de viscosidade medidas pelo viscosímetro da marca Quimis, de acordo com o rotor e a velocidade de rotação utilizada	68
Tabela 7. Análise do fator de proteção solar do extrato etanólico dos resíduos agroindustriais e da biomassa obtida no cultivo submerso do fungo nos diferentes resíduos	72
Tabela 8. Resultados da atividade antioxidante dos extratos obtidos da espécie <i>Lentinus strigosus</i> dos diferentes experimentos em função do planejamento experimental.....	81
Tabela 9. Testes fitoquímicos realizados nas alíquotas obtidas do biorreator durante os 30 dias de experimento	86
Tabela 10. Valores de EHL para as emulsões tipo O/A com diferentes concentrações de tensoativos	96
Tabela 11. Valores de pH para as formulações contendo diferentes tensoativos.....	99
Tabela 12. Valores de pH para diferentes tipos de bases auto emulsionantes.....	100
Tabela 13. Valores de condutividade para as formulações contendo diferentes tensoativos	100
Tabela 14. Valores de condutividade para diferentes tipos de bases auto emulsionantes	101
Tabela 15. Valores de densidade relativa para as formulações contendo diferentes tensoativos	101
Tabela 16. Valores de densidade relativa para diferentes tipos de bases auto emulsionantes	102
Tabela 17. Valores de sólidos totais para as formulações contendo diferentes tensoativos	102
Tabela 18. Valores de sólidos totais para diferentes tipos de bases auto emulsionantes .	103
Tabela 19. Valores de viscosidade para as formulações contendo diferentes tensoativos	103
Tabela 20. Valores de viscosidade para diferentes tipos de bases auto emulsionantes....	104

ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitros
ABS – Absorbância
BDA – meio ágar batata dextrose
BOD – incubadora ou estufa (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
BSA – Albumina de soro bovino
 CH_3 - Metil
 CO_2 – Gás carbônico
COLIPA – European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association
cP – centipoise
CTFA – Cosmetic, Toiletries and France Association
 Cu^{2+} - Cobre
 CuSO_4 – Sulfato de Cobre
EHL – Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
ERO'S – Espécies Reativas de oxigênio
FOH – Substrato fenólico
FPS – Fator de Proteção Solar
g/L – gramas por litro
 H_2O – Água
 H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
 H_2SO_4 – Ácido sulfúrico
HCl – Ácido clorídrico
L/min – Litro por minuto
Mg – Magnésio
 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ – Micrograma por mililitros
mL – mililitros
mM – milimolar
 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ – Milimolar por litro
 Mn^{+2} - Manganês
NaOH – Hidróxido de sódio
 NH_2 - radical amino
nm – nanômetros
NMF – Natural Moisturizing Factor
O/A – Óleo em água
 O_2 – Oxigênio
 $^\circ\text{C}$ – graus Celsius
Pa.s – Pascal segundo
RL – Radical livre
rpm – rotação por minuto
S-S – Ligações de sulfeto
U – Unidade de atividade enzimática
 U/L^{-1} – Unidade por Litro
 U/mL^{-1} – Unidade por mililitros
UV - Ultravioleta
 λ_c – comprimento de onda crítico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 COSMÉTICOS	23
3.1.1 História dos cosméticos	23
3.1.2 Panorama do setor cosmético	24
3.1.3 Legislação de cosméticos	25
3.1.4 Produtos cosméticos	27
3.2 CABELOS	28
3.3 PELE	32
3.3.1 Flora Cutânea	33
3.3.2 Filme ou Manto Hidrolipídico	33
3.3.3 Epiderme	34
3.4 EMULSÕES	35
3.4.1 Processo de Emulsificação	36
3.4.2 Tipos de Emulsões	36
3.5 FITOCOSMÉTICOS	37
3.5.1 Açaí	39
3.5.2 Atividade Antioxidante	40
3.5.3 Fator de Proteção Solar	42
3.6 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	43
3.7 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA OBTENÇÃO DE COSMÉTICOS ...	44
3.7.1 Degradação da Lignina por Enzimas	45

3.7.2 Lacases	46
3.7.3 Análise Estrutural da Lacase	47
3.7.4 Fatores de Influência na Produção de Lacases	48
3.7.5 Fungos	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 ESPÉCIE FÚNGICA	52
4.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	52
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	53
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO FÚNGICO A PARTIR DO CULTIVO SUBMERSO DO FUNGO EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	54
4.5 TESTE DE CRESCIMENTO FÚNGICO EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA NOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	54
4.6 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO PARA A FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	55
4.7 MATRIZ DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA	56
4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.....	58
4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	59
4.10 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR	60
4.11 PRODUÇÃO EM BIORREATOR NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS	61
4.11.1 Dosagem de Proteínas	62
4.11.2 Dosagem de Açúcares Redutores	62
4.12 PROSPECÇÃO QUÍMICA DAS ALÍQUOTAS OBTIDAS NO BIORREATOR.	63
4.12.1 Teste para Alcalóides	63
4.12.2 Teste para Esteroides	63
4.12.3 Teste para Flavonoides	63
4.12.4 Teste para Saponinas	64
4.12.5 Teste para Taninos e Fenóis	64
4.13 PREPARO DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA.....	64

4.13.1	Análise Macroscópica da Formulação.....	65
4.13.2	Análise dos Parâmetros Físico-químicos.....	65
4.13.2.1	Análise de centrifugação	65
4.13.2.2	Determinação do Valor do pH.....	66
4.13.2.3	Condutividade elétrica.....	67
4.13.2.4	Sólidos totais	67
4.13.2.5	Viscosidade Dinâmica	67
4.13.2.6	Densidade Relativa.....	69
4.13.2.7	Teste de Espalhabilidade	70
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	ANÁLISE DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DOS RESÍDUOS E DA BIOMASSA DO CULTIVO SUBMERSO	72
5.2	TESTE DE CRESCIMENTO FÚNGICO POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	73
5.3	FERMENTAÇÃO SUBMERSA OBTIDA POR DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	74
5.3.1	Atividade Enzimática de Lacase	75
5.3.2	Atividade Antioxidante	80
5.3.3	Fator de Proteção Solar	82
5.4	ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM BIORREATOR	84
5.4.1	Prospecção química de metabólitos secundários.....	85
5.4.2	Atividade de Lacase	89
5.4.3	Proteínas.....	90
5.4.4	Açúcares Redutores.....	92
5.4.5	Fator de Proteção Solar	94
5.4.6	Atividade Antioxidante	95
5.5	OBTENÇÃO E ANÁLISE DA FORMULAÇÃO	95

5.5.1	Elaboração das Emulsões	95
5.5.2	Análise Macroscópica	96
5.5.3	Análise Físico-química	98
5.5.3.1	Análise de pH	99
5.5.3.2	Análise de Condutividade.....	100
5.5.3.3	Análise de Densidade Relativa	101
5.5.3.4	Análise de Sólidos Totais	102
5.5.3.5	Análise de Viscosidade.....	103
5.5.3.6	Análise de Espalhabilidade.....	104
6	CONCLUSÕES.....	106
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1 INTRODUÇÃO

Muitos produtos de utilidade para o homem são obtidos por processos biotecnológicos, os quais despertam grande interesse aos pesquisadores e à indústria. O campo de bioprocessos aplicados, também denominado por alguns autores de biotransformação ou tecnologia enzimática, é uma das ferramentas mais promissoras da biotecnologia (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004).

Os diversos bioprocessos já descritos na literatura são administrados através da ação de agentes biológicos, entre os quais, citam-se os processos fermentativos com o uso de microrganismos em suas reações. Estes processos fermentativos são importantes fontes de produtos biológicos usados em algumas indústrias, como a alimentícia, a farmacêutica e a química, onde o grande aumento na quantidade de bioprodutos comerciais foi observado na última década (PEREIRA JR., BON e FERRARA, 2008).

Para o desenvolvimento de um bioprocessos, a natureza do substrato sólido empregado em uma fermentação sólida é o fator mais importante, sendo a sua seleção dependente de diversos fatores, principalmente do custo e da sua disponibilidade. Pesquisas, voltadas para o uso de resíduos agroindustriais de todo o mundo, vêm sendo feitas a fim de selecionar substratos adequados para a fermentação sólida (ZADRAZIL e PUNIA, 1995, SALES-CAMPOS, 2008).

A fermentação submersa começou a ser estudada quando a fermentação sólida foi completamente ignorada em países ocidentais a partir de 1940. Ela se tornou um modelo de fermentação para a produção de enzimas quando ocorreu o auge do desenvolvimento da penicilina durante o período de guerra (PANDEY, 2003). Os processos submersos constituem os meios mais interessantes para a produção de enzimas, pois se torna fácil a incorporação dos nutrientes ao meio de cultivo e as condições uniformes para o crescimento microbiano, pH estabilizado e outras variáveis relacionadas ao meio são facilmente controláveis em relação a fermentação sólida (LIMA, 2009).

O Brasil é um país rico em biomassa e em resíduos agroindustriais. O acúmulo destes resíduos gera poluição no meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos etc.

(PANDEY et al., 2000a; GRAMINHA et al., 2008, MENEZES, SILVA e DURRANT, 2009).

O cultivo de fungos ou cogumelos comestíveis, um processo de reciclagem de resíduo lignocelulósico que associa a produção de alimento rico em proteína com a redução da poluição ambiental, além de ser simples e barato está sendo reconhecido como a segunda tecnologia mais importante para os próximos anos, visto que representa uma alternativa benéfica para o desenvolvimento de produtos que contribuem para melhoria da qualidade de vida e do crescimento econômico (BARRETO e FRANCO, 2006; SÁNCHEZ, 2010; SALES-CAMPOS, 2013).

Cogumelos do gênero *Lentinus* são fungos decompositores primários, ou seja, fungos que degradam elementos estruturais do resíduo lignocelulósico. Por isso quando se trabalha com os mesmos, é importante assegurar-se que o material a ser utilizado no cultivo não tenha sofrido decomposição por microrganismos durante a armazenagem. Se ele já for degradado, a colonização por estes fungos será prejudicada e o ataque de outros organismos será facilitada, causando uma redução na produtividade (MAZIERO, 1990).

Há muito tempo, cogumelos demonstram atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana) de caráter terapêutico, sendo também, utilizados em muitas terapias (antitumorais, antivirais, antimutagênica e antiproliferativa), principalmente por povos orientais (YANG, LIN e MAU, 2002; NGAI e NG, 2004). Também são utilizados como imunomodulatórios, anticancerígenos, antiinflamatórios, antitrombóticos, possuindo ainda, efeitos positivos sobre hipoglicemia e funções cardíacas (YILMAZ et al., 2006).

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (ROSAS, 2003). Várias espécies de fungos são usadas para a produção de enzimas industrialmente importantes, tais como proteases, celulasas, amilases, lipases, entre outras (ALVES et al., 2002).

Devido à crescente aplicabilidade de enzimas e antioxidantes na área biotecnológica, pesquisas por novas linhagens microbianas são vistas com interesse industrial e a biodiversidade da Amazônia é uma grande fonte para obtenção de tais enzimas.

A adição de bioprodutos microbianos como enzimas em produtos cosméticos agrega benefícios e valor comercial aos mesmos, pois devido à presença de metabólitos secundários como os fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros, conferem uma série de atividades clínicas desejadas pela indústria cosmética, como ação antioxidante, anti-

inflamatória, antienvelhecimento e fotoprotetora. Da mesma forma, um biocosmético ao ser formulado precisa de estudos de estabilidade física e química, pois a substituição de um ou mais componentes da formulação implica em mudanças das características físico-químicas da mistura final.

Neste contexto, o presente estudo busca investigar atividades biológicas dos extratos obtidos das espécies do fungo *Lentinus strigosus* proveniente de cultivo em biorreator para a formulação de um bioproduto cosmético.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar atividades biológicas dos extratos obtidos da espécie fúngica *Lentinus strigosus* para a formulação de um bioproduto cosmético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar os resíduos agroindustriais de açaí, manga e taperebá, como substrato em meio fermentativo líquido e sólido com o fungo *Lentinus strigosus*;
- Selecionar o melhor resíduo para a fermentação submersa com a espécie *Lentinus strigosus* utilizando diferentes concentrações de nutrientes (fósforo, nitrogênio, magnésio) e de indutores de produção de lacase (glicerina bidestilada e cobre);
- Investigar nos diferentes extratos fúngicos obtidos na fermentação submersa a existência de atividade enzimática de lacase, atividade antioxidante e fator de proteção solar;
- Otimizar em biorreator de bancada, as variáveis que influenciaram significativamente os resultados obtidos na fermentação submersa, verificando também a dosagem de açúcares redutores e produção de proteína;
- Formular um produto biocosmético contendo extrato ativo de *Lentinus strigosus*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 COSMÉTICOS

3.1.1 História dos cosméticos

A palavra *cosmético* deriva da palavra grega *kosmetikós*, que significa “hável em adornar”. Há relatos do uso de cosméticos há pelo menos 30.000 anos, utilizando-se pinturas com objetivo de rituais e decoração do corpo. Existem evidências arqueológicas do uso de cosméticos para embelezamento e higiene pessoal desde 4.000 anos a.C. sendo que os primeiros registros oficiais encontrados tratam dos egípcios, que pintavam os olhos com sais de antimônio para evitar a contemplação direta do deus Ra, representado pelo sol. Uma corrente de teóricos relata que além dos fins religiosos também servia para proteger sua pele das altas temperaturas e secura do clima desértico da região, os egípcios recorriam à gordura animal e vegetal, cera de abelhas, mel e leite no preparo de cremes para a pele. Existem registros de historiadores romanos relatando que a rainha Cleópatra frequentemente se banhava com leite para manter pele e cabelos hidratados (GALEMBECK e CSORDAS, 2009).

Alguns relatos também foram encontrados sobre o uso de produtos naturais em elaborações cosméticas, especificamente, o uso de extratos, mel, resinas, corantes e óleos essenciais desde a Antiguidade em lugares como a China, Índia e outros países do Oriente Médio, que utilizavam essas plantas em preparações caseiras com fins cosméticos, medicinal e nas práticas religiosas (SEBRAE, 2008).

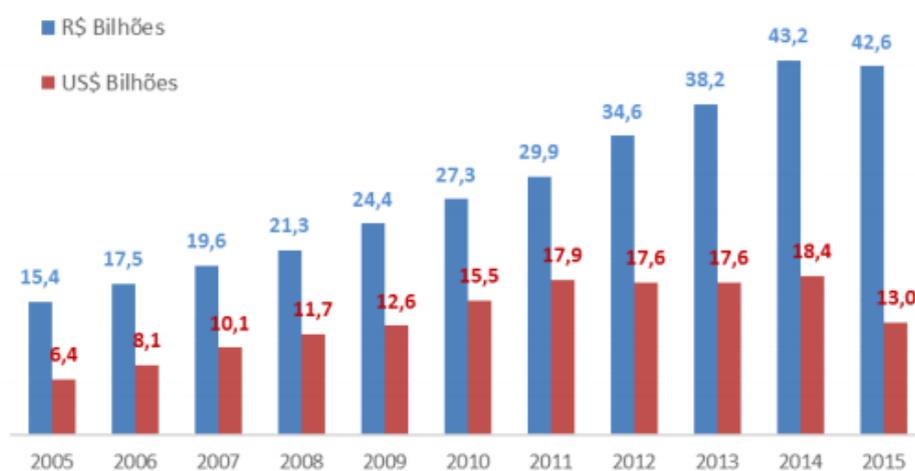
Por volta de 180 anos d.C., um médico grego chamado Claudius Galeno elaborou um precursor dos atuais cremes, um produto chamado *Unguentum refrigerans* composto de cera de abelha, bórax, óleo de oliva e água de rosas, um creme frio usado sobre a pele para prolongar a sensação de frescor. No início do século XX, em função da necessidade de as mulheres comprarem produtos prontos, pois muitas delas já trabalhavam fora de casa, houve o surgimento da indústria de cosméticos (SEBRAE, 2008).

O setor de cosméticos no mundo vem apresentando grande dinamismo, principalmente devido ao crescimento observado nos países emergentes. Apesar do aumento da importância dos países em desenvolvimento, a produção e as exportações continuam

sendo dominadas pelos países desenvolvidos, que ao mesmo tempo são a sede das grandes empresas mundiais do setor (ABDI, 2008).

3.1.2 Panorama do setor cosmético

Em 10 anos, a Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos apresentou um crescimento médio deflacionado composto, tendo passado de um faturamento "Ex-Factory", líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 15,4 bilhões em 2005 para R\$ 42,6 bilhões em 2015, conforme apresentado na **Figura 1** (ABIHPEC, 2016).



Fonte: ABIHPEC, 2016

Figura 1. Crescimento médio da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosmético

Segundo a ABIHPEC (2016), vários fatores têm contribuído para este excelente crescimento do setor, dentre os quais se pode destacar:

- Acesso das classes D e E aos produtos do setor, devido ao aumento de renda.
- Os novos integrantes da classe C passaram a consumir produtos com maior valor agregado;
- Participação crescente da mulher brasileira no mercado de trabalho;
- A utilização de tecnologia de ponta e o conseqüente aumento da produtividade, favorecendo os preços praticados pelo setor, que tem aumentos menores do que os índices de preços da economia em geral;
- Lançamentos constantes de produtos atendendo cada vez mais às necessidades do mercado;

- Aumento da expectativa de vida, o que traz a necessidade de conservar uma impressão de juventude.

Conforme Cerqueira (2013), os cosméticos constituem um segmento de mercado de destaque. Isso se deve também a uma participação ativa e constante dos consumidores dos cosméticos, que passaram também a usá-los com maior frequência em seu dia a dia.

No cenário de indústrias cosméticas, existem no Brasil, em média, 2.600 empresas atuando no mercado de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, sendo que 20 empresas de grande porte, com faturamento líquido de impostos acima dos R\$ 100 milhões, representando 73,0% do faturamento total (ABIHPEC, 2016).

3.1.3 Legislação de cosméticos

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), cosméticos são definidos pela sua finalidade, como “objetos destinados a serem esfregados, derramados, aspergidos, ou pulverizados sobre, introduzidos ou não, aplicados ao corpo humano para limpeza, embelezamento, promovendo atratividade, ou alterar a aparência”. Entre os produtos incluídos nesta definição encontram-se os hidratantes de pele, perfumes, batons, esmaltes de unha, maquiagem facial e para olhos, xampus, tintura de cabelo e desodorantes, bem como qualquer outra substância destinada para uso como um produto cosmético (FDA, 2012).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão local que norteia o seguimento, define cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumaria como “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (ANVISA, 2004).

É importante ressaltar que a ANVISA está adequando o padrão brasileiro ao padrão internacional, o que significa que as exigências para o registro de produtos cosméticos no mercado brasileiro não são muito diferentes das exigências de registro no mercado internacional, o que facilita, por exemplo, a atividade de exportação (ABDI, 2008).

Por maior popularidade e exigências por parte dos consumidores, esse tipo de produto tornou-se motivo de pesquisas acadêmicas e de mercado em diversos campos de estudo (CERQUEIRA, 2013). Por isso, a utilidade dos testes de estabilidade dos cosméticos

que visa à qualidade do produto que permitem a segurança do seu uso, a estabilidade da formulação, o aspecto, o sensorial e a sua eficácia tornam-se imprescindíveis para o desenvolvimento do produto. Atualmente, existem legislações e manuais vigentes à boa prática de fabricação destes produtos, mas seu uso e comércio ainda são indiscriminados. São vários os fatores que interferem na estabilidade de um produto, podendo atuar desde a matéria-prima até o produto acabado pós-venda, necessitando de um controle e um estudo em todo processo de fabricação (MORAES e CANUTO, 2011).

Outro fator pertinente é a estimativa do prazo de validade de uma formulação que é caracterizado como o período de vida útil, durante o qual o produto mantém suas características originais. Antes de ser um requisito legal, é, sobretudo requisito técnico de qualidade, pois um produto instável do ponto de vista físico-químico, microbiológico ou toxicológico, além de perda de eficácia poderá também causar algum dano e comprometer a confiabilidade frente ao consumidor, conforme Resolução - RE nº1, de 29 de julho de 2005 (ANVISA, 2005).

De acordo com a Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, os produtos cosméticos são classificados em dois tipos:

a) **Produtos Grau 1:** são produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com a definição adotada no item 1 do Anexo I desta Resolução e que se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requeiram informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto;

b) **Produtos Grau 2:** são produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com a definição adotada no item 1 do Anexo I desta Resolução e que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso.

Independentemente do tamanho da empresa e do tipo de produto fabricado, as empresas devem seguir as normas sanitárias que abrangem desde o projeto para a instalação da fábrica até o lançamento de um novo produto no mercado. Esses cuidados são necessários, não só para assegurar a qualidade do produto, como também para preservar a saúde do consumidor e garantir a proteção do meio ambiente (BARBOSA, 2006).

Com isso, uma das características importantes do setor cosmético é a regulamentação, pelo fato de incorporar produtos naturais e sintéticos, aplicados diretamente nas partes externas do corpo, assim existe a necessidade de mecanismos de controle por parte

de agências especializadas, que regulamentam sua manipulação industrial e buscam evitar que sua utilização cause danos à saúde dos usuários. Recentemente, tem havido um esforço de harmonização por parte das agências de regulamentação com a elaboração de várias listas com ingredientes permitidos, restritos ou proibidos (ABDI, 2008).

3.1.4 Produtos cosméticos

O produto cosmético mais consumido no Brasil é o sabonete, e tem como principal função limpar a pele, removendo as impurezas e eliminando os resíduos da pele. De acordo com a ABIHPEC (2012), são consumidas aproximadamente 218 mil toneladas de sabonetes em barra e 4,8 mil toneladas de sabonetes líquidos, sendo o segundo maior consumidor mundial deste produto per capita (MOTTA, 2007; GALEMBECK e CSORDAS, 2009).

Os sabonetes são encontrados, geralmente, nas formas sólidas, líquidas ou pastosas, e podem ser utilizados em diferentes situações, de acordo com o costume popular. O sabonete na forma sólida é o mais utilizado para o banho, e costuma-se utilizar os sabonetes pastosos para se barbear ou para depilação. Os sabonetes líquidos são utilizados para ambos os fins, e o seu uso tem alcançado mais adeptos com o passar do tempo (MERCANTE et al., 2009).

A base é a diferença no processo de fabricação de sabonetes líquidos e em barra, onde se utiliza a reação de gorduras vegetais ou animais com soda cáustica para obtenção da base para os sabonetes em barra. Após esse processo são adicionados preservantes, corantes e o produto é prensado. Os sabonetes líquidos são obtidos em uma única etapa através da mistura de diferentes surfactantes e os já citados preservantes, emolientes, corantes, hidratantes e perfumes (MOTTA, 2007), e podem subdividir-se entre sintéticos, aqueles feitos com compostos previamente processados a partir do petróleo ou de plantas, e naturais, produzidos por reação direta entre óleos e uma base (UNIOESTE, 2009). Devido ao processo de fabricação, é muito mais fácil agregar um número maior de ingredientes benéficos para a pele aos sabonetes líquidos (MOTTA, 2007).

Nos tempos antigos, os cabelos eram lavados com ervas e argilas para limpar, matar piolhos e combater infestações do couro cabeludo. Extratos de plantas e essências de rosas e jasmim eram usados para tratar a calvície, amaciar os cabelos e diminuir a oleosidade dos fios. No período da Idade Média, os cuidados com os cabelos foram esquecidos. Durante os

séculos XV e XVI, eles eram geralmente lavados a seco com argila em pó e depois escovados (KOHLENER, 2011).

O processo de saponificação foi inicialmente obtido através da fervura da mistura de soda cáustica, gordura animal e óleos naturais. Durante séculos, o sabão que lavava a roupa era o mesmo que lavava os cabelos. O primeiro sabão líquido destinado especificamente para lavar os cabelos foi criado em 1890, na Alemanha. Era um produto de luxo e pouco acessível, que só chegou para a população após a Primeira Guerra Mundial. A palavra xampu é derivada da palavra hindu “champo” e significa massagear, amassar, apertar (MOTTA, 2007).

No início do século XX existiam estabelecimentos onde eram oferecidos banhos parecidos como os turcos, mas com massagens terapêuticas. Os profissionais preparavam misturas com ervas, fragrâncias e água que eram cozidas e aplicadas nas cabeças dos clientes. Os xampus ganharam mais popularidade a partir da expansão da indústria de higiene e beleza. O primeiro xampu com base sintética foi lançado pela Procter e Gamble em 1934 (KOHLENER, 2011).

A função principal de um xampu é limpar os cabelos e o couro cabeludo, remover suor, restos celulares, íons, ácidos graxos dos produtos de cabelo, partículas metálicas oxidadas e impurezas do couro cabeludo. Atualmente, o xampu é um dos produtos de higiene pessoal mais procurados pelos consumidores, que estão cada vez mais exigentes. Por isso, o produto deve não somente limpar, mas também ajudar na estética dos cabelos (ABRAHAM et al., 2009; CALEFFI et al., 2009).

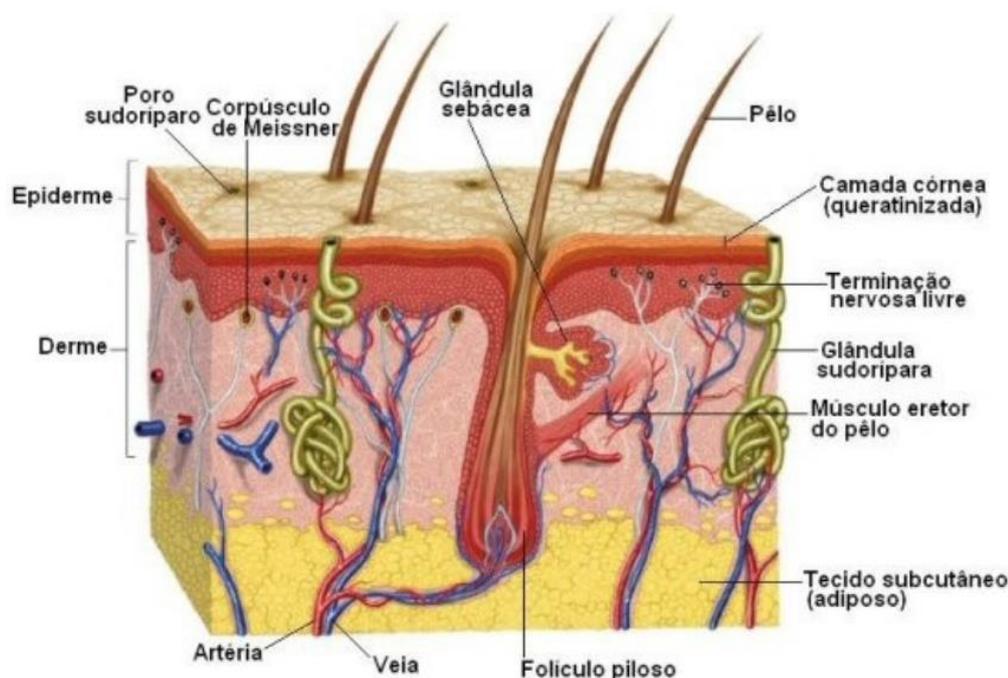
Segundo Motta (2007), as matérias-primas de um xampu são, o produto base (detergente), o agente espessante, o agente engordurante, o estabilizador de espuma, o agente perolante, o conservante, as essências, os corantes, os aditivos especiais e os diluentes.

3.2 CABELOS

Os cabelos têm um papel social importante na sociedade desde os tempos antigos e muitas vezes servem como forma de expressão. Ao longo da história, os cabelos sempre foram um importante elemento de adorno pessoal. Desde os cachos dos reis assírios até o elegante corte de cabelo dos faraós, o cabelo foi mostrado, admirado e invejado. Além da função estética, os cabelos possuem funções naturais, a principal é proteger o corpo de certas

condições naturais como raios de sol e frio. Estas funções se tornaram menos importantes devido à evolução antropológica (WOLFRAM, 2001; HURTADO e HUERTAS, 2010).

O fio de cabelo pode ser definido como uma estrutura queratínica morta secretada pelo folículo piloso, localizado na raiz do cabelo, que constantemente produz células empilhadas e queratinizadas que dão origem à haste capilar (WOLFRAM, 2001; KOHLER, 2011). A **Figura 2** apresenta o folículo piloso e a glândula sebácea.



Fonte: www.colegioweb.com.br (2012)

Figura 2. Esquema apresentando o folículo piloso e glândula sebácea

As glândulas sebáceas são estruturas responsáveis por produzir o sebo com seus canais excretores localizados na parte superior do folículo. A função do sebo é lubrificar os pelos e a pele e sua composição química possui ceras monoésteres – 25%, triglicerídeos – 41%, ácidos graxos livres – 16% e esqualeno – 12% (KOHLER, 2011).

A estrutura do cabelo é formada por proteínas chamadas α -queratinas, constituídas por uma sequência de 15 a 22 aminoácidos. A queratina se distingue das outras proteínas pelo seu alto teor de ligações dissulfetos provenientes do aminoácido cisteína (**FIGURA 3**). Estas ligações formam uma rede tridimensional com alta densidade de ligações cruzadas, o que proporciona ao cabelo uma alta resistência química. A queratina é uma proteína fibrosa, resistente, com boa elasticidade e impermeável à água. Outras proteínas que constituem a estrutura do fio de cabelo são, o colágeno e a elastina. O colágeno é responsável pela forma

e resistência; e a elastina é importante para manter a elasticidade e o cabelo saudável (NOGUEIRA, 2003; WAGNER, 2006; KOHLER, 2011).

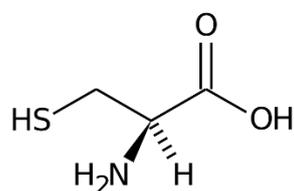
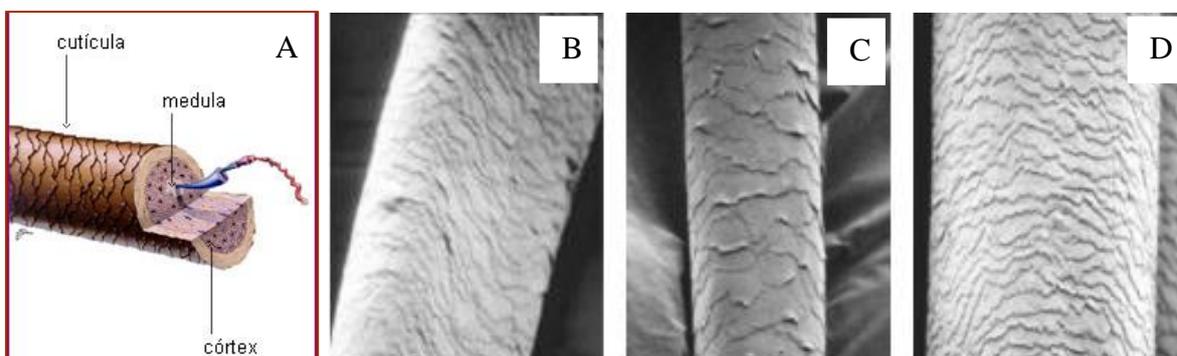


Figura 3. Estrutura química do aminoácido cisteína

O fio de cabelo pode ser dividido em três camadas: cutícula, córtex e medula; conforme demonstrado na **Figura 4**.



Fonte: Kohler (2011) e <http://www.produtosdebeleza.com/wp-content/uploads/2012/02/tipos-de-fios.jpg>

Figura 4. Visão da cutícula de diferentes tipos de cabelos. A) estrutura geral das camadas do cabelo; B) cabelo de afrodescendente; C) cabelo de caucasiano; D) cabelo de asiático

A cutícula, que representa cerca de 10% da fibra, é o revestimento externo capilar e possui a função principal de proteger o córtex. Ela é formada por pequenas camadas de escamas incolores de queratina que se superpõem sobre o córtex, se encaixando e se ajustando numa direção preferencial, que vai da raiz até a ponta dos cabelos, acompanhando seu crescimento natural. As escamas, de seis a dez, se unem por um cimento intercelular rico em lipídeos. A cutícula tem a função de proteger o cabelo contra danos externos e é responsável por características sensoriais como maciez e brilho (NOGUEIRA, 2003; BAILER et al., 2009; HURTADO e HUERTAS, 2010).

O córtex, cerca de 88% da fibra, é o corpo principal do cabelo e é composto por células de queratina de fibras longas interligadas por cadeias de polipeptídeos, formando a configuração de uma hélice tridimensional. Esta organização confere ao fio de cabelo as suas

propriedades mais marcantes. O tipo, o tamanho e a quantidade dos grânulos de melanina que formam o córtex definem a cor do cabelo e sua fotoproteção. Produtos que alteram a estrutura do cabelo como alisantes, coloração e relaxantes atuam nessa camada quebrando ou formando ligações químicas na sequência de aminoácidos (WOLFRAM, 2001; NOGUEIRA, 2003; WAGNER, 2006; BAILER et al., 2009.; KOHLER, 2011). A camada central ou medula, cerca de 2% da fibra capilar, pode ser oca ou não, dependendo da estrutura genética do indivíduo. Ela está localizada no centro do cabelo e sua presença é descontínua ou, em alguns casos, até ausente. A função desta camada em humanos é desconhecida, porém em alguns animais ela possui papel de termorregulação (NOGUEIRA, 2003; WAGNER, 2006; KOHLER, 2011).

Uma pessoa saudável tem de 10^5 a $1,5 \times 10^5$ fios de cabelo e repõe em média de 50 a 100 cabelos por dia. Cada cabelo cresce aproximadamente 1,5 cm ao mês. Independente da forma do cabelo, a única característica que muda na composição química básica do fio é a sequência de aminoácidos da queratina. O que define a forma do cabelo é a sua seção transversal e o folículo piloso. Os cabelos lisos possuem uma seção transversal mais grossa e cilíndrica e o folículo é completamente reto, enquanto os cabelos crespos apresentam uma seção transversal achatada e fina e folículo piloso em forma de espiral, já os cabelos encaracolados ou ondulados têm seção transversal variada, mais ou menos elíptica e folículo intermediário (NOGUEIRA, 2003; VARELA, 2007; KOHLER, 2011). O cabelo vive um ciclo regular composto por três fases. A fase anágena corresponde ao crescimento ativo do cabelo e dura de três a seis anos. A fase catágena é quando o cabelo começa a morrer e dura aproximadamente três semanas. Na fase telógena, o cabelo morto é empurrado por um novo fio; esse processo dura aproximadamente três meses (WOLFRAM, 2001; KOHLER, 2011).

Os elementos químicos que compõem o fio de cabelo são os seguintes: carbono – 43,72 %, hidrogênio – 6,34 %, nitrogênio – 15,6 %, oxigênio – 29,93 % e enxofre – 4,85 % (KOHLER, 2011).

Três importantes ligações químicas acontecem no córtex, são elas: ligação de dissulfeto, ligação de hidrogênio e ligação iônica. A estrutura da cadeia polipeptídica possui uma forma helicoidal com 3,7 aminoácidos em cada volta da hélice. Cada volta da hélice se fixa com a outra por ligações de hidrogênio formando uma cerda elementar que, por sua vez, é ligada a outra cerda retorcida por ligações dissulfeto e por ligações iônicas (VARELA, 2007).

A ligação de dissulfeto é formada pela união de dois grupos tiol (-SH), oriundos de duas moléculas de aminoácido cisteína. Produtos como tioglicolato de amônio ou cremes alcalinos para alisamento com pH acima de 10 são capazes de romper essas ligações, ocasionando uma transformação permanente (KOHLENER, 2011).

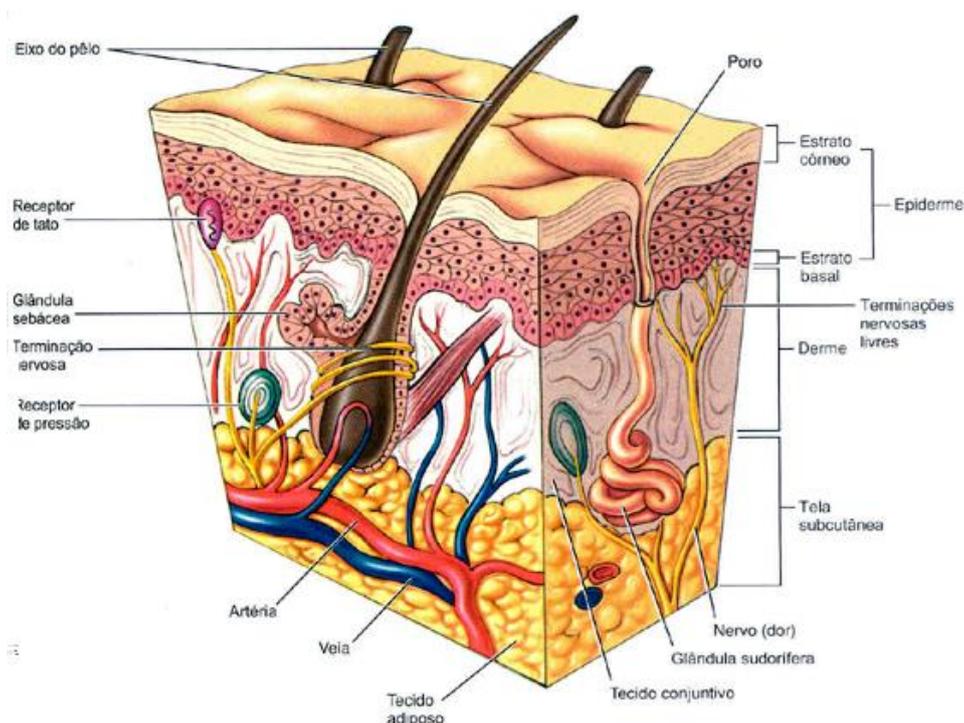
A ligação de hidrogênio ocorre entre átomos de H de hidroxilas (-OH) provenientes de dois aminoácidos diferentes. Graças a essas ligações é mais fácil modificar a forma do cabelo quando ele está molhado, pelo simples fato de molhar e escovar os cabelos sua extensão é aumentada, ocasionando uma transformação temporária (KOHLENER, 2011).

A ligação iônica é baseada na atração eletrostática entre dois íons carregados com cargas opostas. São ligações resistentes que podem ser quebradas com produtos bastante ácidos ou alcalinos. É possível modificar o formato do cabelo quando estas ligações são rompidas, porém nunca se deve quebrar ligações iônicas e de dissulfeto ao mesmo tempo, pois isso causa a dissolução do fio (KOHLENER, 2011).

3.3 PELE

A pele forma a superfície externa contínua ou tegumento do corpo, sendo o maior órgão, constituindo quase um sexto do seu peso total (1,75m²). É representada pela epiderme com o seu manto córneo, a qual se assenta sobre um tecido de sustentação fibrilar, a derme, que por sua vez, repousa sobre o panículo célula-adiposo da hipoderme (YANNAS, 2015). A pele possui as funções principais de: (i) proteção contra lesões mecânicas, químicas e térmicas; (ii) termo-regulação, impedindo a perda de calor; (iii) impermeabilidade à água sobre a entrada ou saída dela no organismo (conservação de fluidos); (iv) barreira física a organismos patogênicos; e (v) detecção de estímulos sensoriais.

Segundo Stamatas et al. (2011), apesar dessas variações que refletem diferentes demandas funcionais, todos os tipos de pele possuem a mesma estrutura básica. A pele espessa cobre a palma da mão e a planta dos pés, possui glândulas sudoríparas, mas não possuem folículos pilosos (pele glabra), músculos eretores do pêlo e glândulas sebáceas. A pele delgada cobre a maior parte do resto do corpo e contém folículos pilosos, músculos eretores do pêlo, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (pele pilificada) (**FIGURA 5**).



Fonte: <http://www.fisioterapiae.saude.com/wp-content/uploads/2012/02/pele6.jpg>

Figura 5. Anatomia da pele

3.3.1 Flora Cutânea

A pele é preenchida em toda a sua superfície por diversos tipos de microrganismos (fungos ou bactérias), constituindo a flora cutânea. Ela é formada por uma flora chamada residente ou permanente, contendo germes saprófitos, normalmente não patogênicos, mas podendo tornar-se patogênica devido a certas condições. Em sua constituição também há uma flora transitória ou patogênica, resultantes da contaminação diária. Os microrganismos que a compõem são hóspedes acidentais da pele, cuja sobrevivência sobre o território cutâneo é fraca e temporária. A competição entre os microrganismos permanentes e os transitórios permite uma proteção relativa contra estes últimos. É, portanto, primordial conservar a flora cutânea resistente em bom estado, garantindo maior proteção contra a inoculação de microrganismos patogênicos (AL-GHAZZEWI e TESTER, 2014).

3.3.2 Filme ou Manto Hidrolipídico

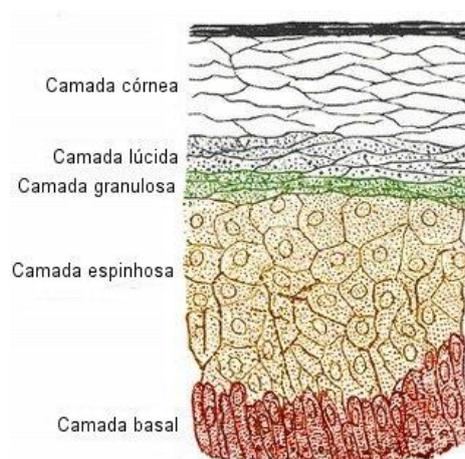
Michael-Jubeli et al. (2011), afirmam que uma emulsão do tipo água em óleo (A/O) recobre a camada córnea, a fim de: (i) manter a hidratação da camada córnea; (ii) manter a acidez cutânea devido ao poder tampão dos aminoácidos; (iii) funcionar como barreira

contra agressões externas; e (iv) permitir a presença da flora saprófita, que defende a pele contra os microrganismos patogênicos.

O filme hidrolipídico varia conforme a idade, sexo, regiões do corpo etc. e são formadas por substâncias como (i) produtos de desintegração dos queratinócitos: queratina; (ii) cimento intercelular: colesterol, ceramidas, ácidos graxos, triglicerídeos; (iii) componentes do NMF – Natural Moisturizing Factor (uréia, ácido láctico, ácido pilorridônico carboxílico); (iv) secreção sudoral: água e sais minerais como o cloreto de sódio, cálcio e magnésio.

3.3.3 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa do corpo e está em contato direto com o meio externo. É um epitélio queratinizado estratificado pavimentoso composto principalmente de queratinócitos onde se encontram as células epiteliais especializadas responsáveis pela renovação, coesão e barreira da epiderme. A **Figura 6** mostra as diferentes camadas que compõem a epiderme e são formadas pela diferenciação sequencial de células migrando da camada basal para a superfície. Composta por quatro tipos de células, os melanócitos, os queratinócitos, as células de Merkel e as células de Langerhans, e, dependendo da região da pele, se renova a cada 20 a 30 dias (KIERSZENBAUM e TRES, 2012; DUAN, et al., 2013).



Fonte: https://funcionalfisioestetica.files.wordpress.com/2011/09/camadas_pele.jpg

Figura 6. Camadas que compõem a epiderme

A camada basal ou camada germinativa é a mais profunda da epiderme e fica sobre a derme. É a camada com a maior atividade mitótica, pois contém células-fonte da epiderme,

onde há constante renovação celular. A camada espinhosa apresenta células com características poligonais cuboides. É importante por conferir à epiderme coesão nas células e resistência ao atrito. A camada granulosa possui células com grânulos que são expulsos para o meio extracelular, conferindo à epiderme impermeabilidade à água e a outras moléculas. A camada lúcida é pouco representativa, consistindo em uma camada de transição entre a camada granulosa e a camada córnea. A camada córnea tem espessura muito variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo. O citoplasma destas células apresenta-se repleto de uma escleroproteína dura chamada de queratina, rica em ligações dissulfeto (S-S), que confere força e resistência. A esta camada é conferida 98% da habilidade de retenção de água da epiderme, a membrana plasmática se torna grossa devido à deposição e ligação cruzada de proteínas, como a involucrina, ao longo da superfície interna para formar o envelope córneo. Outros integrantes da epiderme são as células de Langerhans que apresentam antígeno, os linfócitos T epidérmicos, ambos derivados da medula óssea; os melanócitos formadores de pigmentos e as células de Merkel neuroepiteliais, queratinócitos modificados que possuem queratinas e formam ligações desmossomais de queratinócitos (ELIAS, 2012).

3.4 EMULSÕES

Os sistemas emulsionados são formas químico-farmacêuticas semi-sólida homogêneas a olho nu, constituída por dois líquidos imiscíveis um no outro, em geral água e componentes graxos, sob a forma de gotículas obtidas com o auxílio de um agente emulsivo (OLIVEIRA et al., 2004). Segundo Patravale e Mandawgade (2008), de acordo com a consistência, as emulsões podem ser classificadas em cremes, loções e leites.

A água e o óleo são componentes naturalmente e mutuamente insolúveis, portanto, há necessidade de um componente (tensoativo) que adsorva nas interfaces e tenha afinidade por ambas, a fim de evitar a separação das fases, com a função de estabilizar a emulsão, que passa a ter uma fase interna e outra externa (PATRAVALE e MANDAWGADE, 2008).

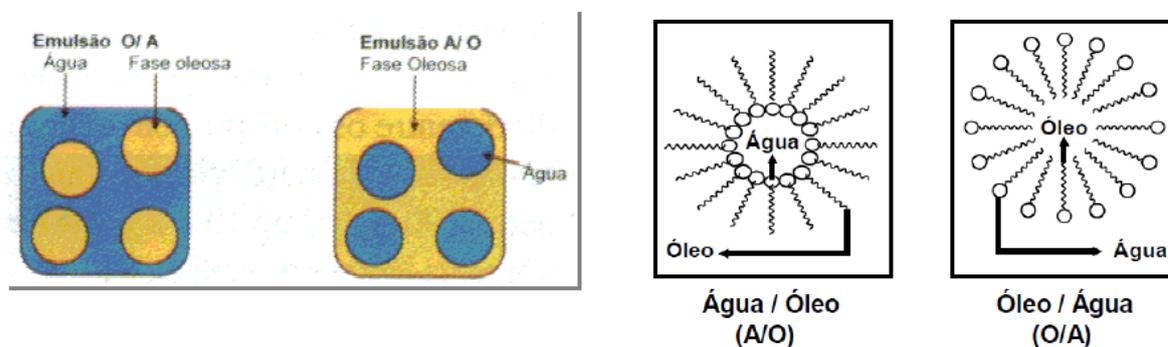
Nas emulsões o ativo vegetal pode estar dissolvido ou suspenso nas fases aquosa ou oleosa, e esta versatilidade permite o incremento de uma grande variedade de ativos no sistema, tornando-se uma das principais vantagens ao usar emulsões. As emulsões possibilitam ainda aperfeiçoar a biodisponibilidade e a biocompatibilidade com a pele humana (CÁCERES e CRUZ, 2015).

3.4.1 Processo de Emulsificação

O processo de emulsificação permite a dispersão de um líquido em outro, sendo um hidrófilo e o outro lipófilo, de forma que o sistema fique estável, mesmo depois no estado de repouso. Este processo se dá pela adição do tensoativo, que diminui a tensão interfacial e aumenta a energia livre de Gibbs dos glóbulos menores formados. Naturalmente, estes glóbulos tendem-se a se unirem novamente, voltando assim ao seu estado inicial e diminuindo a energia livre. O tensoativo age justamente na preservação destes pequenos glóbulos, impedindo a coalescência entre as partículas, adsorvendo-se na superfície globular, diminuindo a tensão interfacial, mantendo as gotículas menor formando as duas fases (a interna e externa) (KUMAR et al., 2015). Já neste processo, forma-se um filme de tensoativos entre as gotículas de uma das fases, que se orienta para formar uma barreira física entre um glóbulo e outro.

3.4.2 Tipos de Emulsões

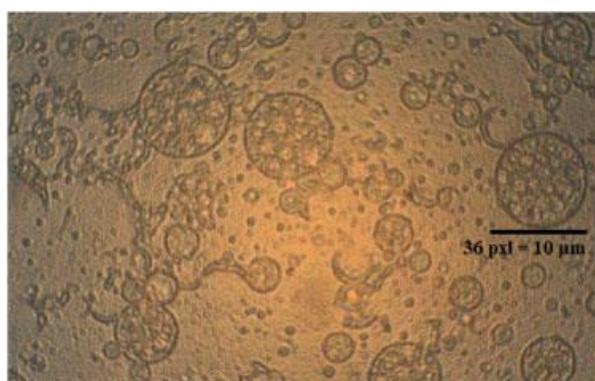
Os dois componentes básicos de uma emulsão são a água e o óleo, classificando as emulsões em dois tipos distintos (FIGURA 7), de acordo com a natureza da respectiva fase dispersa, ou interna. As emulsões simples podem ser do tipo óleo em água (O/A), que possui a fase interna (descontínua) formada por gotículas de óleo envoltas pela fase aquosa (contínua), e água em óleo (A/O), onde a fase interna (descontínua) formada por gotículas de água é envolta por uma fase oleosa contínua (dispersante) (PATRAVALE e MANDAWGADE, 2008).



Fonte: <http://s3.amazonaws.com/magoo/ABAAAE14YAF-5.jpg>

Figura 7. Classificação das emulsões de acordo com a natureza das fases dispersa e interna

Segundo Rosen (1989), as emulsões classificam-se em quatro tipos de acordo com o tamanho das partículas da sua fase dispersa ou interna: (i) macroemulsões: emulsões opacas, termodinamicamente instáveis, com partículas de tamanho maior que 400 nm (0,4 μm), facilmente visível no microscópio; (ii) microemulsões: são sistemas termodinamicamente estáveis, dispersões isotrópicas, transparentes com gotículas de tamanho inferior a 100 nm (0,1 μm) e de baixa viscosidade (newtoniana); (iii) miniemulsões: é um tipo intermediário entre os dois primeiros, com tamanho de partícula variando entre 100 a 400 nm (0,1 a 0,4 μm) e aparência branco-azulada; e (iv) emulsões múltiplas (**FIGURA 8**): as partículas dispersas são emulsões delas mesmas, ou seja, são gotas de um líquido dispersado em gotas maiores de outro líquido, que é então disperso em uma fase contínua, que geralmente é de mesma natureza que o primeiro líquido.



Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/bjps/v49n2/16f01.jpg>

Figura 8. Fotomicrografia de uma emulsão múltipla

Myers et al. (1988) e Chhabra (1997) relacionaram o tamanho da partícula ao tipo de emulsão, e compararam com os tipos de estruturas micelares dos tensoativos. A **Tabela 1** compara o tamanho das partículas com a aparência da emulsão, entretanto, estas classificações são arbitrárias podendo ocorrer sobreposição de faixas.

3.5 FITOCOSMÉTICOS

A biodiversidade amazônica vem sendo aproveitada de modo ineficiente, ao longo dos tempos e especialistas relatam que é favorável o aproveitamento da rica biodiversidade regional em bases equitativas, ambientalmente sustentáveis e economicamente dinâmicas. Uma das vias de uso sustentável da biodiversidade regional é por intermédio da indústria de cosméticos, como forma de atividade econômica promissora para a região. A bioindústria

nacional e internacional vem buscando nas plantas da Amazônia essências, produtos e ativos naturais para formulação de cosméticos, medicamentos e outras formas de uso, objetivando a industrialização e comercialização em larga escala dos mais diversos princípios ativos da biodiversidade da Amazônia (CGEE, 2007).

Tabela 1. Tipo, aparência da emulsão e tamanho da partícula da fase interna

Tamanho da partícula (nm)	Tipo de emulsão/solução	Aparência da emulsão/solução
< 1,0	Solução molecular	Transparente
1,0 - 20,0	Solução Micelar	Transparente
< 50,0	Microemulsão	Transparente ou transluzente
50,0 - 100,0	Microemulsão	Opalescente-cinza
100 a 400	Miniemulsão	Branca- azulada
100,0 – 1000,0	Dispersão coloidal	Opalescente a opacas
> 400 - 10000,0	Macroemulsão, suspensão	Opacas brancas
> 0,5 mm	Fases separadas	Glóbulos visíveis

Fonte: Mahmood et al. (2013)

A procura por novas matérias-primas e tecnologias para o desenvolvimento de formulações, chamados fitocosméticos, vem sendo cada vez mais eficazes e compatíveis aos diferentes tipos de pele, com isso, tais produtos têm sido uma constante por parte dos pesquisadores e formuladores da indústria de cosméticos (DEUS, 2008). Tais fitocosméticos podem ser definidos como aqueles que são produzidos com extratos e óleos de plantas cultivadas com métodos orgânicos, e elaborados em um ambiente industrial. Muitas dessas plantas são pertencentes à região amazônica e podem alcançar alto valor no mercado, pois são frequentemente usadas como fonte de matéria-prima nas indústrias cosméticas e esta valorização de uso de plantas ocasionou crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre a sua segurança e eficácia terapêutica. Nesse caso, a diferença entre o natural e orgânico é pequena, mas as semelhanças são grandes (SEBRAE, 2008; CRESPO, 2012). Um biocosmético, assim como qualquer outro produto do setor, deve passar por todas as etapas de pesquisa: proposição, criação e desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade, para assegurar a atividade durante toda sua vida útil (ISSAC et al., 2008).

Com isso, uma forma de agregar valor a um produto natural, utilizando-se dos recursos naturais da Amazônia, é transformando-o em um fitocosmético, cuja ação define a atividade do produto. Frente a real situação, atualmente existe a cultura dos fornecedores de

matérias-primas em ofertar às indústrias de cosméticos, empresas e farmácias de manipulação, ativos cujas origens derivam de pesquisas realizadas em outros países. Além disso, percebe-se que o mercado nacional valoriza produtos naturais de maneira que um fornecedor lança um determinado ativo e o mercado absorve sem realizar um confronto com alternativas nacionais (ISAAC et al., 2008; CARRARA, 2012).

Revilla (2000), em seu estudo, descreve 72 plantas de interesse econômico, nativas ou aclimatizadas na região amazônica, que poderiam ser manejadas de modo extrativo para atendimento nos segmentos fitoterápico, cosmético, complemento alimentar, corante, inseticida, repelente e fibras. De acordo com o autor, o número de espécies com potencial de mercado é superior ao apresentado, pois o referido estudo não considerou outras espécies de importância econômica, como cupuaçu, guaraná, buriti etc., por serem plantas altamente pesquisadas.

3.5.1 Açaí

Dentre as espécies vegetais promissoras para o desenvolvimento de cosméticos destaca-se o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) que é típico da região amazônica (FIGURA 9) e bastante popular, tendo em vista que nos últimos anos tem chamado atenção devido aos seus benefícios à saúde, relacionados à sua capacidade antioxidante (PORTINHO et al., 2012). Além disso, o extrato de açaí possui uma boa ação fotoprotetora, ou seja, possui a capacidade de absorver, refratar ou refletir a radiação ultravioleta, e dessa forma minimizar os efeitos causados pela luz solar (DAHER et al., 2014; SILVA et al., 2015).



Fonte: A - http://www.nuprattoalimentos.com.br/admin/upload/artigos/a_aai.jpg
B - <http://www.arara.fr/AcaiCacho.jpg>

Figura 9. Açaí, palmeira (A) que produz um fruto; (B) bacáceo de cor roxa utilizado como alimento

Vários trabalhos como os de Schauss et al. (2006), Zhang et al. (2010) e Inácio et al. (2013) relatam a presença de antocianinas no açaí, uma classe de polifenóis com reconhecida propriedade antioxidante, e estão presentes em mais de 90% do fruto. No entanto, às antocianinas também foi atribuído um papel importante em ação fotoprotetora, eliminando diretamente espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo. Estes estudos demonstraram ainda a capacidade antioxidante da polpa de açaí contra ânions superóxido e radicais peróxidos, exibindo capacidade melhorada, em comparação com qualquer outra fruta previamente relatada na literatura.

3.5.2 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Formam um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição (SHAHIDI e NACZK, 2003). Outros oxidantes podem reparar o dano oxidativo a biomoléculas ou podem influenciar as enzimas que catalisam os mecanismos de reparação.

A maioria dos radicais livres age muito rapidamente, podendo ser produzidos com a mesma velocidade com que desaparecem, sendo que quando atacam podem transformar a molécula atacada em outro radical livre, gerando reações em cadeia bastante danosas (YOUNGSON, 1995; CHORILLI et al., 2007a). Se estes radicais atacarem o DNA, ocorrem reações em cadeia causando danos e mutações no material genético ou até mesmo o rompimento dos filamentos de DNA (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000; BUCHLI, 2002; CHORILLI et al., 2007b). Em termos gerais, o dano provocado pelos radicais livres apresenta uma reação química conhecida como oxidação, e os ataques dos radicais livres sobre o tecido são conhecidos como estresse oxidativo (CHORILLI et al., 2007a).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993).

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's), as quais abrangem moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, também conhecidas como Radical Livre (RL), tornando-o muito instável, extraordinariamente reativo, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (GASPARRI, 2005).

Muitas plantas aromáticas e medicinais contêm compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos devem-se principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, diterpenos fenólicos (**FIGURA 10**) e ácidos fenólicos (MILIAUSKAS et al., 2004).

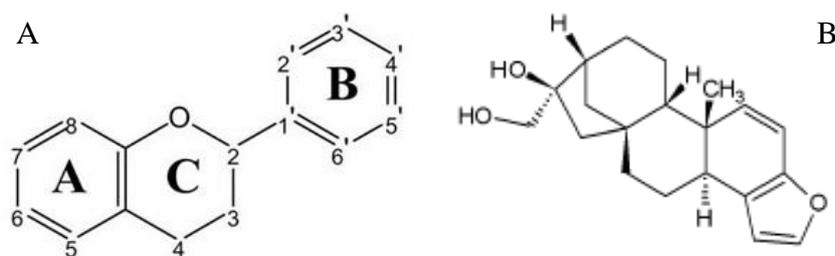


Figura 10. Estrutura química geral de um flavonóide (A) e um diterpeno (B)

A formulação para obtenção de cosméticos naturais significa dar a preferência, sempre que possível, aos derivados vegetais ou microbianos, evitando a sua substituição por substâncias sintéticas. É extremamente importante realizar um balanceamento lógico e coerente entre as matérias-primas sintéticas e naturais, maximizando a ação farmacológica, a fim de alcançar melhores efeitos (RODRIGUES, 2001; PIETRO et al., 2006). A presença de substâncias naturais antioxidantes e anti-radicais livres em formulações cosméticas tem favorecido as propriedades curativas e de prevenção relativas a envelhecimento precoce, possui baixa toxicidade em relação aos sintéticos e elevam a qualidade do produto minimizando os fenômenos de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem.

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, pois reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (MELO et al., 2006).

O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O₂ e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988).

3.5.3 Fator de Proteção Solar

As radiações solares além de proporcionar saúde e bem-estar ao homem, também podem ocasionar danos agudos ou crônicos à pele humana, dependendo da duração e frequência de exposição. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pele ocupa o primeiro lugar dentre todos os tumores malignos registrados no Brasil (BALOGH et al., 2011). Por essa razão, o uso de filtros solares tem sido indicado como uma profilaxia contra os raios ultravioletas (URBACH, 2001).

Atualmente, devida à ação fotoprotetora, muitos extratos e óleos de plantas têm sido empregados em produtos cosméticos como protetores solares. Porém, os mesmos devem apresentar moléculas com estruturas semelhantes às dos filtros sintéticos. Segundo Henrique et al. (2000), os alcaloides são metabólitos com núcleos aromáticos que agem como absorvedores da radiação ultravioleta. De acordo com Santana et al. (2001), a presença de taninos na planta identifica um potencial na absorção da radiação UV e o espectro de absorção dos flavonoides quando dispersos em etanol e metanol mostra-se com dois picos, sendo um entre 240 a 280 nm e o outro nos comprimentos de 300 a 500 nm (BOBIN et al., 1994).

O comprimento de onda crítico é utilizado para determinação da medida de “amplitude” da proteção nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm, referente à radiação UVA e UVB. O comprimento de onda crítico (λ_c) é aquele que corresponde a, no mínimo, 90% ou mais da curva integral de absorção entre os referidos comprimentos de onda. Essa técnica tem sido avaliada e proposta tanto pela COLIPA (European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association) e CTFA (Cosmetic, Toiletries and France Association) (COLE, 2000).

Um fotoprotetor, para ser indicado como adequado na proteção à radiação UVA, deve apresentar valor de λ_c maior ou igual a 370 nm. Quanto maior o valor de comprimento de onda crítico, maior a proteção com relação à radiação UVA. No entanto, o comprimento

de onda crítico não leva em consideração a intensidade de todo espectro, possibilitando que um filtro com proteção inferior possa apresentar mesmo valor de λ_c que outro, com proteção superior (DIFFEY et al., 1997; SPRINGSTEEN et al., 1999; BOOTS THE CHEMISTS, 2004).

A **Equação 1**, utilizada para determinação do comprimento de onda crítico, permite a classificação das amostras em 5 diferentes categorias, conforme a **Tabela 2**.

$$0,9 = \frac{\int_{290\text{nm}}^{\lambda} A\lambda, d\lambda}{\int_{290\text{nm}}^{400\text{nm}} A\lambda, d\lambda} \quad (1)$$

Tabela 2. Classificação da proteção UVA em função do comprimento de onda crítico

λ_c (nm)	Classificação Amplo Espectro
<325	0
≥ 325 e <335	1
≥ 335 e <350	2
≥ 350 e <370	3
≥ 370	4

λ_c = comprimento de onda crítico

3.6 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A produção de resíduos agroindustriais no Brasil é de grande relevância para a economia do país, pois, o acúmulo desses resíduos produz contaminação no meio ambiente e gera perda de recursos, podendo ser amenizado pela reciclagem e conservação da biomassa. Muitos métodos são elaborados para utilização desses materiais, convertendo-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos etc. (PANDEY et al., 2000b).

Esses resíduos vegetais podem ser reutilizados pela mesma indústria que os produziu principalmente como energia, ou podem ser vendidos para outras empresas e utilizados de diversas maneiras, como por exemplo, substrato para o cultivo de fungos. Se isso for realizado, os resíduos deixam de ser um problema e tornam-se um subproduto da empresa em questão, podendo beneficiá-la (LIMA, et al., 2005).

Muitos trabalhos apresentam bioprocessos que têm sido desenvolvidos no aproveitamento de resíduos agroindustriais para obtenção de compostos de interesse industrial, como ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustíveis, compostos aromáticos e enzimas para obtenção de cosméticos (PANDEY et al., 2000a; GRAMINHA et al., 2008). Nesse sentido, o açaí por já ter reconhecidas atividades antioxidantes e fotoprotetoras pode ser estudado como substrato para a fermentação, para a obtenção de novos bioprodutos de interesse cosmético, podendo ainda ser ampliada a atividade biológica detectada a partir de microrganismos.

3.7 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA OBTENÇÃO DE COSMÉTICOS

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo assim, para a redução de problemas ambientais (MACIEL, 2006).

Muitas são as fontes de enzimas utilizadas industrialmente. Embora algumas sejam extraídas de tecidos animais e vegetais, as enzimas usadas na indústria são geralmente obtidas de microrganismos. A grande variedade e disponibilidade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, aliada ao domínio das técnicas de cultivo, tornam as enzimas de origem microbiana as mais utilizadas em processos industriais. Apesar de um microrganismo ser capaz de produzir mais de mil enzimas distintas, é necessário um trabalho cuidadoso para o isolamento de espécies que produzam determinadas enzimas com as características desejadas (FABER, 2004).

A necessidade de se obter enzimas industriais de maneira economicamente viável determina a busca de matérias-primas renováveis e de baixo custo para o processo de produção das mesmas. Os resíduos agroindustriais que possuem em sua composição material lignocelulósico demonstram potencial como meio de cultura para produção de lacase (BON et al., 2008).

As enzimas são as proteínas mais notáveis e altamente especializadas em suas respectivas funções. Consideradas fundamentais para qualquer processo bioquímico, elas

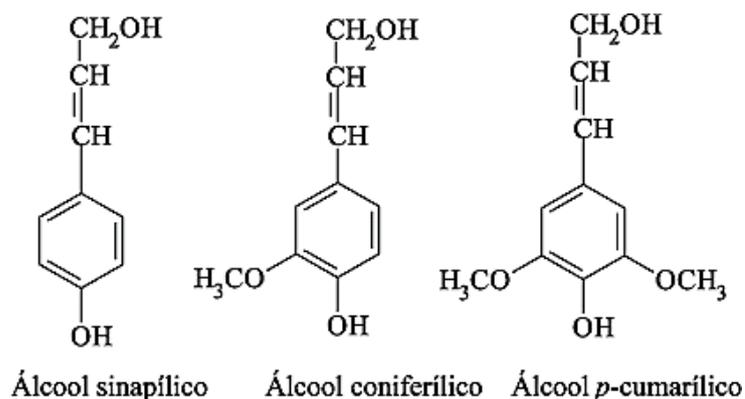
agem como séries organizadas, catalisando centenas de reações contínuas pelas quais as moléculas de nutrientes são degradadas (LEHNINGER et al., 2014). As enzimas efetuam os processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos.

Segundo Barros (2011), as enzimas são obtidas de três fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e micro-organismos (as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulases, fitases, glicose-isomerases) de origem fúngica ou bacteriana.

Woiciechowski (2005) relata que a melhor atividade enzimática das enzimas produzidas por micro-organismos ocorre nas melhores condições de crescimento dos mesmos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas), sendo que a maioria das enzimas empregadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana.

3.7.1 Degradação da Lignina por Enzimas

Em sua composição química, a parede celular vegetal é constituída por celulose, hemicelulose e lignina. A lignina é uma macromolécula polimérica sintetizada por via radicalar por meio de três álcoois *p*-hidróxi-cinâmílicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, como mostra a **Figura 11**. Algumas ligninas consistem em polímeros fenilpropanóides da parede celular altamente condensados e muito resistentes à degradação. A estrutura da lignina a torna difícil de ser degradada e resistente ao ataque de micro-organismos. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções distintas, conforme sua origem. Assim, as ligninas de madeiras de coníferas são compostas quase que excepcionalmente por unidades guaiacila, e as de madeiras de folhosas apresentam em maior quantidade unidades siringila (CARVALHO et al., 2009).



Fonte: Carvalho et al. (2009)

Figura 11. Precursores básicos na formação da lignina

Os fungos basidiomicetos são os degradadores mais importantes da madeira na natureza. Os basidiomicetos, que degradam o material lignocelulósico, são classificados em dois grupos: (i) fungos causadores da podridão parda, responsáveis principalmente pela degradação da celulose e hemicelulose e (ii) fungos causadores da podridão branca, que possuem enzimas capazes de utilizar as fontes de carbono para degradar a celulose, hemicelulose e lignina (KUBICEK, 2013).

Os fungos de podridão branca são capazes de converter lignina a CO₂ e água por meio da liberação de enzimas extracelulares. Enquanto os fungos de podridão parda, de maneira geral não degradam a lignina, mas modificam a sua estrutura e digerem os componentes celulolíticos (KUBICEK, 2013).

As principais enzimas extracelulares envolvidas na degradação de lignina são a peroxidase, a oxidase e a lacase responsáveis pela produção de H₂O₂ extracelular, destacando-se o último grupo (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

3.7.2 Lacases

Lacase é uma polifenol oxidase que age sobre um grande número de doadores de hidrogênio aromáticos e também espécies inorgânicas, incluindo íons Mn⁺² (LEONOWICZ et al., 2001). A proteína fenol oxidase apresenta cobre como uma característica comum de oxidação de compostos aromáticos, tendo o oxigênio molecular como acceptor terminal de elétrons (MAYER e STAPLES, 2002).

Estas enzimas são capazes de catalisar a oxidação de muitas substâncias aromáticas, especialmente fenóis, com a simultânea redução do oxigênio à água. A estequiometria do

ciclo catalítico, apresentado na **Figura 12**, envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos (FOH), 4 prótons e uma molécula de O_2 (POZDNYAKOVA et al., 2006). A mesma pode ser dividida em duas categorias segundo a sua origem: vegetal ou fúngica. Sua primeira descoberta aconteceu em 1883 por Yoshida no meio vegetal e foi classificada como uma oxidase de cobre por Bertrand em 1985 (MAYER e STAPLES, 2002). A lacase de origem fúngica só foi descoberta alguns anos depois (CALL e MUCKE, 1997).

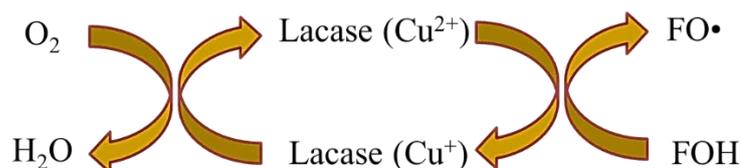


Figura 12. Ciclo catalítico da lacase

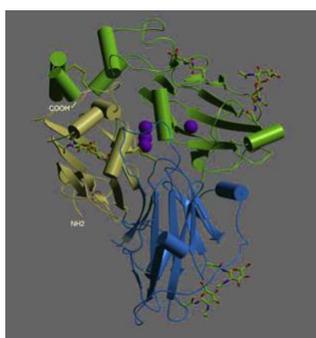
A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura, taxa de aeração etc. (KAHRAMAN e GURDAL, 2002). Os principais micro-organismos produtores de lacase são os fungos da podridão branca da madeira, e entre os mais explorados, cita-se o fungo *Trametes versicolor* (GARG e MODI, 1999). Neste tipo de fungo, a lacase é produzida dentro das células e excretada para o exterior dos filamentos das hifas.

3.7.3 Análise Estrutural da Lacase

A lacase pertence à família das enzimas de cobre azul, que pode ser determinada pela sua espectroscopia característica, sequência homóloga e pela sua reatividade. Em termos estruturais, essa enzima é uma glicoproteína que apresenta uma heterogeneidade adicional devido ao conteúdo variável de hidratos de carbono e de cobre (YAROLOV et al., 1994). Ela abrange entre 520-550 aminoácidos, apresenta um peso molecular que varia de 60-80 kDa e é formada por 15-20% de hidratos de carbono (THURSTON, 1994).

Usualmente as lacases de fungos apresentam 4 átomos de cobre distribuídos em 3 sítios de ligação distintos, que são identificados por densidade eletrônica. O cobre é coordenado por duas histidinas e uma cisteína, que se encontra em um arranjo triangular plano. Cada íon de cobre desempenha um papel fundamental no mecanismo catalítico (THURSTON, 1994). O primeiro sítio, tipo 1 (T1), é responsável pela cor azul da enzima

devido à máxima absorvância a 605 nm e é coordenado com a cisteína; o tipo 2 (T2) não apresenta sinal no visível e atua como receptor de um elétron e o tipo 3 (T3) agrupa dois centros de cobre densamente acoplados, sendo responsável pela banda de 330 nm e atua como receptor de dois elétrons (SOLOMON et al., 1996). Diferentemente das outras oxidases de cobre, o quarto ligante é substituído pela fenilalanina. A mesma é composta por três domínios arranjados sequencialmente. A **Figura 13** mostra a estrutura tridimensional da lacase obtida pelo *T. versicolor*.



Fonte: Thurston (1994)

Figura 13. Estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor*

3.7.4 Fatores de Influência na Produção de Lacases

A produção da enzima lacase é influenciada por inúmeros fatores, destacando entre outros a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono/nitrogênio, temperatura e aeração. Atualmente, muitos grupos de pesquisa trabalham a fim de determinar as melhores condições de crescimento e de produção de lacase tanto por métodos convencionais e/ou estatísticos, realizando a combinação de diferentes fatores capazes de interferir na produção enzimática da mesma (IKEHATA et al., 2004).

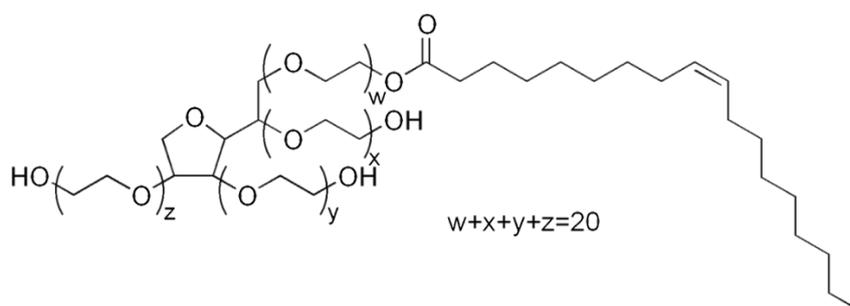
O tempo de incubação é considerado um fator crítico para a determinação da lacase no meio de cultivo, visto que muitos basidiomicetos sintetizam essa enzima após 2 ou 3 dias de crescimento (IKEHATA et al., 2004) e possuem um tempo expressivo durante o qual a enzima continua a ser produzida. Por esse motivo, a pesquisa que busca isolar os organismos produtores de lacase e outras fenoloxidas deve ser realizada com um monitoramento constante durante sua produção.

Outro fator importante é a agitação ou não do meio durante a produção da enzima. Para *Phlebia radiata* a agitação reprimiu a produção de lacase (NIKU-PAAVOLA et al.,

1990), enquanto, para *Pycnoporus sanguineus*, os melhores resultados foram obtidos com agitação (POINTING et al., 2000).

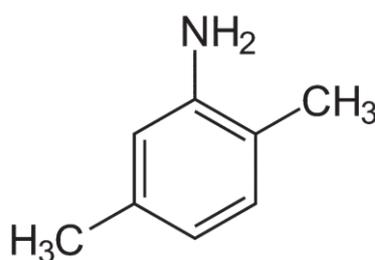
Os níveis de carbono e de nitrogênio presentes no meio de crescimento do fungo são fatores de extrema importância para a produção de lacase e cujos valores ótimos são bastante variáveis, dependendo do micro-organismo em estudo. Especialmente para o *P. sanguineus*, o mesmo apresentou ótima produção de lacase com altos níveis de carbono e baixos níveis de nitrogênio no meio de cultivo (POINTING et al., 2000). De modo antagônico, a produção de lacase por outros fungos como *Pycnoporus cinnabarinus*, *T. versicolor* e *T. gallica* (HESS et al., 2002, DONG et al., 2005) aumentou em meio de culturas com altos níveis de nitrogênio.

Pointing et al. (2000) e Lomascolo et al. (2002) avaliaram o efeito de Tween 80 (Polisorbato 80) (**Figura 14**), um tensoativo, e de 2,5-xilidina na produção de lacase por diferentes linhagens do fungo *P. sanguineus*, informando que a 2,5-xilidina (**Figura 15**) é um bom indutor. O efeito estimulante da 2,5-xilidina foi descrito primeiramente por Fahraeus em 1958 (LEONOWICZ et al., 2001) e é um dos indutores de lacase mais citados.



Fonte: LOMASCOLO et al. (2002)

Figura 14. Estrutura química do Tween 80 (Polisorbato 80)



Fonte: LEONOWICZ et al. (2001)

Figura 15. Estrutura química do 2,5 - xilidina

O Tween 80 é um tensoativo não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas e tem sido descrito como um estimulante da secreção de enzimas lignocelulolíticas (SOUZA et al., 2004), mas seu uso tem apresentado resultados bem diversos como indutor de enzimas fúngicas permitindo dizer que o mecanismo de ação do Tween-80 parece ser diferente para cada micro-organismo (GIESE et al., 2004).

Já a utilização de cobre como indutor e regulador de lacase tem sido explorada por alguns autores, apresentando em algumas situações resultados satisfatórios como o obtido por Iyer e Chattoo (2003) que tiveram a atividade de lacase de *Magnaporthe grisea* aumentada 8 vezes pela adição de 0,4 mmol.L⁻¹ de CuSO₄ ao meio de cultivo.

Como as aplicações biotecnológicas necessitam de quantidades maiores de enzimas, e normalmente as lacases extracelulares são obtidas em pequenas quantidades (SOUZA et al., 2004), para melhorar a produção da mesma, vários indutores têm sido utilizados, destacando-se compostos aromáticos ou fenólicos relacionados à lignina ou derivados da lignina. Não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos, e, assim, existe uma particularidade do indutor em relação ao fungo estudado.

3.7.5 Fungos

Os fungos são seres eucariontes, podendo ser haplóides, diplóides ou poliploides, e possuem uma parede quitinosa rígida formada de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos quimiotróficos, dependendo de substâncias orgânicas disponíveis. Desprovidos de clorofila, não são capazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. Pertencentes ao reino Fungi, são grandemente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos e podem se apresentar nas formas leveduriforme e hifal. Responsáveis pela produção de importantes ácidos, fármacos e enzimas de interesse comercial, os fungos também representam importantes agentes decompositores de componentes primários da madeira - lignina e celulose - o que resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MINAMI, 2003).

Os fungos compõem um dos grupos de micro-organismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua habilidade de degradação. Esta atividade acontece, sobretudo, por meio da fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas

extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente da lignocelulose (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al., 2002).

Os fungos filamentosos são capazes de colonizar o substrato sólido pelo crescimento apical e penetrá-lo, diferente de bactérias e leveduras, menos capazes de colonizar em substrato de baixa umidade (RAIMBAULT, 1998).

Segundo Sales-Campos e Andrade (2011) muitos dos fungos basidiomicetos decompositores de madeira e de outros materiais lignocelulósicos, são também fungos comestíveis, como o *Lentinus strigosus* (Schwein.), que pode ser utilizado no aproveitamento de resíduos vegetais como substrato em fermentação, e também pode ser promissor seu cultivo na Amazônia por representar uma alternativa eficiente e economicamente viável para o aproveitamento de resíduos madeireiros, que constituem um desperdício de matéria-prima potencial para a bio-conversão em produtos de valor agregado.

Vargas-Isla e Ishikawa (2008) descreveram que para o cultivo *in vitro* de *L. strigosus* a temperatura deve estar correlacionada com o habitat climático em torno de 35 °C para incubação, pH 5, agitação de 75 rpm, sem iluminação em meio líquido favorecem o crescimento fúngico. Schneider et al. (2018) relataram inclusive que *L. strigosus* são excelentes produtores da enzima lacase com suas condições otimizadas por planejamento experimental e produzido em maior escala em biorreator.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIE FÚNGICA

Para este trabalho a espécie fúngica *Lentinus strigosus* selecionada, foi oriunda do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis/INPA (**FIGURA 16**). A reativação do subcultivo da espécie foi realizada em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) e mantidas a 35 °C sem luminosidade por sete dias. Dessas culturas obteve-se o inóculo, sendo retirado um disco micelial da borda da colônia e transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA, mantendo as culturas nas mesmas condições de subcultivo.

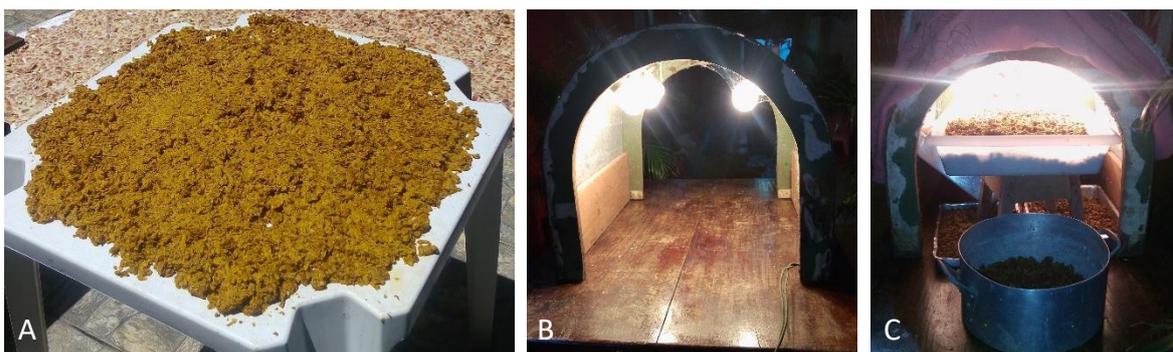


Fonte: Andréa Fischborn

Figura 16. Espécie fúngica selecionada para o trabalho: *Lentinus strigosus*

4.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos agroindustriais utilizados foram a casca da manga, a casca do taperebá e a semente triturada do açaí. Os resíduos da casca de taperebá e sementes trituradas de açaí foram obtidos em uma empresa de polpas situado em Parintins/AM. O resíduo das sementes trituradas do açaí já se encontrava disponível no laboratório para uso e já tinha sido submetido a um tratamento de limpeza conforme padronização utilizada no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis/INPA. A **Figura 17** apresenta o resíduo da casca de taperebá sendo seco ao sol e em uma estufa caseira.



Fonte: Andréa Fischborn

Figura 17. Cascas de taperebá secas ao sol (A); estufa caseira (B); cascas de taperebá secas na estufa caseira (C)

O resíduo da casca de manga, representado na **Figura 18**, foi obtido de uma residência particular no bairro Morada do Sol, de uma mesma árvore, onde inicialmente as mangas foram colhidas, retiradas as cascas, e em seguida submetidas ao tratamento de secagem em estufa de circulação de ar à 60 °C durante 4 dias. Após a secagem, o resíduo foi triturado (\pm 1cm de diâmetro) em moinho tipo Willey.



Fonte: Andréa Fischborn

Figura 18. Cascas de manga retiradas da fruta (A); cascas de manga submetidas ao tratamento de secagem em estufa de circulação (B)

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Para a análise inicial do fator de proteção solar (FPS) foram obtidos extratos etanólicos dos resíduos agroindustriais utilizando-se 60 g de cada resíduo por maceração a frio com o solvente etanol (96,8%). O resíduo foi depositado em frascos erlenmeyers de 500 mL (separadamente) e adicionado o solvente até que o resíduo ficasse submerso. Para o resíduo das sementes trituradas do açai foi adicionado 300 mL, para o resíduo da casca do

taperebá adicionou-se 250 mL e para o resíduo da casca da manga adicionou-se 200 mL. Após, todos os frascos com o material foram submetidos ao banho ultrassom durante 20 min/dia finalizando esta etapa em 5 dias. No final do processo, todo o material foi filtrado, obtendo-se os extratos etanólicos de cada resíduo, os quais foram evaporados em banho termostático a 50 °C e capela de exaustão em fluxo alto para a obtenção do extrato seco. Este extrato seco foi guardado para posteriormente verificar-se o FPS.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO FÚNGICO A PARTIR DO CULTIVO SUBMERSO DO FUNGO EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Para obtenção do extrato etanólico fúngico, inicialmente foi feita uma infusão para cada resíduo agroindustrial utilizando as proporções de 80 g de resíduo/800 mL de água destilada. A mistura ferveu em banho termostático até o alcance de 80 °C/30 min. e após o resfriamento total, filtrou-se à vácuo utilizando papel filtro 0,45 µm. Cada infusão foi enriquecida com nutrientes (g/L), adicionando-se Peptona, Fosfato de Potássio (KH₂PO₄) e Glicose. O líquido foi transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, e em seguida o volume foi completado até o menisco utilizando água destilada, conforme Vieira (2012).

Para o procedimento da fermentação submersa, foi distribuída 100 mL da infusão obtida em 10 frascos de erlenmeyers de 250 mL, com pH 6,0. Os frascos foram tampados e esterilizados em autoclave a 121 °C/20 min. Após o resfriamento, os mesmos foram inoculados com 5 discos miceliais, e colocados em shaker, em rotação orbital a 35 °C/220 rpm/6 dias.

Ao final do processo, os frascos foram filtrados, separando-se a massa micelial (biomassa) e desta, preparou-se o extrato etanólico fúngico utilizando como solvente o Etanol (96,8%), para posteriormente obter-se o extrato seco nas mesmas condições que foram obtidas o extrato etanólico dos resíduos agroindustriais para verificar o FPS.

4.5 TESTE DE CRESCIMENTO FÚNGICO EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA NOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A fim de analisar a dinâmica do crescimento microbiano sobre os resíduos utilizados, a casca da manga, a casca do taperebá, e as sementes trituradas do açaí foram utilizados para fermentação em estado sólido para avaliar o crescimento fúngico de *L. strigosus*. Foi

determinada a umidade inicial de cada substrato em estufa até peso constante. Na sequência, foram adicionados 60 g de cada resíduo em frascos de erlenmeyer de 250 mL, separadamente e em triplicata. Adicionou-se em cada experimento uma solução preparada de caldo glicosado (extrato de carne: 3g/L; triptona: 10g/L; glicose anidra: 5g/L; cloreto de sódio: 5g/L) com quantidade de água deionizada suficiente para manter a umidade (90%) do substrato estudado, e pH 6,0, sendo posteriormente autoclavado à 121°C/15 min. Após o resfriamento total, foi inoculado cinco discos miceliais da espécie fúngica em cada frasco. Os experimentos foram colocados em estufa tipo BOD, à uma temperatura de 35 °C / 21 dias ou até total miceliação.

4.6 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO PARA A FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a fermentação submersa utilizou-se o substrato (açai) que apresentou o melhor FPS a partir do extrato etanólico fúngico e o maior crescimento fúngico, onde o meio de cultivo foi preparado em frascos Erlenmeyers de 250 mL (**FIGURA 19**) contendo um meio líquido com diferentes concentrações de nutrientes (fósforo - KH_2PO_4 , nitrogênio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e magnésio - MgSO_4), indutores para produção da enzima lacase (cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e glicerina bidestilada) e 3,60g do resíduo selecionado. Em cada frasco adicionou-se água destilada para atingir o volume de 180 mL.



Fonte: Andréa Fischborn

Figura 19. Frascos contendo a espécie fúngica e o meio líquido preparado em diferentes concentrações de nutrientes

Antes do meio preparado ser autoclavado à 121°C / 15 min., foi fixado o pH 6,5 e após o seu resfriamento foi inoculado três discos miceliais da espécie fúngica em cada ensaio. As variáveis estudadas e seus níveis utilizados para os ensaios de fermentação

submersa estão apresentados na **Tabela 3**. Para as variáveis (fósforo, nitrogênio e magnésio) utilizadas como nutrientes no crescimento do fungo, empregou-se como nível mínimo 0,2 % e máximo 1,8%; e para as variáveis utilizadas como indutores de produção da enzima lacase (cobre e glicerina bidestilada), aplicou-se como nível mínimo 0,1 % e máximo 1,1%.

Tabela 3. Variáveis e seus níveis utilizados para os ensaios de fermentação submersa

Variáveis	-1	+1
Fósforo (%)	0,2	1,8
Cobre (%)	0,1	1,1
Nitrogênio (%)	0,2	1,8
Magnésio (%)	0,2	1,8
Glicerina bidestilada (mL)	0,1	1,1

4.7 MATRIZ DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a fermentação submersa foi elaborado um planejamento experimental fracionado 2^{5-1} (**TABELA 4**) para selecionar dentre as variáveis (fósforo, cobre, nitrogênio, magnésio e glicerina bidestilada) as que influenciam de forma estatisticamente significativa na produção de substâncias biologicamente ativas de interesse cosmético.

Os ensaios foram colocados em shaker (**FIGURA 20**) para agitação no período de 18 dias a uma temperatura fixada de 35 °C e 180 rpm, onde, de três em três dias, foi retirada uma amostra contendo 5 mL do meio, com início no primeiro dia como amostra zero.



Fonte: Andréa Fischborn

Figura 20. Shaker contendo os ensaios em agitação

Tabela 4. Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1}

Ensaio	Variáveis codificadas					Variáveis reais (%)				
	P	Cu	N	Mg	IN	P	Cu	N	Mg	IN
1	-1	-1	-1	-1	+1	0,2	0,1	0,2	0,2	1,1
2	+1	-1	-1	-1	-1	1,8	0,1	0,2	0,2	0,1
3	-1	+1	-1	-1	-1	0,2	1,1	0,2	0,2	0,1
4	+1	+1	-1	-1	+1	1,8	1,1	0,2	0,2	1,1
5	-1	-1	+1	-1	-1	0,2	0,1	1,8	0,2	0,1
6	+1	-1	+1	-1	+1	1,8	0,1	1,8	0,2	1,1
7	-1	+1	+1	-1	+1	0,2	1,1	1,8	0,2	1,1
8	+1	+1	+1	-1	-1	1,8	1,1	1,8	0,2	0,1
9	-1	-1	-1	+1	-1	0,2	0,1	0,2	1,8	0,1
10	+1	-1	-1	+1	+1	1,8	0,1	0,2	1,8	1,1
11	-1	+1	-1	+1	+1	0,2	1,1	0,2	1,8	1,1
12	+1	+1	-1	+1	-1	1,8	1,1	0,2	1,8	0,1
13	-1	-1	+1	+1	+1	0,2	0,1	1,8	1,8	1,1
14	+1	-1	+1	+1	-1	1,8	0,1	1,8	1,8	0,1
15	-1	+1	+1	+1	-1	0,2	1,1	1,8	1,8	0,1
16	+1	+1	+1	+1	+1	1,8	1,1	1,8	1,8	1,1
17	0	0	0	0	0	1,0	0,6	1,0	1,0	0,6
18	0	0	0	0	0	1,0	0,6	1,0	1,0	0,6
19	0	0	0	0	0	1,0	0,6	1,0	1,0	0,6

P = KH_2PO_4 ; Cu = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; N = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Mg = $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; IN = Glicerina bidestilada

No total foram retiradas sete amostras de cada ensaio (**FIGURA 21**), obtendo-se extratos diferentes, os quais foram armazenados em frascos e colocados em freezer para posterior avaliação das atividades enzimáticas, antioxidantes e FPS.



Fonte: Andréa Fischborn

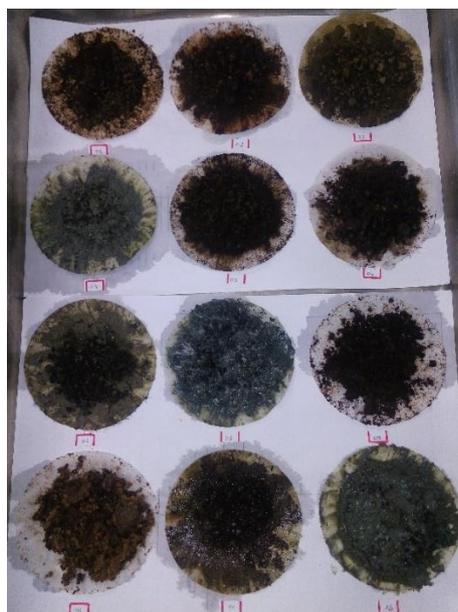
Figura 21. Frascos contendo amostras diferentes de extratos de *Lentinus strigosus* após 18 dias de cultivo

Após o término do período total do experimento, realizou-se uma filtração a vácuo (**FIGURA 22**), em funil de Büchner, obtendo-se a biomassa final (**FIGURA 23**) de cada ensaio.



Fonte: Andréa Fischborn

Figura 22. Filtração a vácuo realizada em cada ensaio após o término do período total da fermentação submersa



Fonte: Andréa Fischborn

Figura 23. Biomassa final obtida após a filtração de cada ensaio

A partir dos extratos obtidos da fermentação submersa com a espécie fúngica *L. strigosus* em sementes trituradas de açaí foram realizadas as análises de interesse tais como a atividade enzimática de lacase, atividade antioxidante e determinação do FPS.

4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

A medida da atividade enzimática foi realizada através de um método colorimétrico em espectrofotômetro UV-Vis. O aumento da absorbância em função da oxidação da seringaldazina, no comprimento de onda de 530 nm, está relacionado ao aumento da atividade de lacase no extrato enzimático segundo a metodologia descrita por Ride (1980). A mistura reativa (3,0 mL) utilizada era formada por 2200 µL de tampão fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 100 mM, pH 6,5 (ajustado com NaOH 1,0 M); 500 µL do extrato fúngico e 300 µL de solução de seringaldazina (0,216 mM em metanol). O branco da reação de oxidação foi preparado substituindo o extrato enzimático por água deionizada.

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar µmol de seringaldazina por minuto por mililitro de extrato enzimático. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a **Equação 2**, onde 0,001 representa a variação de absorbância por minuto por unidade de lacase e 0,5 representa o volume, em mL, de extrato enzimático utilizado.

$$\frac{U}{mL} = \frac{(Abs_{530}extrato - Abs_{530}branco) \times (df)}{(0,001) \times (0,5)} \quad (2)$$

df = fator de diluição

4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Primeiramente foi preparada uma solução de ácido ascórbico para a construção da curva analítica, onde pesou-se 0,0200 g de ácido ascórbico e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL avolumando-se com metanol P.A., obtendo-se uma solução estoque de 800 µg/mL. Em seguida foram feitas as diluições necessárias obtendo-se as concentrações finais 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 e 0 µg/mL.

Para verificar a atividade antioxidante dos diferentes extratos fúngicos que foram obtidos, preparou-se uma solução de DPPH· na concentração 0,06 mmol/L, onde 0,0280 g foram pesados e avolumados com metanol P.A. em 1000 mL. A solução foi preparada no mesmo dia da análise e protegida da exposição à luz. Transferiu-se 50 µL de cada concentração da amostra coletada, em triplicata, para tubos de ensaio, protegidos da exposição direta da luz, sendo adicionados 1950 µL da solução de DPPH· 0,06 mol/L seguido de homogeneização da mistura. O controle foi preparado de modo semelhante, substituindo a amostra por metanol P.A. O branco foi preparado adicionando-se 1950 µL de

metanol P. A. mais 50 µL da solução-teste contendo a mesma concentração de cada ensaio para a calibração do espectrofotômetro. Após 30 minutos de reação, verificou-se a absorvância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição de DPPH· conforme a **Equação 3**, e por meio de regressão linear foi determinado a Concentração Eficiente (CE50), concentração de amostra necessária para o sequestro de 50% dos radicais livres DPPH· (SILVA et al., 2007).

$$AA\% = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (3)$$

4.10 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR

O método espectrofotométrico para determinação do FPS *in vitro* foi desenvolvido por Mansur et al. (MANSUR et al., 1986), o qual consiste na medição de absorção referente à luz UVB (290 - 320 nm) considerando parâmetros realizados *in vivo* para determinação do FPS.

As amostras foram preparadas a partir dos extratos obtidos com os resíduos utilizados na concentração de 2mg/mL em etanol P.A. A partir destas soluções foram realizadas diluições sucessivas com o objetivo de obter as concentrações finais de 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,25 - 0,3 mg/mL necessárias para construção da curva de calibração e para os cálculos dos valores do FPS, utilizando a **Equação 4**:

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (4)$$

Onde:

FC = fator de correção;

EE(λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda λ;

I(λ) = intensidade do sol no comprimento de onda λ;

Abs(λ) = absorvância da solução no comprimento de onda λ.

A relação entre o efeito eritemogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda ($EE \times i$) é constante e foi calculado segundo Mansur et al. (1986) (TABELA 5).

Tabela 5. Ponderação empregada no cálculo por espectrofotometria

Comprimento de onda (nm)	$EE \times i$ (normalizado) Valores relativos
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

4.11 PRODUÇÃO EM BIORREATOR NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Foi utilizado um biorreator de bancada do tipo tanque agitado (módulo reator/fermentado TECNAL, modelo TECBIO-FLEXTM), apresentado na **Figura 24**, com capacidade total de 7L, controle de temperatura, pH e concentração de oxigênio. Para o experimento utilizou-se o volume de 5L, o pH inicial foi ajustado em 6,0 por meio da adição de soluções de NaOH 1M ou HCl 1M, sendo controlado por um sensor de pH acoplado ao biorreator. A temperatura foi mantida em 35 °C sendo monitorada por um sensor de temperatura, mantendo-se a agitação à 150 RPM, com fluxo de oxigênio do equipamento de 2,0 L/min. As concentrações de nutrientes (fósforo, nitrogênio e magnésio) e indutores (cobre e glicerina bidestilada) utilizados no meio de cultura para o cultivo em biorreator, foram as que apresentaram os melhores valores das atividades obtidos no planejamento experimental (item 4.7) realizado em erlenmeyer de 250 mL.

Foram coletadas amostras do caldo metabólico do bioprocesso, em tubos falcon de 50 mL, no tempo 0 (zero) e a cada 48 horas até completar o tempo de cultivo do experimento, estipulado em 30 dias, totalizando 16 amostras. As amostras foram armazenadas em freezer

para posteriormente serem realizadas as análises de atividade de lacase, proteínas, açúcares redutores, FPS e atividade antioxidante, bem como, a prospecção química.



Fonte: TECNAL, 2014

Figura 24. Biorreator de bancada utilizado na fermentação submersa

Para a obtenção dos resultados das atividades de lacase, antioxidante e FPS, utilizou-se a mesma metodologia descrita nos itens 4.8, 4.9 e 4.10, respectivamente. A metodologia utilizada para verificar a quantidade de proteínas e o consumo de açúcares redutores nas amostras do bioprocessamento estão descritas a seguir.

4.11.1 Dosagem de Proteínas

A dosagem proteica foi avaliada segundo o método de Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Para determinar a concentração de proteína preparou-se uma curva analítica em cinco diferentes concentrações de BSA, entre 2,0 e 10,0 mg.mL⁻¹. Em 1000 µL de cada amostra, foram adicionados 500 µL do reagente Comassie Blue G-250 e 1000 µL de água destilada, e, após agitação, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

4.11.2 Dosagem de Açúcares Redutores

A dosagem de açúcares redutores foi avaliada segundo o método descrito por Miller (1959), utilizando o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para determinar o consumo de açúcar, primeiramente preparou-se uma curva analítica em cinco concentrações da amostra padrão de glicose, entre 0,2 e 1,0 g/L e, em seguida, foi preparado as amostras para

leitura, onde, foi adicionado 0,5 mL do reagente DNS à 1 mL da amostra, levando ao banho Maria, durante 5 minutos e a temperatura de 100 °C, juntamente com os tubos da curva analítica. Após o resfriamento total dos tubos, foi elevado seu volume com água destilada a 10 mL. Para o branco, utilizou-se 1 mL de água no lugar da amostra. O valor da absorbância foi lido no comprimento de onda de 540nm.

4.12 PROSPECÇÃO QUÍMICA DAS ALÍQUOTAS OBTIDAS NO BIORREATOR

Para a prospecção química preliminar das alíquotas obtidas no biorreator, foi utilizada a metodologia de Matos (2009). Os ensaios realizados consistiram em testes qualitativos para verificar a presença de alcalóides, esteroides, flavonoides, saponinas, taninos e fenóis.

4.12.1 Teste para Alcalóides

Em tubo de ensaio com 2,00 mL de amostra acrescentaram-se três gotas do reagente de Drangendorff para a observação da presença de precipitado.

4.12.2 Teste para Esteroides

Para o teste de esteroide foi realizado a reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), tomando 2,00 mL do extrato e misturando-o a 2,00 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1,00 mL de anidrido acético, agitando suavemente e acrescentando três gotas de H₂SO₄ concentrado observando se houve o desenvolvimento de cores. Coloração azul seguida de verde permanente indica presença de esteroides livres.

4.12.3 Teste para Flavonoides

Foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg). Para isso foi adicionado a 2,00 mL do extrato, aproximadamente 0,5 cm de fita de magnésio e 2,00 mL

de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação foi determinado pelo término de efervescência e foi considerado resultado positivo o aparecimento da cor vermelha.

Além disso, para a confirmação dos resultados obtidos a partir do teste anteriormente descrito, foi realizado o teste de alcalinização dos extratos utilizando uma solução de NaOH a 2% adicionada gota a gota a 3,00 mL do extrato em um tubo de ensaio, até um pH de 11, observando-se a mudança de cor. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes, como amarelo para flavonas, flavonóis e xantonas e vermelho-laranja para flavonóis.

4.12.4 Teste para Saponinas

Para determinação da presença de saponinas nas amostras foram misturados 2,00 mL de clorofórmio junto a 2,00 mL de extrato e 5,00 mL de água destilada. Em seguida, foi separada a fração aquosa e depois agitada para observação de uma possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas.

4.12.5 Teste para Taninos e Fenóis

Para determinação da presença de taninos nas amostras, em um tubo de ensaio contendo 2,00 mL de extrato foram adicionadas três gotas de FeCl_3 . Após forte agitação foi observado a mudança de cor ou formação de precipitado abundante. Coloração entre azul e vermelho indica presença de fenóis e precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indica a presença de taninos.

4.13 PREPARO DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA

Foi preparada uma emulsão não-iônica para obtenção de uma máscara capilar por inversão de fases, contendo extrato fúngico, óleo de castanha-da-Amazônia, água destilada, tensoativos (Span60 e Tween80), bases auto-emulsionantes (CT Vital Wax, Olivem 1000 e Lanette N).

As fases aquosas e oleosas foram aquecidas a 75°C vertendo-se posteriormente a fase aquosa à fase oleosa sob agitação constante (1200 rpm) até o resfriamento à temperatura ambiente, onde o extrato fúngico foi adicionado. A emulsão se mostrou estável após 24 horas

de seu preparo, dando continuidade ao desenvolvimento da formulação do biocosmético contendo o extrato fúngico.

No momento do desenvolvimento da formulação, avaliou-se os parâmetros físico-químicos (centrifugação, pH, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos, viscosidade dinâmica, densidade relativa e espalhabilidade) e, também, as características organolépticas como cor, odor e aspecto (AOUADA et al., 2008), sendo monitoradas e definidas pelo formulador. A formulação padrão foi baseada no protocolo de produção validado pela empresa Casa do Químico.

4.13.1 Análise Macroscópica da Formulação

A análise macroscópica foi realizada após 24 horas do preparo das amostras e durante as avaliações foram observadas as características organolépticas a homogeneidade da formulação. Dentre as características organolépticas estão, as características de cor, odor e aspecto, onde a coloração e o aspecto foram analisados visualmente e o odor foi analisado através do olfato (LANGE et al., 2009). A análise da homogeneidade foi realizada para identificar algum processo de instabilidade, como cremeação, floculação e coalescência (FERRARI, 1998).

4.13.2 Análise dos Parâmetros Físico-químicos

A análise dos parâmetros físico-químicos (centrifugação, pH, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos, viscosidade dinâmica, densidade relativa e espalhabilidade) foi realizada para obter-se um melhor resultado das emulsões preparadas e da formulação final.

4.13.2.1 Análise de centrifugação

A centrifugação foi feita para produzir estresse na amostra, simulando aumento na força de gravidade e aumentando a mobilidade das partículas, com o objetivo de antecipar possíveis instabilidades (FARIA et al., 2012). O equipamento utilizado foi a centrífuga de modelo Centrifuge Model 90-1 (**FIGURA 25**).



Fonte: [BIOTECMED](#) (2016)

Figura 25. Centrífuga, modelo Centrifuge Model 90-1 utilizada na análise de centrifugação das amostras

Em tubos de ensaio com tampa rosqueada, próprios para centrifugação, foram depositados 10,0 g de amostra e foram realizados ciclos de centrifugação com velocidades de rotação de 1.000 rpm, 2.500 rpm e 3.500 rpm, com duração de 30 minutos cada um (ANVISA, 2008). Após a centrifugação, a formulação foi analisada novamente quanto às características organolépticas de aspecto, cor e odor e foram analisadas também alterações como formação de precipitação e separações de fases (SOUZA, 2007; FARIA et al., 2012; CASTELI et al., 2008). As análises foram realizadas em duplicata.

4.13.2.2 Determinação do Valor do pH

O valor do pH foi determinado inserindo o eletrodo diretamente na diluição aquosa 1:10 (p/p) das amostras homogeneizadas à temperatura de 25 °C (DAVIS, 1977). As leituras foram feitas em triplicata, utilizando-se o pHmetro digital de modelo CG 1800 da marca GEHAKA (**FIGURA 26**).



Fonte: GEHAKA (2016)

Figura 26. PHmetro digital, modelo CG 1800 da marca GEHAKA utilizado na medição do pH

4.13.2.3 Condutividade elétrica

Com condutivímetro digital Gehaka CG-1800 (**FIGURA 27**), foi realizada a análise da condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) através da inserção do eletrodo em dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra em água de osmose reversa. Os testes foram realizados em triplicata, limpando sempre o eletrodo com água de osmose reversa entre uma amostra e outra (CASTELI et al., 2008).



Fonte: GEHAKA (2016)

Figura 27. Condutivímetro digital, modelo CG-1800 da marca GEHAKA utilizado para análise de condutividade elétrica

4.13.2.4 Sólidos totais

Em uma balança analítica, foi adicionado 2,00 g de amostra da emulsão em uma placa de Petri e levando-a para a estufa durante duas horas à 105 °C. Após este período, foi pesada novamente a amostra, até peso constante. A percentagem de sólidos presentes na amostra pode ser calculada pela **Equação 5**.

$$ST (\%) = \frac{P_{t1} - P_0}{P_{t2} - P_0} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

ST = sólidos totais presentes na amostra (%);

P_{t1} = massa da amostra com a placa de petri antes da estufa (g);

P_{t2} = massa da amostra com a placa de petri após a estufa (g);

P_0 = massa da placa de petri vazia (g).

4.13.2.5 Viscosidade Dinâmica

A viscosidade dinâmica da formulação foi determinada em viscosímetro rotativo analógico Q860A, da marca Quimis (**FIGURA 28**). A viscosidade da amostra foi determinada através da medição da força de fricção, utilizando um rotor imerso no fluido, que gira com velocidade angular constante.



Fonte: Geverson Façanha (2016)

Figura 28. Viscosímetro rotativo analógico da marca Quimis, utilizado para determinação da viscosidade dinâmica das amostras

Foi preciso estimar a faixa aproximada de viscosidade do fluido a ser medido para seleção do rotor e da velocidade de rotação. Cada combinação destes elementos é aplicada para medir uma faixa de viscosidade diferente, de acordo com a **Tabela 6**.

Tabela 6. Faixas de viscosidade medidas pelo viscosímetro da marca Quimis, de acordo com o rotor e a velocidade de rotação utilizada

	RPM	ROTOR 1	ROTOR 2	ROTOR 3	ROTOR 4
L	0.3	20.000	100.000	400.000	2.000.000
	0.6	10.000	50.000	200.000	1.000.000
RPM	1.5	4.000	20.000	80.000	400.000
	3.0	2.000	10.000	40.000	200.000
H	6	1.000	5.000	20.000	100.000
	12	500	2.500	10.000	50.000
RPM	30	200	1.000	4.000	20.000
	60	100	500	2.000	10.000

Após a seleção do rotor, a amostra foi colocada dentro do tubo de aço inoxidável e mantida no nível indicado no rotor. Depois de selecionada a velocidade, esperou-se aproximadamente 30 segundos para estabilização e pressionou-se a trava do disco graduado e desligando-se o motor, simultaneamente, para leitura do valor indicado no disco. O teste foi realizado a uma temperatura ambiente de 26 °C e em triplicata.

Para o cálculo da viscosidade absoluta da amostra, a leitura do ângulo de deflexão indicada no disco graduado foi multiplicada pelo coeficiente na **Equação 7**.

$$\eta = k \cdot \alpha \quad (7)$$

Onde:

η é a viscosidade absoluta em cP ou Pa.s

k é o coeficiente encontrado na Tabela 6

α é a leitura indicada pelo ponteiro (ângulo de deflexão)

4.13.2.6 Densidade Relativa

A análise de densidade foi realizada com o auxílio de um picnômetro de vidro (**FIGURA 29**) e uma balança analítica. Foram registradas as massas, em gramas, do picnômetro vazio (M_0), do picnômetro cheio de água (M_1) e do picnômetro cheio com a amostra (M_2) conforme **Equação 6**. Os ensaios foram realizados a temperatura de 25 °C e em triplicata (ANVISA, 2007).



Fonte: SPLABOR (2016)

Figura 29. Picnômetro usado para determinação da densidade relativa

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \quad (6)$$

Onde:

d = densidade;

M_0 = massa do picnômetro vazio, em gramas;

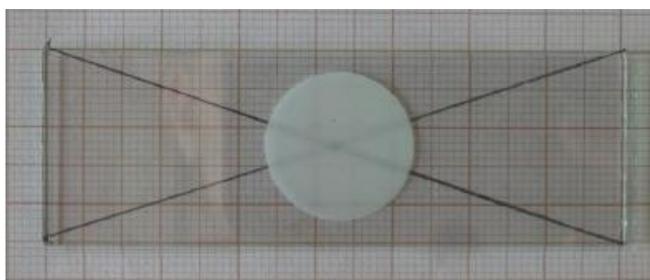
M_1 = massa do picnômetro com água purificada, em gramas;

M_2 = massa do picnômetro com a amostra, em gramas.

4.13.2.7 Teste de Espalhabilidade

Na espalhabilidade foi utilizado o método das placas paralelas mostrado na **Figura 30**, sendo o mais amplamente empregado para determinar e quantificar a espalhabilidade de preparações semi-sólidas (ALVES, 2006).

Foram utilizadas placas de vidro retangulares padronizadas. Sob estas placas foi posicionada uma folha de papel milimetrado demarcando a área e ponto central da placa. A amostra foi introduzida no centro da placa com cerca de 0,0025 g. Sobre a amostra foi colocada uma outra placa de vidro ao qual o seu peso foi determinado.



Fonte: JEZZINI, (2013)

Figura 30. Amostra dispersa após o posicionamento da segunda placa

Após um minuto foi calculada a superfície abrangida, através da medição do diâmetro em duas posições opostas, com posterior cálculo do diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se novos pesos pré-determinados em intervalos de um minuto, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida e o peso da placa adicionada até a obtenção de valores constantes.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa *Statistica* 13.0 foi utilizado para analisar os dados apresentados na matriz de planejamento experimental, para a obtenção dos extratos fúngicos da fermentação submersa, sendo possível investigar a influência das variáveis na produção enzimática de lacase, na atividade antioxidante e na determinação do FPS. O erro experimental foi avaliado a partir da triplicata no ponto central (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Os resultados dos testes físico-químicos da formulação foram submetidos aos testes estatísticos de Tamhane para amostras heterogêneas e, ao teste de Tukey, para as

homogêneas, considerando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram avaliadas pelo programa SPSS 13.0 for Windows.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DOS RESÍDUOS E DA BIOMASSA DO CULTIVO SUBMERSO

Os extratos etanólicos obtidos dos resíduos (manga, taperebá e açaí) e da biomassa obtida no cultivo submerso do fungo *L. strigosus* nos diferentes resíduos agroindustriais, apresentaram-se ativos quanto ao FPS, após a realização da triagem inicial nos mesmos. Segundo a ANVISA, pela RDC 237 de 22/08/2002 (BRASIL, 2002), FPS maior que 2,0 pode ser considerado promissor para estudos de fotoproteção. Na **Tabela 7** observa-se que todos os extratos apresentaram FPS positivo, tornando-os promissores para estudos quanto a parte fitoquímica. No entanto, na obtenção dos extratos da biomassa, após o cultivo submerso do fungo nos resíduos agroindustriais, observou-se a redução do FPS encontrado nos extratos fúngicos de manga e taperebá e um aumento expressivo, do mesmo, no extrato fúngico de açaí, demonstrando uma maior biotransformação de moléculas ativas frente ao FPS.

Tabela 7. Análise do fator de proteção solar do extrato etanólico dos resíduos agroindustriais e da biomassa obtida no cultivo submerso do fungo nos diferentes resíduos

Resíduos	Extrato etanólico dos resíduos	Extrato etanólico fúngico (biomassa)
Manga	11,134	8,288
Taperebá	11,523	7,337
Açaí	5,178	9,115

Segundo os trabalhos de Silva et al. (2015) e Yamaguchi et al. (2016), os extratos de açaí possuem atividade antioxidante e fotoprotetora que podem ser investigadas mais a fundo para obtenção de cosméticos.

O açaí além de possuir um alto valor nutritivo, contém antocianinas, que são uma classe de polifenóis com propriedades antioxidantes já relatadas por Kuskoski et al. (2006) e Kang et al. (2011). Além disso os extratos de açaí têm sido estudados por seus flavonoides por terem apresentado um bom FPS e tem sido realizado estudos de formulações contendo esses extratos em emulsões óleo em água (O/A) (DAHER et al., 2014).

Daher (2014) relata em seu trabalho que a emulsão contendo extrato glicólico de açaí apresentou um fator de proteção UVA (FP-UVA) de 14,97, uma relação de 1,69 FPS /

FP-UVA e um comprimento de onda crítico de 378 nm, sendo a emulsão considerada como protetor solar para UVA e UVB de acordo com a legislação brasileira e com a European Cosmetics Association.

A **Figura 31** apresenta o gráfico dos extratos etanólicos obtidos dos resíduos agroindustriais e dos extratos etanólicos fúngicos obtidos da biomassa do cultivo submerso nos diferentes resíduos. Pode-se observar uma maior variação ao longo da leitura, demonstrando ter um ápice dentro da faixa de UVB (290 – 320 nm).

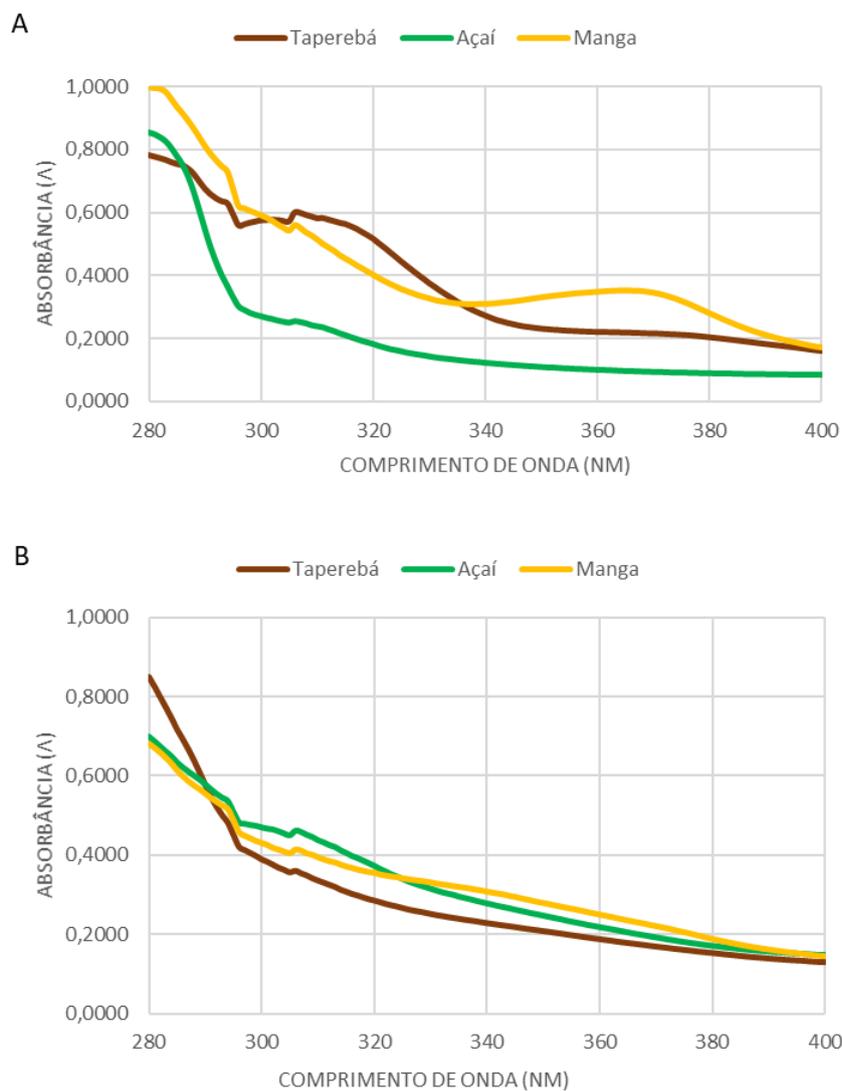


Figura 31. Espectros de absorção dos extratos etanólicos dos resíduos agroindustriais (A) e extratos etanólicos fúngicos (B) obtidos da biomassa do cultivo submerso nos diferentes resíduos agroindustriais

5.2 TESTE DE CRESCIMENTO FÚNGICO POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Entre os três resíduos agroindustriais testados (taperebá, manga e açaí), as sementes trituradas do açaí foi o resíduo mais promissor, demonstrando miceliação total dos frascos em 21 dias de crescimento em BOD, na temperatura de 35 °C (**FIGURA 32**).

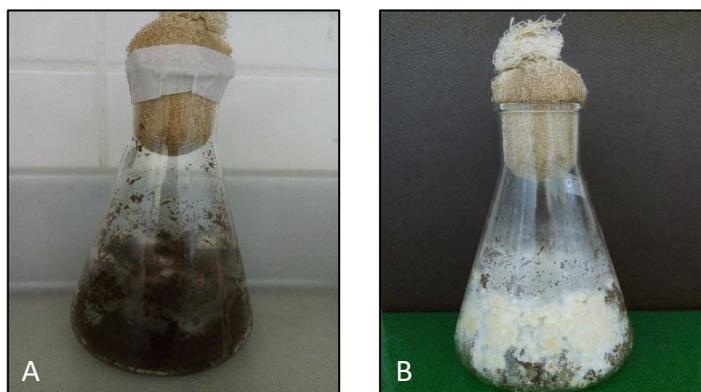


Figura 32. Frascos contendo resíduo de açaí e *Lentinus strigosus*: quatro dias de crescimento (A) e 20 dias de crescimento (B)

O trabalho de Santos e Cavallazzi (2017) comprova o ótimo crescimento de fungos de podridão branca em resíduo de açaí (bagaço e semente), os quais são uma rica fonte de nitrogênio, aminoácidos e carboidratos, o que provavelmente estimula o crescimento micelial.

No trabalho de Sales-Campos e Andrade (2010), o objetivo foi o de avaliar o crescimento micelial de *L. strigosus*, em cinco meios de cultura à base de malte, serragem de marupá, serragem de pau de balsa, estipe de pupunheira e bagaço de cana-de-açúcar, submetidos às temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50° C, verificando-se que a temperatura de 35 °C foi a mais favorável para o crescimento micelial do fungo, o que corrobora o resultado deste trabalho.

5.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA OBTIDA POR DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para verificar o efeito das condições de cultivo na produção enzimática da lacase, atividade antioxidante e efeito fotoprotetor por *L. strigosus* em fermentação submersa das sementes trituradas do açaí, foram realizados 19 experimentos, determinada como etapa 1, variando as concentrações dos nutrientes fósforo (KH_2PO_4), nitrogênio ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e magnésio (MgSO_4), e dos indutores de produção de lacase, cobre (CuSO_4) e glicerina bidestilada, presentes no meio de cultivo, conforme descrito no item 4.7, em planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

5.3.1 Atividade Enzimática de Lacase

Os resultados obtidos da atividade enzimática da lacase, decorrentes desta etapa, estão apresentados na **Figura 33**.

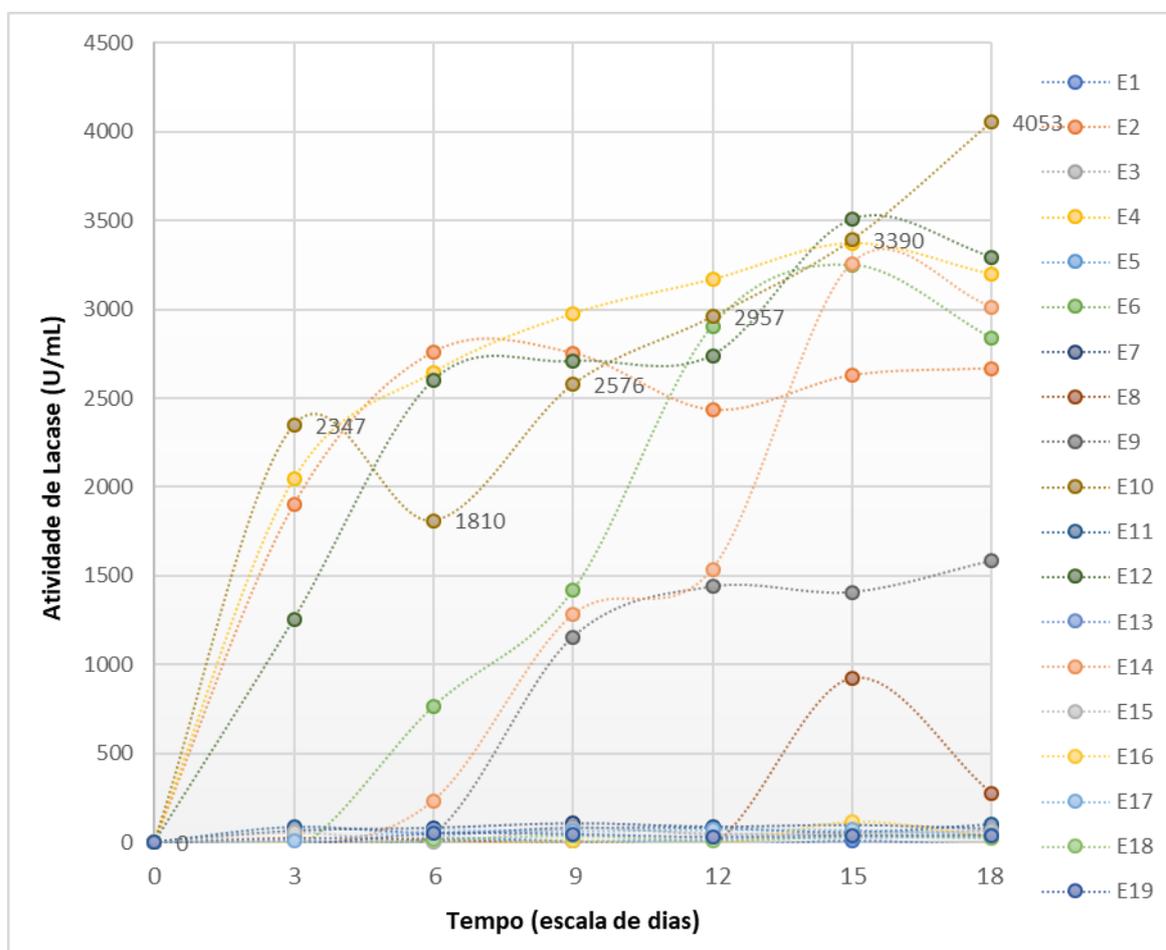


Figura 33. Atividade enzimática da Lacase em função do tempo (escala de 3 dias - 0 à 18 dias) de fermentação dos 19 experimentos submetidos à fermentação submersa utilizando o fungo *Lentinus strigosus*

O ensaio de número 10, considerando o tempo total de fermentação de 18 dias, foi o que apresentou a maior atividade enzimática de lacase (4053 U/mL), utilizando o fungo *L. strigosus* e como substrato as sementes trituradas de açaí.

Santos e Cavallazzi (2017) demonstraram que os resíduos de açaí (bagaço e semente) como substrato de fermentação sólida aparentemente oferecem fonte de nutrientes favoráveis para o cultivo do fungo da podridão branca, os quais forneceram uma atividade máxima da lacase (34,77 U/L) no 21º dia de cultivo micelial.

O Diagrama de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes e precisos na análise. Considerando o nível de significância estatística ($p < 0,05$), o resultado do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} pode ser visualizado no diagrama de Pareto (**FIGURA 34**), o qual apresenta os valores dos efeitos de cada parâmetro estudado (fósforo, cobre, nitrogênio, glicerina bidestilada e magnésio) sobre a atividade enzimática de lacase da espécie *L. strigosus* cultivado em fermentação submersa no resíduo do açai.

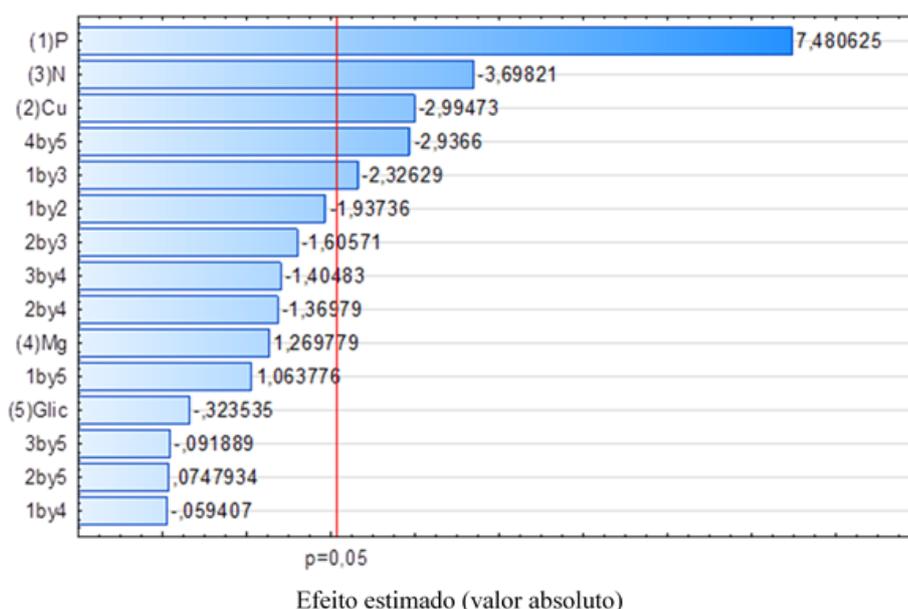


Figura 34. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} obtido para a resposta dos valores dos efeitos de cada parâmetro estudado sobre a atividade enzimática de lacase

Analisando o diagrama de Pareto da atividade enzimática para o fungo *L. strigosus*, pode-se afirmar que, dentro das concentrações estudadas, o único fator de influência positiva sobre a atividade enzimática foi o fósforo (KH_2PO_4), $p < 0,05$, uma vez que o aumento de fósforo variando de 0,1 a 1,1% no meio de cultivo foi diretamente proporcional a atividade enzimática.

Máximo et al. (2015), verificaram que o fósforo influenciou a produção de lacase de forma positiva, ou seja, maiores concentrações desse nutriente aumentaram a atividade enzimática, sendo que o objetivo do trabalho, era estudar as condições de cultivo fúngico em estado sólido utilizando resíduos da hidrodestilação de plantas do gênero *Aniba* como substrato para obter a máxima atividade de lacase. Entretanto, o nitrogênio adicionado apresentou-se como um fator de influência negativo, ou seja, quanto maior a concentração do mesmo no meio de cultivo ocorre uma diminuição da atividade enzimática.

Santos e Cavallazzi (2017), afirmam, em seu trabalho, que o açaí já é uma rica fonte de nitrogênio, não sendo necessário grande adição deste nutriente, e seu excesso como demonstrado neste trabalho, pode inibir a absorção de demais nutrientes acabando por inibir o crescimento micelial e, conseqüentemente, a produção de lacase.

A fonte de cobre também influenciou negativamente quando adicionada ao meio de cultivo, ou seja, o aumento da concentração de cobre sobre as condições estudadas diminuiu a produção da enzima lacase. No trabalho de Tlecuitl-Beristain et al. (2008) foi realizado o estudo da produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em cultivo submerso, utilizando um meio mineral adicionado de cobre e com pH 6,5. A atividade de lacase neste cultivo estava correlacionada ao crescimento fúngico, e a alta concentração de cobre no meio de cultura atrasou o crescimento do fungo, e conseqüentemente prejudicou o resultado da atividade de lacase. Assim, aproximadamente, em oito dias de crescimento, a atividade de lacase foi de 1.000 U/L⁻¹ e após este período, o fungo teve um crescimento específico, atingindo à fase estacionária em 18 dias e com uma atividade máxima de 12.000 U/L⁻¹.

A resposta obtida pela adição de cobre é apresentada em alguns trabalhos de uma forma diferente, apontando que a adição desse elemento tem sido fundamental para o aumento da atividade enzimática. No trabalho de Palmieri et al. (2000), foi descrito o efeito do cobre sobre a produção de padrões específicos da enzima lacase, utilizando o fungo *P. ostreatus*, onde verificou-se que o aumento da atividade de lacase era proporcional à quantidade de cobre adicionada ao meio de cultura e que o efeito máximo (cerca de 30 U/ml) foi obtido a uma concentração de 150 mM de sulfato de cobre.

Silva et al. (2012), avaliaram a capacidade de produção de lacase em três linhagens de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café, durante 15 dias, utilizando o cobre como indutor. A melhor fonte de nitrogênio para produção de lacase por *P. ostreatus* U6/9 foi o extrato de levedura na concentração de 9 g L⁻¹ (20 U/mL⁻¹) com a adição de 150 µM de CuSO₄, no 3º dia de cultivo, resultando na indução significativa da produção de lacase dessa linhagem (21 U/mL⁻¹), no 12º dia de cultivo.

A correlação entre os valores previstos e os valores observados efetivamente para a atividade enzimática de lacase pelo fungo *L. strigosus* pode ser identificada na **Figura 35**, onde observa-se que as respostas experimentais obtidas para a atividade enzimática de lacase apresentam valores próximos aos parâmetros nos intervalos dos níveis analisados.

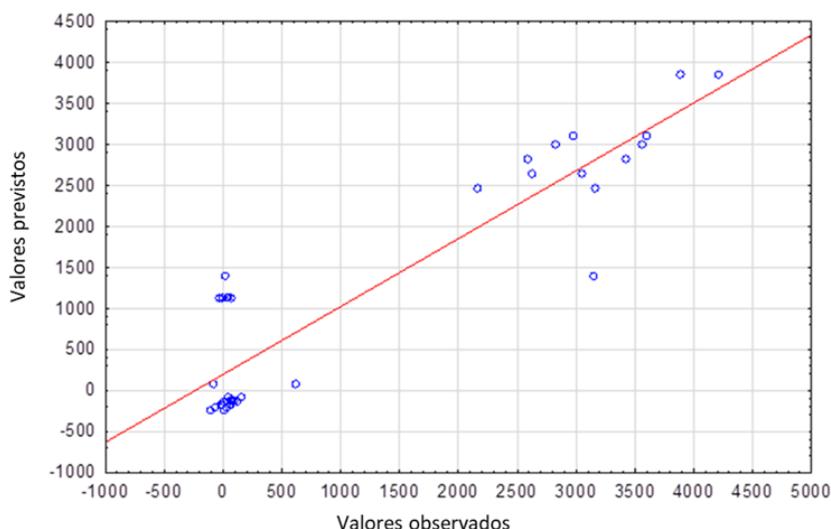


Figura 35. Correlação entre os valores previstos e os valores observados para a atividade enzimática de lacase da espécie *Lentinus strigosus* cultivado em fermentação submersa utilizando diversas concentrações de nutrientes

O coeficiente de correlação R^2 (0,914) mostra o comportamento da variável de resposta da atividade lacase, dentro do intervalo de variação dos fatores adotados, podendo-se considerar que há uma alta correlação linear entre os experimentos realizados e o modelo teórico obtido.

Na realização do planejamento experimental fracionado 2^{5-1} , que propôs realizar uma triagem das variáveis estatisticamente significativas sobre a produção de lacase pelo fungo *L. strigosus*, cultivado em sementes trituradas de açaí, foi possível avaliar graficamente o efeito das variáveis sobre a atividade enzimática através da análise das superfícies de resposta.

Na **Figura 36** observa-se o gráfico de superfície de resposta para a atividade enzimática de lacase da espécie *L. strigosus*, como uma função resposta da concentração de nitrogênio e de cobre e como uma função resposta da concentração de fósforo e de cobre, respectivamente. Nota-se que com o aumento de cobre no meio de cultivo a atividade de lacase diminui consideravelmente e esta diminuição é ainda mais incrementada com a alta de nitrogênio. Com a diminuição do cobre no meio de cultivo a atividade de lacase aumenta, sendo incrementada pelo aumento de fósforo.

Baldrian e Gabriel (2002), em seu trabalho, cultivaram em meio líquido com nitrogênio por 12 dias o fungo de podridão branca *P. ostreatus* e, verificaram que a adição de cobre (1mM) ao meio de cultura apresentou um aumento de oito vezes na atividade da lacase. Contudo, quando adicionado o cobre antes de 12 dias, a ativação da lacase foi retardada.

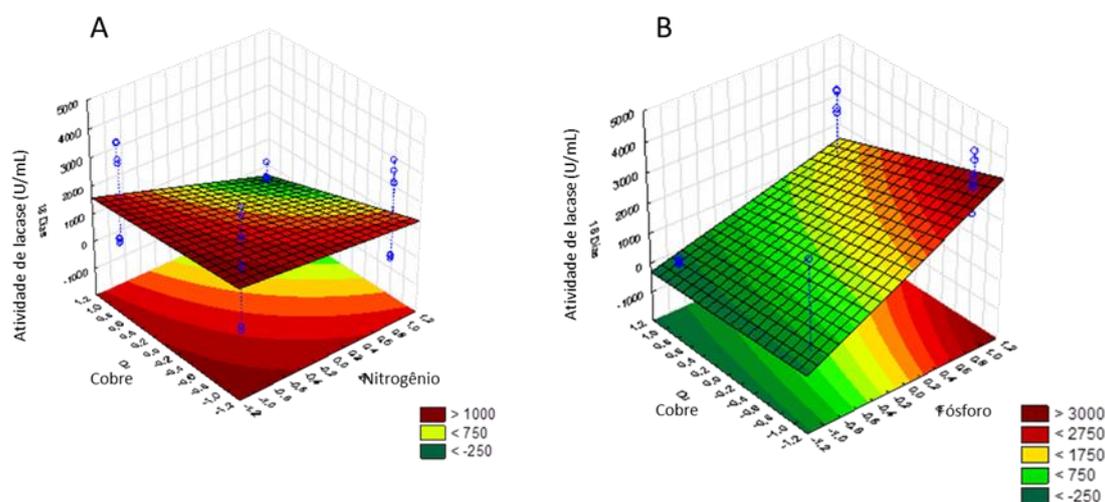


Figura 36. Superfícies de resposta para a atividade enzimática de lacase da espécie *Lentinus strigosus* como uma função do nitrogênio e do cobre (A) e como uma função do fósforo e do cobre (B)

Queiroz (2017), em seu trabalho, utilizou um planejamento para verificar se variáveis tinham influência na atividade enzimática fúngica para encontrar as condições de cultivo que levassem a maior atividade da enzima lacase. Assim, obteve significativa produção de lacase (1418 U/mL), quando a adição de cobre se encontrava em nível mais alto (1,1%). Contudo, a atividade enzimática de lacase, não foi influenciada pela fonte de fósforo, tanto em níveis mais baixos, quanto em mais altos.

Estudos sobre a caracterização mineral das polpas do fruto do açaí demonstram a presença de cobre no mesmo, como no trabalho de Trindade et al. (2012), onde a concentração de cobre obtida na polpa de açaí estudada foi $10,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Já Dolan e Capar (2002), demonstraram que o nível de cobre ($21,3 \mu\text{g g}^{-1}$) encontrado foi maior. A alteração da concentração do cobre nos alimentos pode estar relacionada com as características das plantas, a origem geográfica, o uso de fertilizantes e, também, com as condições climáticas e do solo (IBAÑEZ e CIFUENTES 2001; DOLAN e CAPAR 2002).

Ainda em comparação com a adição de nitrogênio no substrato, pode-se verificar que Teixeira et al. (2016) avaliaram o teor de nitrogênio e fósforo, presentes no substrato à base de folha de bananeira suplementada com farelo de trigo, após o cultivo de *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus*, por 35 dias, visando sua reutilização na agricultura. O teor de nitrogênio no substrato aumentou significativamente, com o emprego dos isolados fúngicos nos diferentes tratamentos feitos na folha de bananeira, em relação, principalmente, com o controle (sem

fungo). Este aumento quando comparado aos valores obtidos no tratamento controle, variou de 55,9 a 61,8%.

5.3.2 Atividade Antioxidante

Para a análise de atividade antioxidante pela redução do radical livre DPPH, foi elaborada uma curva analítica com o padrão ácido ascórbico para avaliar a precisão do método utilizado, que apresentou um coeficiente de determinação igual a $R^2=0,987$, conforme apresentado na **Figura 37**.

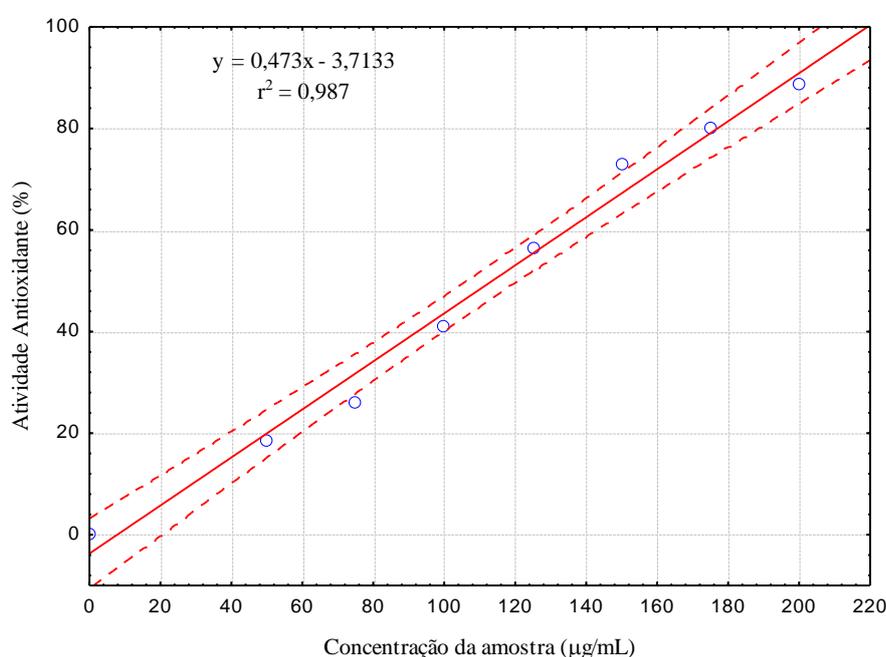


Figura 37. Curva analítica do ácido ascórbico utilizada para determinação da Atividade Antioxidante. As linhas tracejadas representam o limite de confiança em 95%

A solução utilizada como padrão, ácido ascórbico, apresentou inibição muito superior a todos os extratos analisados, chegando a $90,3 \pm 2,34$ em porcentagem de inibição do radical livre DPPH. De acordo com o método utilizado, os extratos fúngicos analisados apresentaram baixa atividade antioxidante, conforme observado na **Tabela 8**.

Alguns trabalhos como os de Duarte-Almeida et al. (2006), Tonon et al. (2010) e Kang et al. (2011), relatam a existência da atividade antioxidante em extratos de açaí tanto pelo método do DPPH quanto por outros métodos. Os dados corroboram o fato de no tempo 0 serem observadas atividade em função de substâncias ativas presente no extrato do açaí. Tonon et al. (2010), ainda, atribuem, a atividade antioxidante observada, as antocianinas

presentes nas sementes do açaí, porém seu trabalho demonstra que as antocianinas são moléculas que podem alterar suas propriedades físico-químicas e serem degradadas na presença de outras substâncias e com variações de temperatura perdendo assim sua atividade antioxidante.

Tabela 8. Resultados da atividade antioxidante dos extratos obtidos da espécie *Lentinus strigosus* dos diferentes experimentos em função do planejamento experimental

ENSAIO	d0		d3		d6		d9		d12		d15		d18	
	AA	DP	AA	DP	AA	DP	AA	DP	AA	DP	AA	DP	AA	DP
E1	57,137	4,585	6,092	5,302	10,661	4,631	8,399	0,869	0,740	2,920	0,305	2,224	1,131	2,224
E2	8,399	2,819	-5,527	15,270	1,044	1,896	2,437	0,754	0,174	0,742	0,827	2,526	1,523	1,456
E3	29,069	7,964	8,660	1,524	5,309	0,944	6,963	0,329	4,352	0,798	2,654	0,742	4,003	1,938
E4	0,856	7,443	3,264	0,691	1,436	1,020	3,220	1,653	0,044	1,955	0,087	5,634	1,697	0,452
E5	22,802	5,491	14,404	6,736	5,788	2,471	11,749	7,265	4,874	3,074	5,701	1,857	2,480	2,446
E6	0,096	14,030	5,440	2,579	0,000	1,976	4,265	1,938	4,656	1,126	4,352	1,557	1,393	1,396
E7	0,609	5,812	8,529	1,314	2,567	1,772	6,614	0,329	5,875	0,392	8,660	0,869	4,830	1,305
E8	11,271	8,889	5,962	9,735	-1,393	0,798	4,439	2,393	4,700	0,345	4,047	1,196	0,522	2,072
E9	27,589	6,859	19,930	2,024	2,176	1,547	9,617	1,095	5,135	0,377	6,701	1,213	-0,305	0,199
E10	7,702	0,000	7,311	1,382	2,480	1,259	8,616	0,226	6,049	1,095	7,311	0,471	2,393	0,458
E11	6,049	3,445	11,836	1,772	4,308	0,914	9,617	1,206	3,351	1,213	9,617	0,670	3,873	0,719
E12	21,671	1,436	6,136	1,357	2,480	0,522	6,614	0,980	2,872	1,036	6,440	1,087	3,264	0,452
E13	23,412	3,696	15,753	3,528	4,482	3,805	13,403	2,683	7,354	1,396	4,047	0,226	5,527	0,988
E14	36,379	2,553	15,927	2,480	5,831	1,110	4,961	1,069	4,743	1,047	0,957	2,770	3,307	0,199
E15	6,745	1,772	8,399	0,765	4,308	1,196	7,963	0,856	5,788	0,917	4,917	0,798	5,440	0,458
E16	24,804	4,672	14,143	1,126	9,225	0,926	9,443	0,420	6,658	1,305	4,874	0,719	5,483	0,131
E17	33,856	2,813	17,015	1,513	9,008	1,160	10,574	1,588	2,654	1,241	5,875	2,621	3,264	1,727
E18	26,414	4,530	6,701	3,161	5,657	3,732	7,137	0,719	2,132	1,268	-0,044	1,408	4,656	1,281
E19	21,366	18,574	12,402	3,078	8,790	0,980	7,789	3,262	3,699	1,063	2,089	1,160	3,307	2,190

AA = Atividade antioxidante / DP = Desvio Padrão. E1 a E19, experimentos de 1 a 19 conforme matriz de planejamento

Para uma melhor visualização dos resultados, os dados foram plotados em um gráfico com a atividade antioxidante em função dos experimentos e do tempo de fermentação, apresentados na **Figura 38**, pode ser observado que, no tempo 0, todos os experimentos apresentaram uma relativa atividade antioxidante e, com o progresso da fermentação, houve uma expressiva queda na atividade antioxidante, sugerindo que os flavonoides encontrados no açaí, responsáveis pela capacidade antioxidante podem ter sido consumidos com o tempo de fermentação pelo fungo *L. strigosus*, possivelmente como fonte de carbono ou terem sido biotransformados em outras moléculas com diferentes atividades biológicas.

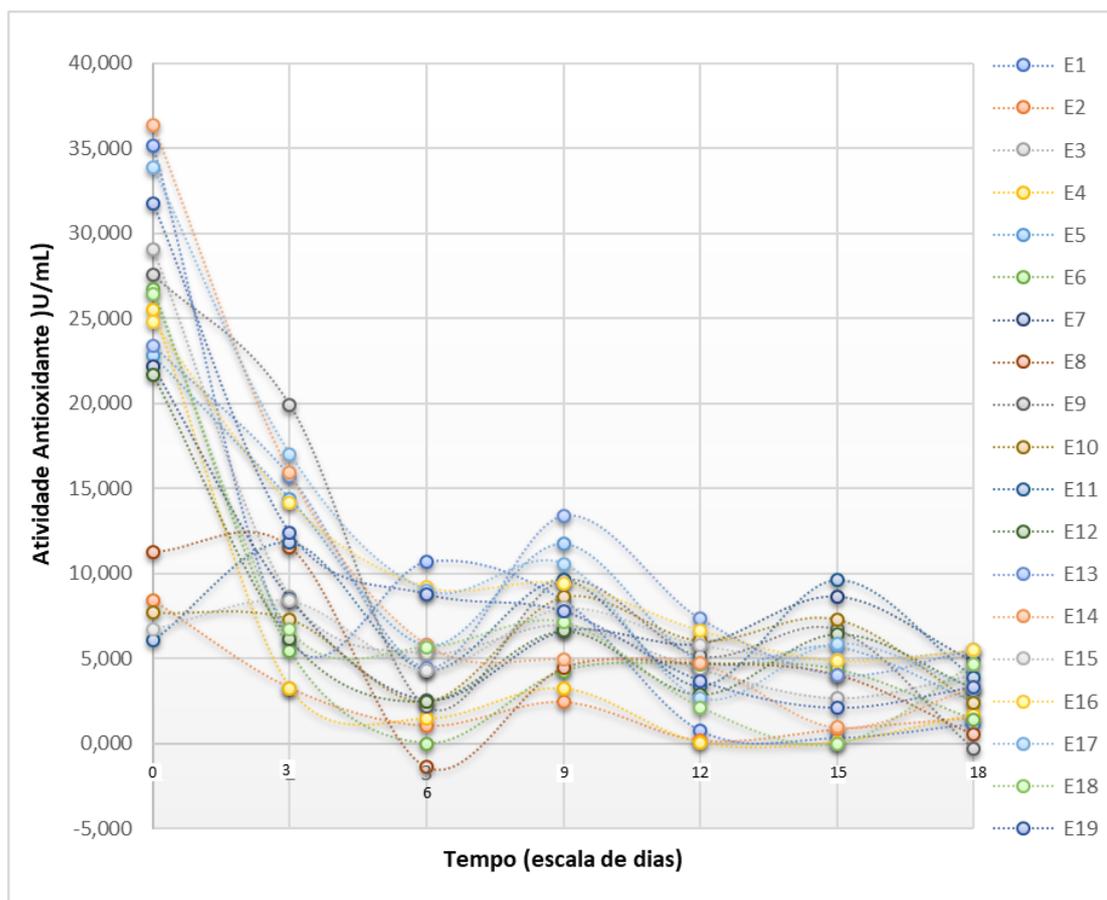


Figura 38. Atividade antioxidante pelo método do DPPH em função do tempo (escala de 3 dias - 0 a 18 dias) de fermentação dos 19 experimentos submetidos à fermentação submersa utilizando o fungo *Lentinus strigosus*

5.3.3 Fator de Proteção Solar

Para verificar o efeito das condições de cultivo na produção de substâncias com FPS por *L. strigosus* em fermentação submersa das sementes trituradas de açaí, os 19 experimentos foram analisados conforme descrito no item 4.10. Analisou-se, contudo, em planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , a fim de estudar a influência das diferentes concentrações dos nutrientes (fósforo, nitrogênio e magnésio) e dos indutores de produção da enzima lacase (glicerina bidestilada e cobre) presentes no meio de cultivo. Os resultados obtidos de FPS, decorrentes desta etapa, estão apresentados na **Figura 39**.

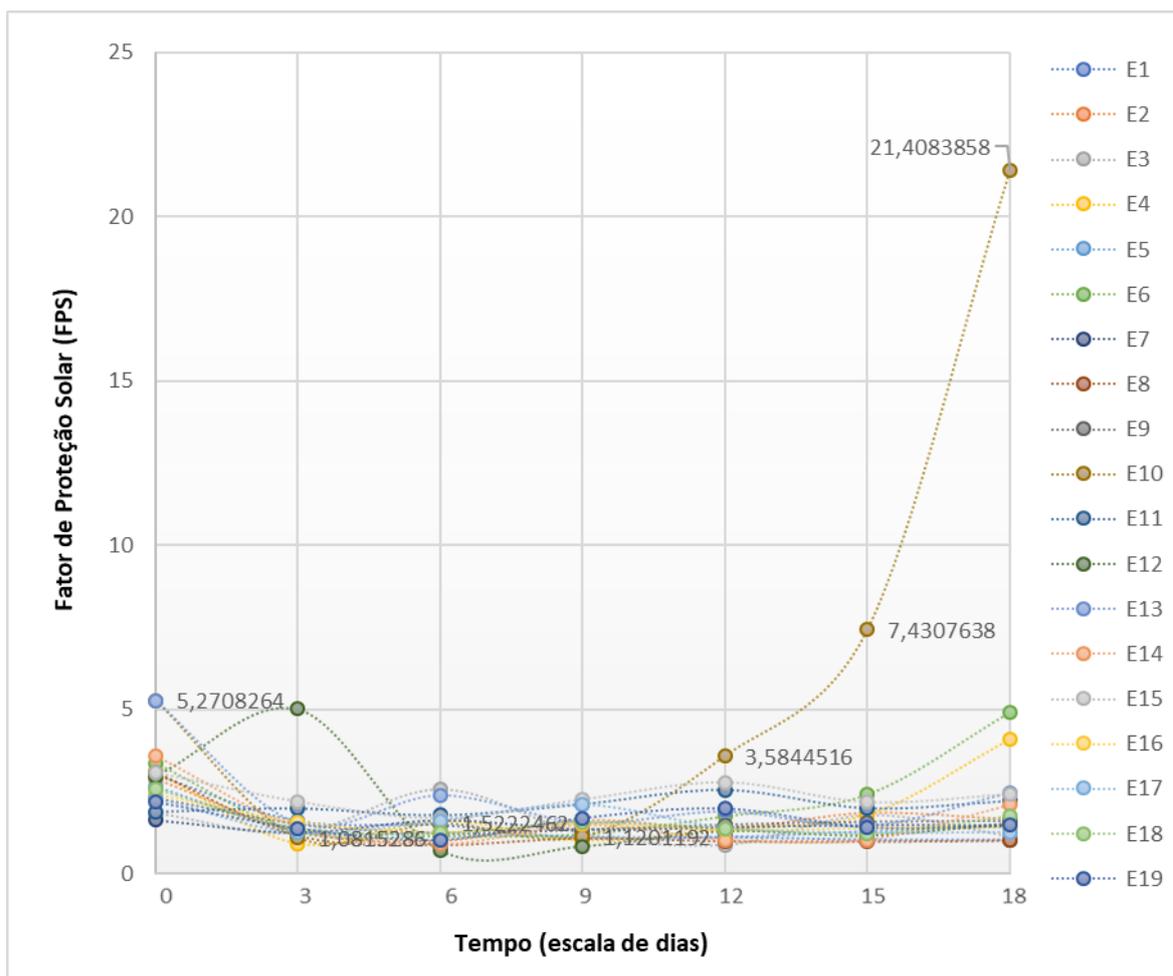


Figura 39. Fator de Proteção Solar em função do tempo (escala de 3 dias - 0 à 18 dias) de fermentação dos 19 experimentos submetidos à fermentação submersa utilizando o fungo *Lentinus strigosus*

Os resultados do FPS mostram que os extratos fúngicos da fermentação submersa com *L. strigosus* em sementes trituradas de açaí apresentam um aumento contínuo de atividade fotoprotetora ao longo do tempo de fermentação. Foram detectados valores iniciais de FPS no tempo 0, que diminuiram inicialmente, mas, logo na sequência, conforme o progresso do bioprocessamento, foram aumentando o FPS.

O valor máximo do FPS foi encontrado no experimento 10, com o valor de 21 (FIGURA 40), o qual, também apresentou uma maior atividade enzimática de lacase. Neste experimento as variáveis fósforo, magnésio e glicerina bidestilada foram apresentadas com seus níveis máximos, e, as variáveis: cobre e nitrogênio, em seus níveis inferiores. Observa-se ainda, que os valores analisados se encontram em crescente aumento, e caso ocorra um aumento no tempo de fermentação, os valores de FPS podem continuar em fase de crescimento.

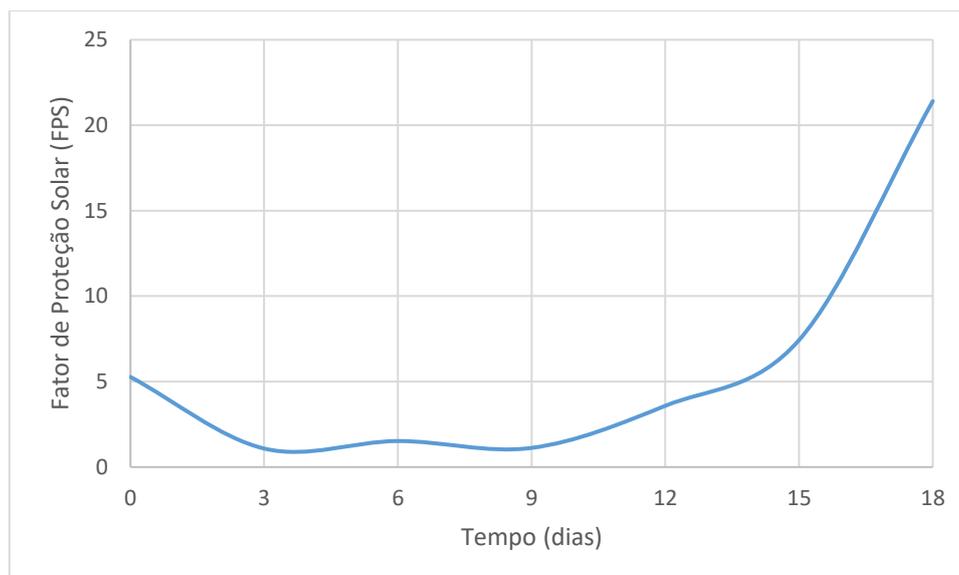


Figura 40. Fator de Proteção Solar do experimento 10, realizada no período de 18 dias em shaker

Diferentes espécies de plantas respondem de forma distinta frente à radiação UVB. Segundo Ryan et al. (2002), a via biossintética dos fenilpropanoides responde às situações de estresse ambiental, inclusive ao aumento de radiação UVB, levando a um aumento da concentração de flavonoides nas folhas e flores, metabólitos encontrados no açaí. Os flavonoides absorvem fortemente na região UVB, e existem evidências de que eles protegem as plantas dos efeitos da radiação, atuando como um filtro solar (REUBER et al., 1996).

Silva et al. (2015), determinaram o potencial fotoprotetor de compostos naturais presentes em plantas da Amazônia, utilizando os métodos conhecidos capazes de indicar a eficácia protetora frente a radiação ultravioleta desenvolvendo uma qualificação de FPS que possua abrangência na radiação UVA e UVB. O extrato glicólico de açaí foi um dos compostos que apresentou o maior potencial, entre os óleos e extratos analisados, para serem usados em formulações de fotoprotetores.

5.4 ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM BIORREATOR

O bioprocesso estudado foi realizado no biorreator demonstrado na **Figura 41**, sendo feito de acordo com o experimento 10, do planejamento experimental (item 4.7), devido a apresentação das maiores atividades enzimáticas de lacase e FPS. Manteve-se como principal elemento o fungo comestível *L. strigosus* e como principal substrato para seu crescimento em meio submerso, sementes trituradas do açaí, acrescido dos nutrientes (fósforo - KH_2PO_4 , nitrogênio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e magnésio - MgSO_4), dois indutores para

produção da enzima lacase (glicerina bidestilada e cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e de água destilada para atingir o volume de 5 L. Além disso, o pH inicial foi de 6,0 e a temperatura foi fixada em 35 °C, mantendo-se a agitação à 150 RPM e entrada de 2.0 L/min de oxigênio até o final do experimento.

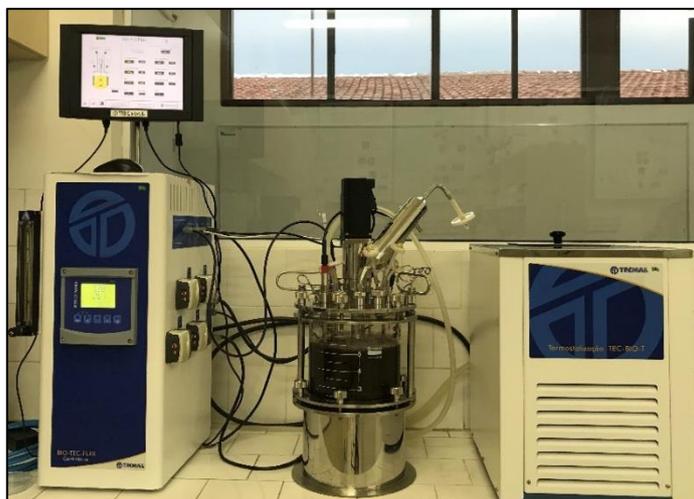


Figura 41. Biorreator utilizado na fermentação submersa

No presente trabalho verificou-se a prospecção química de metabólitos secundários nas 16 amostras coletadas durante os 30 dias de realização do experimento em biorreator, realizando testes fitoquímicos como os de alcaloides, esteroides, saponinas, flavonoides, fenóis e taninos, bem como, verificando a influência do tempo sobre as atividades (atividade de lacase, proteínas, açúcares redutores, atividade fotoprotetora e antioxidante), com o intuito de se obter um estudo mais detalhado da cinética de crescimento fúngico e evolução das atividades biológicas observadas.

5.4.1 Prospecção química de metabólitos secundários

Os testes fitoquímicos apresentados na **Tabela 9** foram realizados, nas 16 alíquotas coletadas no experimento em biorreator, para reconhecimento das classes de substâncias como alcaloides, esteroides, saponinas, flavonoides, fenóis e taninos, a fim de explicar melhor a produção de tais compostos ativos ou degradação dos mesmos correlacionando com a atividade encontrada.

As análises químicas (testes qualitativos) das alíquotas diárias obtidas em biorreator, apresentadas na **Tabela 9**, foram realizadas por meio de reações químicas que resultaram no

desenvolvimento de cor e/ou formação de precipitado, revelando, assim, a presença de alcaloides, esteroides e saponinas, e a ausência de flavonóide, fenóis e taninos.

Tabela 9. Testes fitoquímicos realizados nas alíquotas obtidas do biorreator durante os 30 dias de experimento

SUBSTÂNCIAS	ALÍQUOTAS (tempo/dias)															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
ALCALÓIDES	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESTERÓIDES	-	-	-	+	-	-	-	-	++	++	+	+	+++	+	+	+
SAPONINAS	-	+	-	-	++	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-
FLAVONÓIDE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FENÓIS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TANINOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Wink (2003), evidenciou o fato de que muitos metabólitos secundários presentes nas plantas, como os terpenos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, saponinas, taninos e antraquinonas são aleloquímicos que representam caracteres adaptativos e que tem se diversificado durante a evolução pela seleção natural a fim de proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes e contra os herbívoros.

A presença de alcaloides foi observada após a adição do reagente de Drangendorff em cada amostra, ocorrendo um precipitado floculoso em todos os tubos da análise, como mostra a **Figura 42**.



Figura 42. Precipitado floculoso no fundo dos tubos das amostras

Peixoto Neto et al. (2002), relataram que os fungos podem desempenhar funções relevantes para a estabilidade de um vegetal, numa relação de simbiose, protegendo as plantas contra pragas e patógenos, aumentando o crescimento, enraizamento, resistência a estresses, além de produzir compostos químicos como enzimas, alcalóides, hormônios e antibióticos.

Estes compostos, por sua vez, podem apresentar considerável toxicidade, como é o caso a produção de alcalóides pelos fungos endofíticos, os quais são responsáveis pela proteção das plantas, especialmente gramíneas forrageiras, contra animais herbívoros, como insetos e mamíferos, beneficiando a planta hospedeira e os fungos, que por sua vez se beneficiam pelo acesso aos nutrientes produzidos pela planta (AZEVEDO, 1999).

Conforme Gomes e Lima (2014) os alcalóides esteroidais são os principais metabólitos secundários encontrados na espécie *Solanum acanthodes* (“fruta-do-lobo”) e são de amplo interesse, tanto na área de ecologia como de saúde humana.

A presença de esteroides foi verificada em nove amostras do experimento, onde a amostra 13 (**FIGURA 43**), correspondente ao período de 24 dias do experimento, foi a que apresentou a cor verde mais característica.



Figura 43. Frasco da amostra 13 com a coloração característica da presença de esteroide

Stobiecki et al. (2003), citam que muitas classes de produtos naturais constituem grupos importantes de metabólitos secundários, os quais desempenham papéis importantes na bioquímica e fisiologia dos vegetais e ainda, estando envolvidos em muitos processos fisiológicos de plantas, particularmente naqueles que respondem ao estímulo ambiental.

Os esteroides são substâncias bastante abundantes e fazem parte de um grupo fitoquímico proveniente de metabólitos dos triterpenos. Inclusas nos grupos dos esteroides, estão as saponinas, outra classe de metabólitos (BRUNETON, 1999).

O teste para determinação da presença de saponinas foi feito utilizando clorofórmio e após agitação observou a formação de espuma em algumas das amostras, das quais as amostras 5, 6 e 7, foram as que apresentaram uma espuma persistente e abundante (**FIGURA 44**), indicando a presença de saponinas.



Figura 44. Amostra após agitação e com formação de espuma, indicando presença de saponinas

Não foi detectada a presença de flavonóide em nenhuma das amostras, pois ao final da efervescência de cada reação, não houve o aparecimento da cor vermelha ou castanha. Sabe-se que existe flavonóide no açaí, as antocianinas, e no caso do presente trabalho, não teve concentração de flavonóide detectada pelo método. O teste realizado para fenóis e taninos, não forneceu nenhuma coloração azulada após a adição de cloreto férrico, indicando a ausência dos mesmos. Porém, todas as amostras ficaram com aspecto leitoso (**FIGURA 45**), podendo ser a indicação de glicoproteínas.

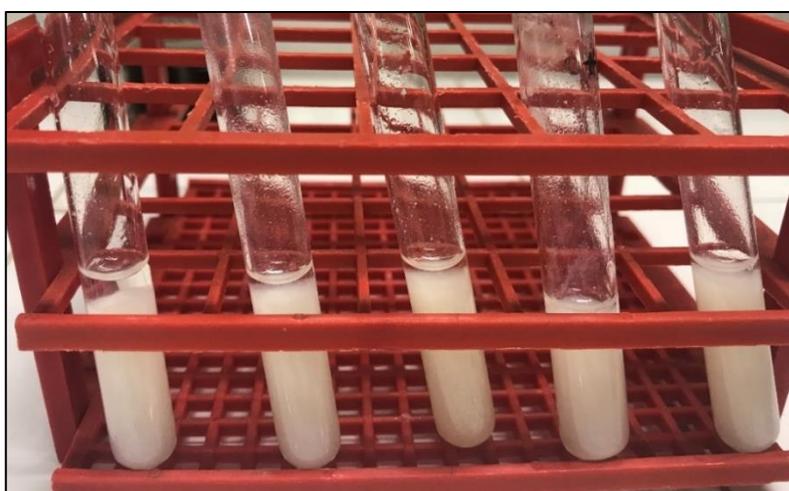


Figura 45. Amostras com aspecto leitoso após a adição de cloreto férrico

5.4.2 Atividade de Lacase

Para a atividade de lacase avaliou-se a influência do tempo sobre a atividade enzimática, verificando assim a produção de lacase durante os 30 dias de realização do experimento no biorreator, apresentando resultados de valor máximo 1523 U/mL no tempo de 28 dias. O perfil cinético de produção enzimática de lacase em biorreator pode ser visualizado na **Figura 46**.

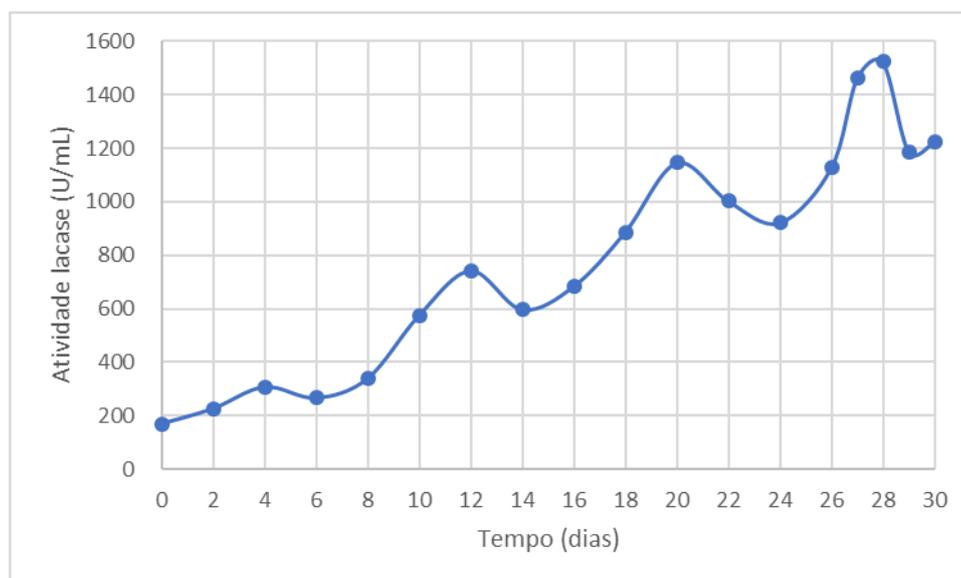


Figura 46. Perfil cinético da produção enzimática de lacase pelo tempo de fermentação por *Lentinus strigosus* em biorreator

No trabalho de Barros et al. (2011), o objetivo foi a obtenção de um extrato enzimático de lacase, a partir de um fungo isolado da região amazônica e degradador de madeira. O mesmo foi cultivado no resíduo da castanha-do-Brasil, por meio de fermentação sólida, no período de 14 dias, em um biorreator à 28 °C e com aeração forçada, obtendo-se um extrato enzimático com atividade de 3.142 U/mL, sendo influenciados pela velocidade de rotação, a variação de temperatura, pH do meio de cultivo e o tempo de cultivo.

Mainardi (2015) em seu trabalho, teve o objetivo de estudar a produção de lacase pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreatores de bancada. Foram conduzidos 11 cultivos em biorreatores de agitação mecânica (STR) e um em biorreator pneumático (air-lift), onde a atividade máxima para lacase obtida em biorreator de agitação mecânica foi de 2.700 U/L em 120 h de cultivo, em 150 rpm de agitação, 1,0 vvm de aeração e pH 4,5. O fungo quando cultivado em biorreator air-lift sob 1,0 vvm de aeração apresentou atividade de 4.014 U/L em 96 horas de cultivo.

Rampinelli (2016) em seu trabalho teve o objetivo de produzir lacase com o fungo *Pleurotus sajor-caju*, utilizando resíduos da bananicultura (folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana) na composição do meio de cultivo em frascos agitados e em biorreator, durante 15 dias. Este meio de cultivo mostrou-se adequado para a produção de lacase pelo fungo, sendo os maiores valores de atividade encontrados utilizando o pó de cascas de banana, tanto nos testes em frascos agitados, quanto em biorreator, com valores iguais a 2.416 e 1.850 U L⁻¹, respectivamente.

Queiroz (2017) utilizou variáveis diferentes na obtenção da enzima lacase, com o fungo *Aspergillus brasiliensis* em experimento realizado em shaker. O melhor resultado no planejamento fracionado para a atividade enzimática da lacase (1418 U/mL) foi obtida com fósforo e magnésio em 1,8%, cobre em 1,1%, nitrogênio 0,2% e tween 0,5%. Após, foi feito um planejamento completo, aumentando a variável cobre para 2,1%, obtendo-se um melhor resultado da atividade enzimática lacase (2668 U/mL).

Bonomini et al (2017), em seu trabalho, teve como objetivo avaliar a produção das enzimas extracelulares lipase, lacase, amilase, celulase, pectinase, protease e inulinase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 e *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001, durante 14 dias, utilizando frascos de Erlenmeyer agitados contendo meio composto por extrato de trigo adicionado da fonte de carbono específica para a indução de cada enzima. O fungo *P. djamor* apresentou maior produção para a enzima lacase (144,72 U/L) em 9 dias de cultivo quando comparada à produção da mesma enzima por *P. sajor-caju* (37,22 U/L), em 3 dias de cultivo.

5.4.3 Proteínas

A quantidade de proteína no meio produzido em biorreator foi analisada, ao longo do tempo de cultivo (30 dias), como parâmetro de avaliação da produção da lacase, obtendo-se no 30º dia o máximo de produção (2,135 U/mL), confirmando a produção da enzima. Desse modo, conforme experimento 10, do planejamento experimental, apresentado no item 4.7, realizado em shaker, a produção de lacase em biorreator se deu de maneira satisfatória, pois com o aumento de tempo do experimento, houve aumento na produção de proteínas corroborando os resultados. O perfil cinético da produção de proteína pode ser visualizado na **Figura 47**.

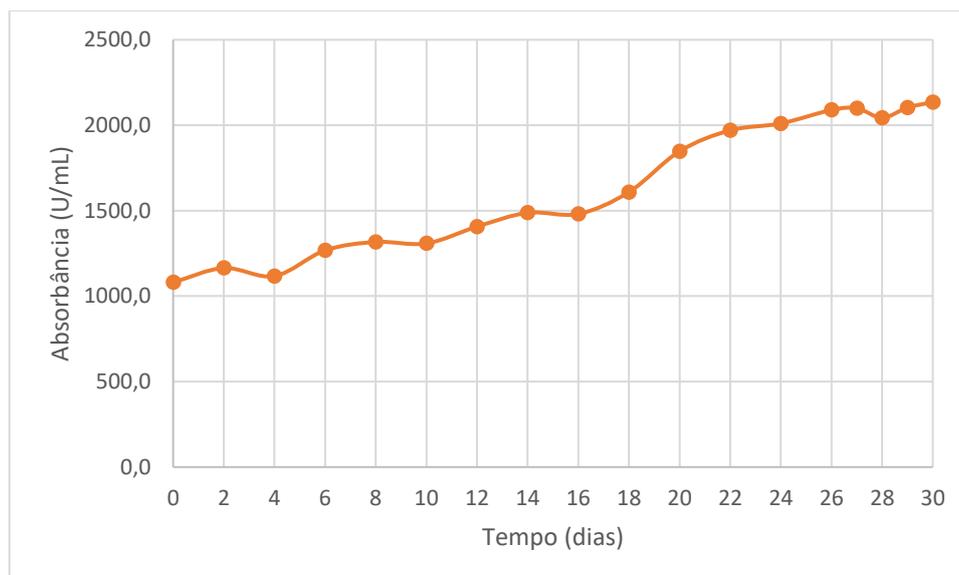


Figura 47. Perfil cinético da produção de proteínas pelo tempo de fermentação por *Lentinus strigosus* em biorreator

A **Figura 48** apresenta as absorbâncias das atividades enzimáticas de lacase e a concentração de proteínas em função do tempo de fermentação do fungo *L. strigosus* em biorreator, no período de 30 dias.

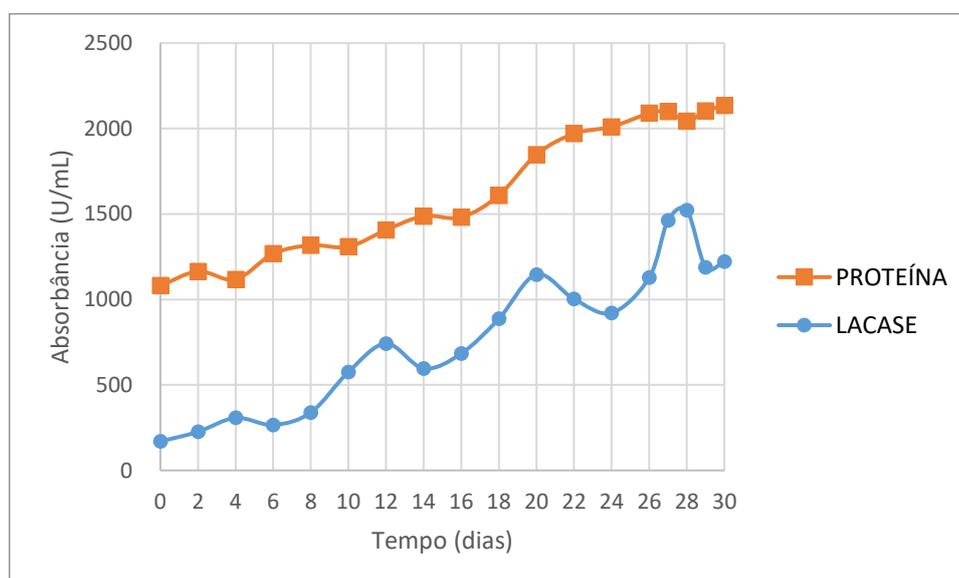


Figura 48. Absorbâncias obtidas para o cálculo de atividade enzimática e para o cálculo da concentração de proteínas em função do tempo de fermentação de *Lentinus strigosus* em biorreator

Entende-se que, com o aumento da atividade enzimática, a concentração de proteínas deve aumentar, podendo-se comprovar no trabalho de Queiroz (2017), onde encontrou-se ao longo do tempo de cultivo (14 dias) em biorreator, a quantidade de proteína solúvel no meio de $720 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para a maior atividade de lacase (1530 U/mL). Já Periasamy e Palvannan

(2010) estudaram a produção de lacase pelo fungo *P. ostreatus*, obtendo atividade de lacase máxima de 906,3 U/mL. Os autores utilizaram como substrato, extrato de malte e extrato de levedura em fermentação submersa acrescido do indutor cobre e fonte de nitrogênio orgânico.

Cavallazzi et al. (2005), investigaram o efeito de alguns compostos utilizados como indutores de lacase em fungos na produção destas enzimas por *Lentinula edodes*, sendo, inicialmente, selecionado um meio de cultura com 2,6 mM N e 250 µM de Cu. Após, foi adicionado a este meio os indutores (ácido gálico, catecol, tartarato de amônio, ácido hidroxibenzóico e vanilina). A atividade de lacase por shiitake foi inibida pelo ácido gálico e pelo catecol, e um experimento com os outros indutores foi conduzido por 30 dias. Apenas as culturas com tartarato de amônio apresentaram atividade de lacase maior que o tratamento controle, alcançando 251 U/mL de extrato após 30 dias de cultivo.

Santana et al. (2018), avaliaram a atividade de lacase de *L. crinitus* cultivado em vinhaça e ureia com adição simples ou combinada de indutores de lacase. Utilizou-se frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL meio de uva-ureia, distribuídos nos frascos com e sem indutores de lacase. Os frascos foram inoculados com três discos de micélios e incubados a 28 ± 1 °C no escuro, durante 30 dias. Os indutores de lacase foram adicionados ao meio de cultivo após três dias da inoculação. A produção de lacase de *L. crinitus* aumentou quando 250 µM de cobre ou xilidina 1 mM foi adicionado ao meio de uva-ureia.

5.4.4 Açúcares Redutores

A **Figura 49** apresenta o consumo do açúcar nas 16 alíquotas do experimento realizado no biorreator, no período de 30 dias. Observa-se que, a partir do 10º dia, ocorre a redução gradativa do açúcar no meio, indicando o consumo pelo fungo utilizado.

O gráfico da absorbância da atividade de lacase em função dos açúcares consumidos durante o período do experimento cultivado em biorreator é observado na **Figura 50**. Assim, quando a concentração dos açúcares diminui, nota-se que, a atividade enzimática aumenta, e quando os açúcares chegam próximo de zero (30 dias), a atividade enzimática de lacase apresenta um pico de constância, indicando que, se a fermentação no biorreator continuasse, o nível de produção da enzima lacase pelo fungo *L. strigosus* poderia ficar com rendimento mais baixo.

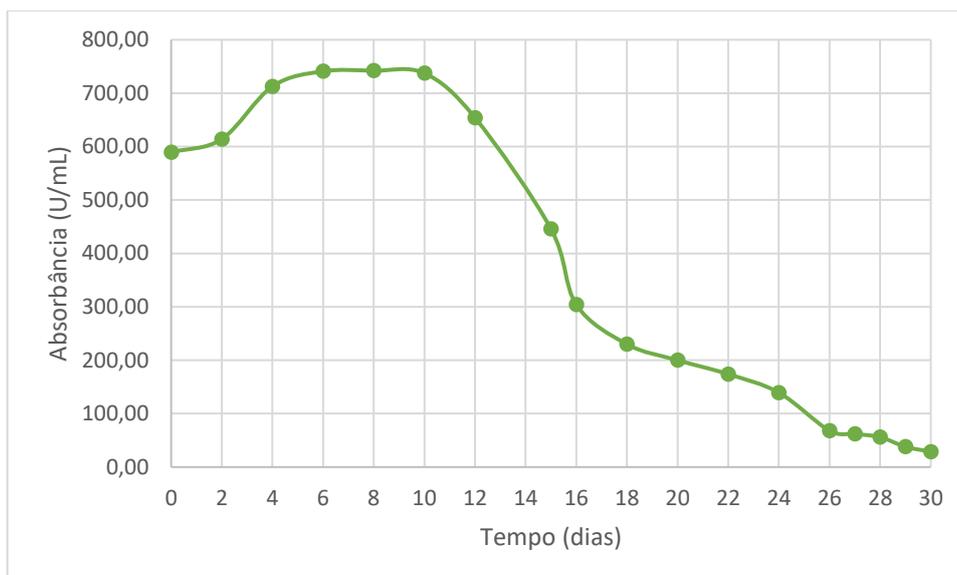


Figura 49. Consumo dos açúcares em função do tempo de cultivo realizado no biorreator

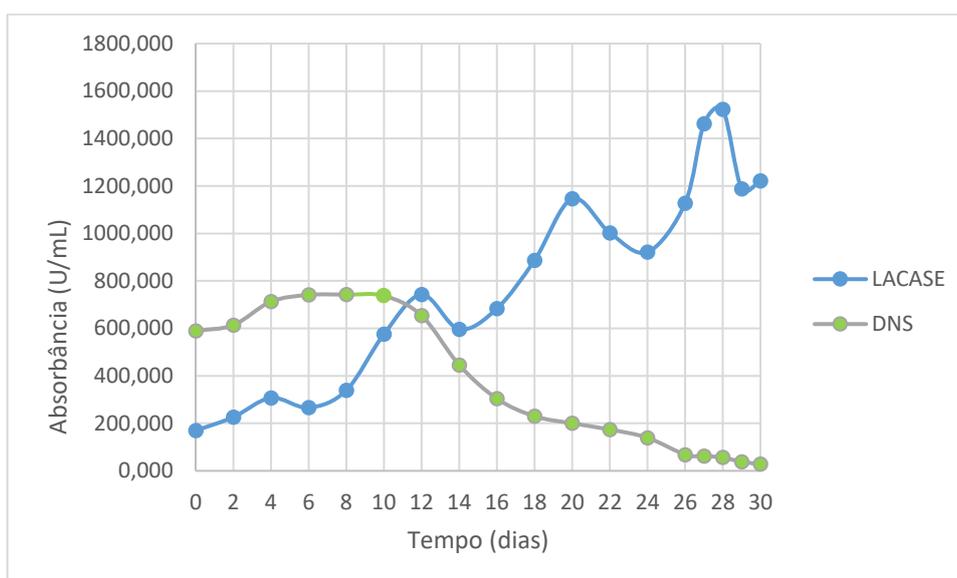


Figura 50. Absorbância da atividade de lacase em função dos açúcares consumidos durante o período do experimento em biorreator

Rodrigues (2006), em seu trabalho, teve como principal objetivo a produção de um concentrado rico em ácido cítrico (AC) por fermentação no estado sólido (FES) a partir da polpa cítrica (PC), utilizando o fungo *Aspergillus niger*. Nas primeiras 24 horas ocorre a adaptação do fungo ao meio de fermentação e então se inicia o consumo de açúcares e produção de AC. A formação micelial é observada em 48 horas o que acarreta o consumo de açúcares redutores presentes no meio. Tal fato é devido ao *A. niger* não possuir capacidade de hidrolisar a sacarose no início de seu crescimento, somente após a formação dos micélios é que juntamente com estes é formada a enzima invertase extracelular, capaz

de hidrolisar sacarose em meio ácido. Assim, a maior produção de AC se deu em 96 horas (441,05 g de AC/Kg de PC seca) quando já havia sido formada biomassa suficiente e todo o açúcar necessário estava disponível ao metabolismo e produção do AC. A partir de então a quantidade de açúcar presente começou a cair mais rapidamente estabilizando-se em 3% de açúcares totais, o que provavelmente é uma quantidade limitante para a sobrevivência do fungo que assim, pode começar a utilizar outras fontes de carbono como o próprio AC para sua manutenção. Este fato foi observado com a queda de 17,2% na quantidade de AC após 144 horas de fermentação.

5.4.5 Fator de Proteção Solar

O FPS foi verificado nas 16 alíquotas obtidas no experimento do biorreator realizado durante os 30 dias. Na **Figura 51** verifica-se que o ápice da atividade fotoprotetora ficou entre 16 e 20 dias, apresentando o máximo de FPS 24 em 20 dias. Já no planejamento experimental, mostrado no item 5.3.3, o valor do FPS atingido em 18 dias, foi de 21, e o presente trabalho apresentou o valor de FPS 21, nas mesmas condições, corroborando o resultado das análises realizadas nas amostras coletadas.

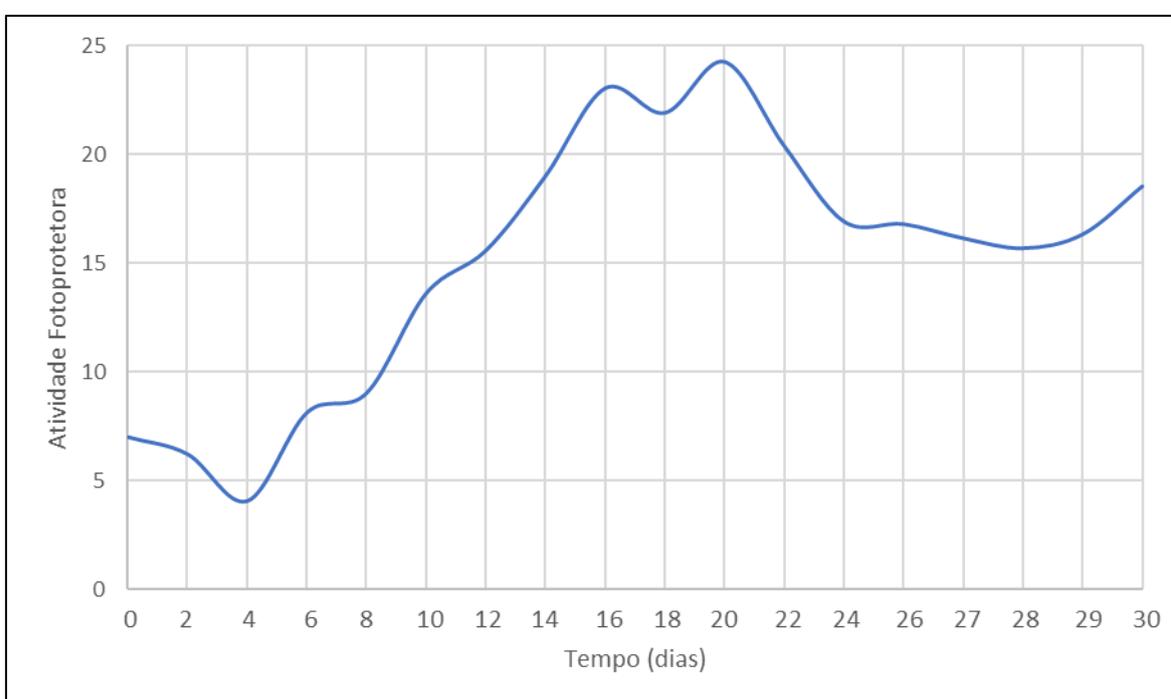


Figura 51. Atividade fotoprotetora das amostras coletadas do biorreator no período de 30 dias

Dengo e Ferreira (2017) avaliaram a atividade fotoprotetora in vitro, do extrato concentrado proveniente do bagaço da uva Isabel, aplicado a uma base de gel hidrofílico, e, também, a caracterização de compostos presentes no extrato. Verificaram a detecção da presença de metabólitos secundários no extrato do bagaço da uva Isabel, por meio das reações gerais farmacognósticas, assim como a avaliação da sua capacidade de fotoproteção in vitro, mediante a técnica espectrofotométrica. O extrato do bagaço da uva Isabel mostrou-se capaz de incrementar o FPS de formulações cosméticas em base de gel hidrofílico e apresentou-se preliminarmente estável em um período de 30 dias, à temperatura ambiente (15 °C a 30 °C).

Já o trabalho de Maciel et al. (2018), teve como objetivo avaliar o potencial fotoprotetor de frações e substâncias isoladas do fungo endofítico *Annulohyphoxylon stygium*, que foi isolado pela primeira vez da alga vermelha *Bostrychia radicans*, sendo uma grande fonte potencial de cromóforos para ser utilizados como filtros UV-B em protetores solares.

5.4.6 Atividade Antioxidante

Para verificação das atividades antioxidantes das 16 amostras coletadas durante os 30 dias de realização do experimento em biorreator, foram feitas novamente as análises conforme item 5.3.2, onde, os resultados obtidos, continuaram sem apresentar atividade em nenhuma das amostras analisadas.

5.5 OBTENÇÃO E ANÁLISE DA FORMULAÇÃO

Para a obtenção do bioproduto, inicialmente foi feito um teste de proporção óleo em água com diferentes tensoativos. A partir da formulação mais estável foram preparadas emulsões com diferentes tipos de base auto emulsionantes a fim de verificar a maior compatibilidade quanto as propriedades físico-química para a obtenção de uma máscara capilar contendo lacase em sua composição.

5.5.1 Elaboração das Emulsões

A fim de analisar a compatibilidade química entre os componentes da formulação final, elaborou-se cinco emulsões, na primeira etapa, contendo extrato fúngico obtido do biorreator, dois tensoativos Span 80 (lipofílico) e Tween 80 (hidrofílico), óleo de castanha-

da-Amazônia e água. Na **Tabela 10** estão apresentados os valores do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) para as emulsões tipo óleo em água (O/A) com diferentes concentrações dos tensoativos. Foram realizadas as análises macroscópicas e físico-químicas, após 24h, a fim de verificar se as emulsões se apresentavam estáveis quanto aos aspectos físico-químicos.

Tabela 10. Valores de EHL para as emulsões tipo O/A com diferentes concentrações de tensoativos

Amostras	Span 80	Tween 80	EHL
	% m/m	% m/m	
1	4,0	1,0	6,44
2	3,5	1,5	7,51
3	3,0	2,0	8,58
4	2,5	2,5	9,65
5	2,0	3,0	10,72

EHL=Equilíbrio hidrófilo e lipófilo. %m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução

5.5.2 Análise Macroscópica

Após 24h da obtenção da formulação das cinco emulsões, feitas em triplicata, foram observadas que as mesmas apresentaram características de um fluido pouco viscoso, de cor branca, odor característico, aspecto leitoso e homogêneo, demonstrando boa dispersão do óleo em água (**FIGURA 52**).

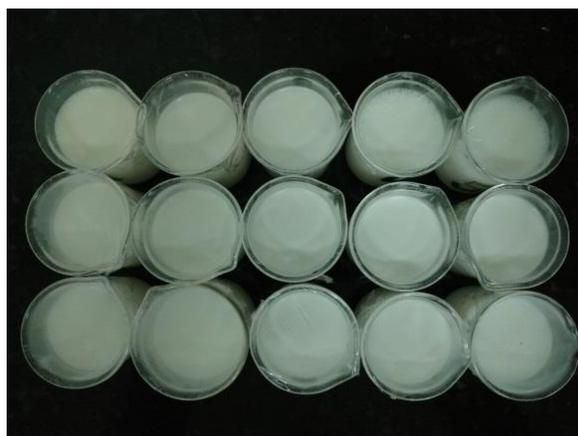


Figura 52. Emulsões O/A (óleo em água) após 24h de sua elaboração em triplicata preparadas com extratos fúngicos contendo lacase por meio de fermentação

Após a observação das características, conforme a ANVISA (2008), as emulsões passaram pelo teste de centrifugação, indicando a necessidade de alteração na composição

da formulação, pois ocorreu estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, antecipando possíveis instabilidades.

Assim, a centrifugação demonstrou que as emulsões 1, 2 e 3, apresentaram uma maior separação de fases (**FIGURA 53**), sendo descartadas no processo de formulação final. A fase separada tinha aspecto de pequenas bolhas de espuma, que podem ter sido formadas no momento da agitação para a formulação das emulsões.

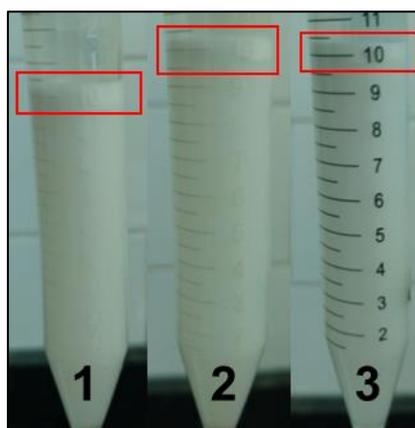


Figura 53. Emulsões apresentando maior separação de fases

A emulsão 4 também foi descartada, e dentre as cinco emulsões formuladas, escolheu-se a emulsão 5, a qual apresentou uma menor separação de fases e uma maior homogeneidade (**FIGURA 54**).

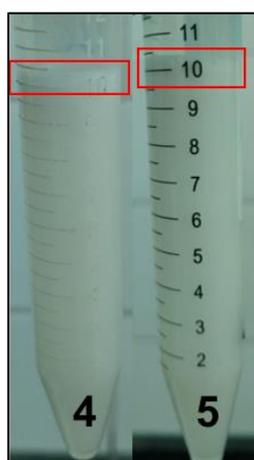


Figura 54. Emulsões apresentando menor separação de fases

Foram preparadas, na segunda etapa, formulações distintas a partir da emulsão escolhida, em duplicata, contendo extrato fúngico (2%), óleo de castanha-da-Amazônia

(1,5%), tensoativos (Span 80 e Tween 80) (5%), água e distintas bases auto-emulsionantes: CT Vital Wax (não-iônica), Olivem 1000 (não-iônica) e Lanette N (aniônica) (5%).

Todas as formulações passaram pelas observações das características e apresentaram coloração similar umas às outras, com odor característico, aspecto homogêneo e viscoso (**FIGURA 55**).



Figura 55. Formulações apresentando as mesmas características macroscópicas

De acordo com a **Figura 56**, pode-se observar que as emulsões 5.1, 5.2 e 5.3, preparadas, respectivamente, com as bases CT Vital Wax, Olivem 1000 e Lanette N, não apresentaram separação de fases, após o teste de centrifugação, mostrando-se, portanto, homogêneas.

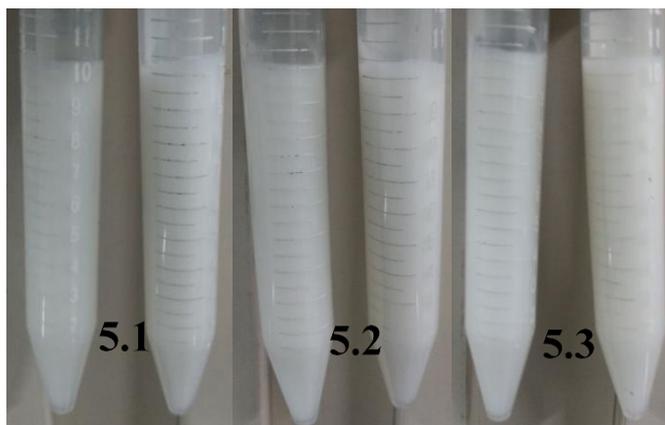


Figura 56. Amostras das formulações com bases distintas após o teste de centrifugação

5.5.3 Análise Físico-química

Para obter-se um melhor resultado na obtenção da formulação final, foram realizadas análises físico-químicas das emulsões preparadas, dentre as quais, fazem parte a análise de pH, condutividade, densidade relativa, sólidos totais, viscosidade e espalhabilidade.

5.5.3.1 Análise de pH

As formulações das emulsões de 1 a 5, com diferentes valores de concentrações dos tensoativos, apresentaram pH variando de 5,81 a 5,99 como pode ser observado na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores de pH para as formulações contendo diferentes tensoativos

Amostras	Span 80 Tween 80		pH
	% m/m	% m/m	
1	4,0	1,0	5,99 ± 0,50 ^a
2	3,5	1,5	5,96 ± 0,46 ^a
3	3,0	2,0	5,92 ± 0,56 ^a
4	2,5	2,5	5,86 ± 0,42 ^a
5	2,0	3,0	5,81 ± 0,34 ^a

%m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA) considerando $p < 0,05$, não houve diferença significativa entre as mesmas. Estes valores sugerem um comportamento estável independente das proporções dos tensoativos nas formulações. As emulsões permaneceram com o pH dentro da faixa de compatibilidade com o pH fisiológico da pele que se encontra em torno de 4,6 a 6,0 (RODRIGUES, 2013), como pode ser observado na **Tabela 11**.

Para Isaac et al. (2008) os valores de pH devem ser mantidos entre 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo. Preferencialmente, busca-se utilizar produtos com pH ligeiramente ácido a fim de que a microbiota cutânea não sofra nenhuma interferência. Formulações ligeiramente ácidas, também são menos irritantes que as alcalinas (KORTING et al., 1990).

Na segunda etapa, preparada a partir da emulsão escolhida, as formulações apresentaram bases auto-emulsionantes distintas. De acordo com a análise de variância (ANOVA) considerando $p < 0,05$, observou-se, nos valores de pH, diferença significativa para as bases Olivem 1000 e CT Vital Wax (**TABELA 12**), a qual, pode estar relacionada com o processo de degradação dos compostos graxos, em consequência do tempo de exposição do produto.

Tabela 12. Valores de pH para diferentes tipos de bases auto emulsionantes

Amostras	CT Vital Wax	Olivem 1000	Lanette N	pH
	% m/m	% m/m	% m/m	
5.1	5,0	-	-	5,53 ± 0,23 ^a
5.2	-	5,0	-	6,19 ± 0,29 ^b
5.3	-	-	5,0	6,02 ± 0,59 ^{ab}

%m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

5.5.3.2 Análise de Condutividade

A determinação da condutividade elétrica das formulações é uma técnica muito utilizada para monitorar a estabilidade das emulsões, verificando a integridade da fase externa (LATREILLE e PAQUIN, 1990; FERRARI, 1998; AZZINI, 1999). Através desse método é possível avaliar a variação no conteúdo de água livre no sistema emulsionado e, dessa maneira, identificar mudanças estruturais que possam ocorrer (KORHONEN et al., 2002; MASSON, 2005).

A **Tabela 13** apresenta as formulações das emulsões de 1 a 5, com diferentes valores de concentrações dos tensoativos, e que apresentaram valores de condutividade na faixa de 9,73 a 12,76 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para as formulações 2 e 1, respectivamente. Foi observado que, os valores de condutividade elétrica são independentes das variações dos tensoativos utilizados, pois não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações elaboradas.

Tabela 13. Valores de condutividade para as formulações contendo diferentes tensoativos

Amostras	Span 80	Tween 80	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
	% m/m	% m/m	
1	4,0	1,0	12,76 ± 0,89 ^a
2	3,5	1,5	9,73 ± 2,03 ^a
3	3,0	2,0	10,09 ± 1,77 ^a
4	2,5	2,5	10,75 ± 1,50 ^a
5	2,0	3,0	12,13 ± 2,20 ^a

%m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística

Na segunda etapa da formulação das emulsões contendo bases auto emulsionantes distintas, apresentado na **Tabela 14**, os valores para a condutividade apresentaram-se com uma grande variação, onde, obteve-se um valor para a base CT Vital Wax de 7,74 $\mu\text{S}/\text{cm}$, para Olivem 1000 de 29,80 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e para Lanette N de 76,42 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Essa grande variação

era esperada, sabendo que Lanette N é uma base aniônica e as demais são não-iônicas, mediante a análise estatística foi observado diferença significativa para as bases com $p < 0,01$.

Tabela 14. Valores de condutividade para diferentes tipos de bases auto emulsionantes

Amostras	CT Vital Wax % m/m	Olivem 1000 % m/m	Lanette N % m/m	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)
5.1	5,0	-	-	$7,74 \pm 0,26^a$
5.2	-	5,0	-	$29,80 \pm 0,89^b$
5.3	-	-	5,0	$76,42 \pm 2,15^c$

%m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

5.5.3.3 Análise de Densidade Relativa

As formulações das emulsões de 1 a 5, com diferentes concentrações de tensoativos, tiveram valores de densidade próximo do componente majoritário, a água. Foi observado que com o aumento da concentração do Tween 80 (densidade: 1,06-1,09 g/ml) aumentou o valor da densidade das formulações (**TABELA 15**). Isso se deve ao fato do tensoativo Tween 80 ter caráter predominantemente polar.

Tabela 15. Valores de densidade relativa para as formulações contendo diferentes tensoativos

Amostras	Span 80 % m/m	Tween 80 % m/m	Densidade (g/mL)
1	4,0	1,0	$0,9995 \pm 0,0009^a$
2	3,5	1,5	$0,9996 \pm 0,0011^a$
3	3,0	2,0	$1,0005 \pm 0,0007^{ab}$
4	2,5	2,5	$1,0016 \pm 0,0007^{bc}$
5	2,0	3,0	$1,0025 \pm 0,0023^c$

%m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

A amostra 4 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada com as amostras 1 e 2, ainda para o mesmo valor de p. Através da Análise de Variância (ANOVA) teve diferença entre as amostras 3 e 5, a amostra 5 para o $p < 0,01$ deu diferença significativa com as amostras 1 e 2.

Na segunda etapa da formulação das emulsões, contendo bases auto emulsionantes distintas, apresentada na **Tabela 16**, a densidade relativa diminuiu em relação à amostra 5

escolhida. Através da análise estatística observou-se diferença significativa entre as bases Olivem 1000 e Lanette N, para o $p < 0,01$.

Tabela 16. Valores de densidade relativa para diferentes tipos de bases auto emulsionantes

Amostras	CT Vital Wax % m/m	Olivem 1000 % m/m	Lanette N % m/m	Densidade (g/mL)
5.1	5,0	-	-	$0,9442 \pm 0,0100$ ^{ab}
5.2	-	5,0	-	$0,9654 \pm 0,0224$ ^a
5.3	-	-	5,0	$0,9015 \pm 0,0451$ ^b

%m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

5.5.3.4 Análise de Sólidos Totais

O total de substâncias inorgânicas e orgânicas não voláteis, presentes nas formulações com diferentes concentrações de tensoativos, sob as formas ionizadas, micro granulares ou moleculares é quantificado pela análise de sólidos totais dissolvidos (JEZINI, 2013).

Na **Tabela 17** é possível observar que houve pouco sólidos totais. As formulações 3, 4 e 5 foram as que tiveram comportamento estável independente das variações dos tensoativos Span 80 e Tween 80 com $p < 0,05$.

Tabela 17. Valores de sólidos totais para as formulações contendo diferentes tensoativos

Amostras	Span 80 % m/m	Tween 80 % m/m	Sólidos Totais (%)
1	4,0	1,0	$5,83 \pm 0,86$ ^a
2	3,5	1,5	$7,03 \pm 1,17$ ^b
3	3,0	2,0	$6,81 \pm 0,56$ ^{ab}
4	2,5	2,5	$7,02 \pm 0,75$ ^{ab}
5	2,0	3,0	$6,94 \pm 0,98$ ^{ab}

%m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

Na segunda etapa da formulação, contendo bases auto emulsionantes distintas, apesar dos valores obtidos serem próximos (**TABELA 18**), houve diferença estatística entre as bases Olivem 1000 e CT Vital Wax com $p < 0,05$. No entanto, dentro dos valores observados, os mesmos não têm influência sobre as características das formulações.

Tabela 18. Valores de sólidos totais para diferentes tipos de bases auto emulsionantes

Amostras	CT Vital Wax % m/m	Olivem 1000 % m/m	Lanette N % m/m	Sólidos Totais (%)
5.1	5,0	-	-	12,31 ± 0,04 ^a
5.2	-	5,0	-	12,70 ± 0,40 ^b
5.3	-	-	5,0	12,39 ± 0,08 ^{ab}

% m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

5.5.3.5 Análise de Viscosidade

Os valores de viscosidade obtidos para as formulações com diferentes concentrações de tensoativos (**TABELA 19**), mostram que houve diferença significativa entre as formulações 1 e 2 para $p < 0,05$, e entre as formulações 2 e 5 para $p < 0,01$ e entre as formulações 3 e 5 para $p < 0,01$.

Tabela 19. Valores de viscosidade para as formulações contendo diferentes tensoativos

Amostras	Span 80 % m/m	Tween 80 % m/m	Viscosidade (mPa.s)
1	4,0	1,0	5,97 ± 0,78 ^{ac}
2	3,5	1,5	7,96 ± 1,43 ^b
3	3,0	2,0	7,73 ± 1,90 ^{ab}
4	2,5	2,5	6,17 ± 1,69 ^{abc}
5	2,0	3,0	5,39 ± 0,81 ^c

% m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

Um sistema emulsionado é caracterizado pela variável viscosidade, esse parâmetro é um dos determinantes se o produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada, indicando se a estabilidade é adequada, ou seja, fornece indicação do comportamento do produto ao longo do tempo (ANVISA, 2004), podendo ser alterada pela composição de lipídios, proporção entre as fases aquosa e oleosa, concentração dos emulsionantes e pela adição de polímeros (MILAN et al., 2007).

A **Tabela 20** apresenta os resultados obtidos da segunda etapa do preparo das formulações contendo bases auto emulsionantes distintas. Os valores de viscosidade com relação as bases, teve diferença significativa entre Lanette N quando comparada as bases Olivem 1000 e CT Vital Wax, com $p < 0,01$.

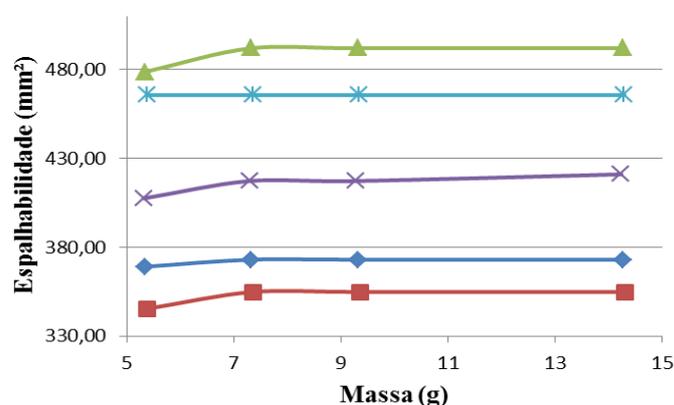
Tabela 20. Valores de viscosidade para diferentes tipos de bases auto emulsionantes

Amostras	CT Vital Wax % m/m	Olivem 1000 % m/m	Lanette N % m/m	Viscosidade (mPa.s)
5.1	5,0	-	-	1242,22 ± 82,20 ^a
5.2	-	5,0	-	1273,34 ± 103,06 ^a
5.3	-	-	5,0	1920,56 ± 86,39 ^b

% m/m: porcentagem da massa do soluto para cada 100g da solução. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística

5.5.3.6 Análise de Espalhabilidade

As emulsões de 1 a 5 formuladas com diferentes valores de concentrações dos tensoativos foram submetidas ao teste de espalhabilidade e mostraram que o raio das emulsões se alterou quando foi colocada a lâmina (5,35 g) até adição do 1° peso (1,98 g), o que sugere que deveriam ser colocados pesos menores, variando até 1,98 g. Este resultado está diretamente relacionado a viscosidade baixa das formulações, por se tratar de amostras muito fluidas. A **Figura 57** apresenta o gráfico com os perfis de espalhabilidade das cinco formulações das emulsões preparadas com diferentes tensoativos.

**Figura 57.** Gráfico com os perfis de espalhabilidade das formulações com diferentes tensoativos

Já na segunda etapa, é possível observar o gráfico de espalhabilidade (**FIGURA 58**) para os diferentes tipos de bases auto emulsionantes, onde a base CT Vital Wax foi a que teve maior espalhabilidade, seguida de Lanette N e Olivem 1000. A base com maior espalhabilidade foi a que apresentou menor viscosidade.

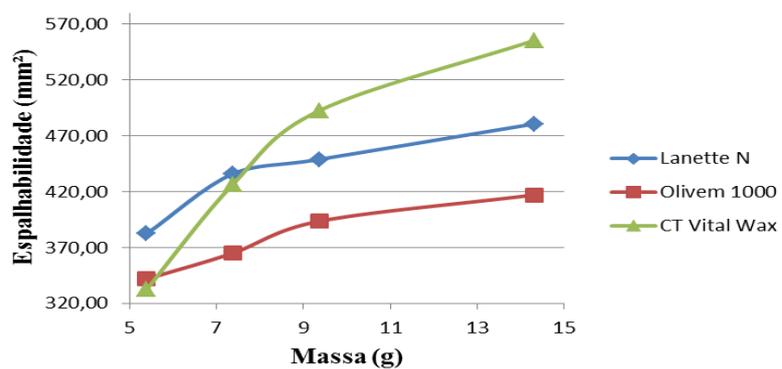


Figura 58. Gráfico com os perfis de espalhabilidade para diferentes tipos de bases auto emulsionantes

6 CONCLUSÕES

Dentre os três resíduos agroindustriais (açai, manga e taperebá) utilizados para crescimento do fungo *Lentinus strigosus*, tanto na fermentação líquida, quanto na fermentação sólida, observou-se que o açai foi o resíduo que apresentou os melhores resultados.

Na **fermentação líquida**, o valor de fator de proteção solar para o extrato etanólico da biomassa fúngica obtida teve um aumento de 43,20% comparando com o valor de fator de proteção solar do extrato etanólico obtido do resíduo do açai.

Na **fermentação sólida**, a miceliação total do fungo *Lentinus strigosus* ocorreu apenas no resíduo do açai, nas mesmas condições de cultivo dos outros resíduos (manga e taperebá).

Para a **fermentação submersa**, o melhor resultado na atividade enzimática da lacase (4053 U/mL), quanto no FPS 21, foi obtido no experimento que continha as variáveis com níveis maiores de fósforo e níveis menores de magnésio, nitrogênio, cobre e glicerina bidestilada tanto. Em todos os experimentos foi observado, inicialmente, uma relativa atividade antioxidante e, com o progresso da fermentação, uma queda na mesma.

Para o experimento realizado em **biorreator de bancada**, na análise do fator de proteção solar durante o período de fermentação, pode-se verificar que o melhor resultado foi no 20º dia (FPS 24). A atividade da enzima lacase e a produção de proteína continuaram ao longo do tempo do cultivo, apresentando os melhores resultados, respectivamente, no 28º dia (1,523 U/mL) e no 30º dia (2,135 U/mL), sendo consumidos os açúcares presentes no meio pelo fungo *Lentinus strigosus*. As 16 alíquotas coletadas durante os 30 dias de realização do experimento em biorreator, não apresentaram atividade antioxidante.

Para realizar a **formulação**, foi escolhido o experimento que apresentou EHL 10,72 e maior homogeneidade após 24 h de sua formulação, sendo utilizado 1,5% m/m de óleo e 5% m/m da mistura de tensoativos não-iônicos (Tween 80 e Span 80), com variação das concentrações de tensoativos. Foram avaliados os parâmetros físico-químicos das emulsões, e observou-se os seguintes resultados: pH=6,19, condutividade=29,80 $\mu\text{S}/\text{cm}$, $\rho=0,9654$ g/mL (densidade), ST=12,70% (sólidos totais), $\eta=1273,34$ (viscosidade) e espalhabilidade=417,10 mm^2 .

A emulsão com a base Olivem 1000 foi escolhida para a continuidade do trabalho, sendo que, com a adição do extrato fúngico, as características apresentaram-se melhores,

quanto ao aspecto, maior homogeneidade, aspecto brilhoso, uma boa espalhabilidade sobre a pele e melhor sensação ao toque.

O extrato fúngico enzimático incorporado a formulação elaborada apresentou-se como uma matéria-prima viável para o desenvolvimento de uma máscara capilar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI – AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. **Relatório de acompanhamento setorial cosméticos**. Brasília: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, v. 1, 19 p., 2008.

ABIHPEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Panorama do Setor**. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2012/04/Panorama-do-setor-2011-2012-17-ABR-2012.pdf>> Acesso em: 16 de março de 2018.

ABIHPEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Panorama do Setor**. 2016. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2016-PANORAMA-DO-SETORPORTUGU%C3%8AS-14jun2016.pdf>> Acesso em: 22 jun. 2017.

ABRAHAM, L. S.; MOREIRA A. M.; MOURA L. H.; GAVAZZONI M. F. R.; ADDOR, F. A. S. Tratamentos estéticos e cuidados dos cabelos: uma visão médica. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 1, n. 4, p. 178-185, 2009.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

AL-GHAZZEWI, F. H.; TESTER, R. F. Impact of prebiotics and probiotics on skin health. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 2, p. 99-107, 2014.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2. ed. Brasília, 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Série: Qualidade. v. 1, Anvisa, 1 ed., Brasília, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de boas práticas em pesquisa e desenvolvimento para a indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**. Anvisa, 1 ed., 36 p., 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO - RE N° 1, DE 29 DE JULHO DE 2005** (Publicada no DOU nº 146, de 1 de agosto de 2005). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_01_+2005_.pdf/18746b14-c3a6-4e43-9721-694c2488f274?version=1.0. Acesso em 15/02/2017.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO nº 211, DE 14 DE JULHO DE 2005** (Publicada no D.O.U., de 18 de julho de 2005). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/dfa9b6804aee482bb7a1bfa337aba_e9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+211,+de+14+de+julho+de+2005.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 26 ago. 2017.

AOUADA, F. A.; MOURA, M. R.; GIROTTO, E. M.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Caracterização de Hidrogéis Condutores Constituídos por PAAm e PEDOT/PSS por meio de Planejamento Fatorial. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 18, n. 2, p. 126 – 131, 2008.

AZEVEDO, J.L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 22, p. 225-229, 1999.

AZZINI, R.G. Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos. *Dissertação* (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 169f., 1999.

BAILER, A. C.; DOGNINI, L.; MOSER, D. K. **Coloração sintética capilar: uma abordagem sobre os conceitos, classificação e suas funções.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Ana%20Claudia%20Bailer%20e%20Luana%20Dognini.pdf>>. Acesso em: 16 de março de 2018

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology letters*, v. 206, n. 1, p. 69-74, 2002.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; CUNHA, E. V. L.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O. S. Antiinflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, n.1, p. 109-34, 2006.

BARRETO, S. M.; FRANCO, G. M. R. Evaluación de la síntesis de proteína a partir del crecimiento vegetativo de *Pleurotus* sp. sobre residuos de algarrobo y uva pasa. *Revista Universidad de Caldas*, p. 23-31, 2006

BARROS, A. C.; ALBUQUERQUE, P. M.; DUVOISIN JR., S.; SERUDO, R. L. **Estudo da produção de lacase fúngica em meio sólido utilizando resíduo da semente do cupuaçu.** Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocesso. Caxias do Sul. Rio Grande do Sul. 2011.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. *Cosmetics and Toiletries*, v. 109, p. 63-78, 1994.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. Introduction to Biocatalysis. *Biocatalysis and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Verlag GmbH e Co.KgaA, Weinheim, 2004.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado.** BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., VERMELHO, A. B., PAIVA, C. L. A., DE ALENCASTRO, R. B., COELHO, R. R. R., orgs; Editora Interciência Ltda.: Rio de Janeiro, cap. 5, 2008.

BONOMINI, F. M.; WISBECK, E.; GERN, R. M. M. Produção de enzimas por *Pleurotus Sajor-caju* e *Pleurotus djamor*. *Revista NBC*, Belo Horizonte, v. 7, n. 14, p. 109-126, novembro de 2017.

BOOTS THE CHEMISTS Ltda. (England). The Revised guidelines to the ractical measurement of UVA: UVB ratios according to the boots star rating system. *Nottingham: The Boots CO PLC*, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002. Aprova o **Regulamento Técnico sobre Protetores Solares em Cosméticos**. Diário Oficial da União, nº 163, Seção 1E, p. 40, 23 de agosto de 2002.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: phytochemistry medical plants**. 2. ed. Paris: Lauvoisier, p. 1119, 1999.

BUCHILI, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmetics and Toiletries**, v. 14, n. 2, p. 54-57. 2002.

CÁCERES, A.; CRUZ, S. Contributions of natural ingredients from the mesoamerican biodiversity for the phytocosmetic industry. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 2, n. 1, 2015.

CALEFFI, R.; HEIDEMANN, T. R.; MOSER, D. K. **Cloreto de Sódio: análise de sua função na formulação de xampus para manutenção de cabelos quimicamente tratados**. Artigo em Hypertexto. Disponível em: < <http://siaibib01.univali.br/pdf/Rubia%20Caleffi%20e%20Thais%20Rodrigues%20Heidemmann.pdf> > Acesso em: 25 de abril de 2018.

CALL, H. P.; MUCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 163-202, 1997.

CARRARA, M. L. T. S.; SCHUTEL, S.; BOER, N. **Dermocosméticos a partir da flor da planta *Hedychium coronarium*: uma tecnologia ecológica e socialmente sustentável**. Resumo expandido, 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente. Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril, 2012.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 1-5, 2009.

CASTELLI, V. C.; MENDONÇA, C. C.; CAMPOS, M.; FERRARI, M.; MACHADO, S. R. P. Development and evaluation of the preliminary stability of O/W emulsion containing ketoconazole 2.0%. **Acta Science. Health Science**, v. 30, n. 2, p. 121-128, 2008.

CAVALLAZZI, J. R. P.; KASUYA, C. M.; SOARES, M. A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 383-387, 2005

CERQUEIRA, A. C.; et al. Comportamento do consumidor de cosméticos: um estudo exploratório. **Revista Formadores: Vivências e Estudos**, Cachoeira-BA, v. 6, n. 1, p. 128-157, nov. 2013.

CGEE-Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Sub-rede de Dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da: castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba, 209p, 2007.

CHHABRA, V.; FREE, M. L.; KANG, P. K.; TRUESDAIL, S. E.; SHAH, D. O. Microemulsions as an Emerging Technology. **Tenside, surfactants, detergentes**, v. 34, n. 3, 1997.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: Conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 88, p. 113-118, 2007a.

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRANCO, Y. O. Toxicologia dos cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 144-54, 2007b.

CRESPO, J. M. R. S. Aplicação do extrato da *Allamanda catártica* L., no desenvolvimento de formulação fitocosmética, para antisepsia das mãos de manipuladores de alimentos. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 65f, 2012.

DAHER, C. C.; FONTES, I. S.; RODRIGUES, R. O.; DAMASCENO, G. A. B.; SOARES, D. S.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B.; FERRARI, M. Development of O/W emulsions containing *Euterpe oleracea* extract and evaluation of photoprotective efficacy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 639–652. 2014.

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

DENGO, B. L.; FERREIRA, J. R. N. Avaliação in vitro do potencial fotoprotetor do extrato do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Evidência**, Joaçaba v. 17, n. 1, p. 45-56, jan./jun. 2017

DEUS, T. N. Extração e Caracterização de Óleo do Pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) para o uso Sustentável em Formulações Cosméticas Óleo/Água (O/A). **Dissertação** (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável). Universidade Católica de Goiás, Goiânia-GO, 77f., 2008.

DIFFEY, B. L. Indices of protection from in vitro assay of sunscreens. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker. p. 589-600. 1997.

DOLAN, S. P.; CAPAR, S. G. Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 593-615. 2002.

DONG, J. L.; ZHANG, Y. W.; ZHANG, R. H.; HUANG, W. Z. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 190-198, 2005.

DUAN, H.; FENG, B.; GUO, X.; WANG, J; ZHAO, G; LIU, W.; CAO, Y; ZHANG, W. J. Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/polycaprolactone membranes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2077. 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema B-Caroteno/Ácido Linoléico e

Método de Sequestro De Radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ELIAS, P. M. Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 9, p. 2131-2133, 2012.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 5. ed. Springer: Berlin, 2004.

FARIA, A. B.; PERES, D. D.; VLADI, T. M. K.; CONSIGLIERI, O.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para a higiene capilar contendo tensoativos “não-sulfatados”. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 521 – 527. 2012.

FERRARI, M. Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 147f., 1998.

FONSECA JÚNIOR, E. Q. da. Obtenção de lacase por fermentação submersa de resíduos de folhas de *Aniba canelilla* utilizando *Aspergillus brasiliensis*. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Engenharia Química), UEA-EST, 48p. 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Laws & Regulations**, 2012. Disponível em: www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/LawsRegulations/ucm074201.htm. Acessado em: 06 de abril de 2017.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. **Cosméticos: a química da beleza**. Sala de Leitura, 38 p., 2009.

GARG, S. K.; MODI, D. R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 85-112, 1999.

GASPARRI, S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. **Dissertação** (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 78f., 2005.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 463-470, 2004.

GOMES, A. D.; LIMA, R. A. Identificação de classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos de *Solanum acanthodes* hook e seu potencial fungicida sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM**, Santa Maria Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental (REGET), v. 18, n. 2, p. 736-744, mai-ago 2014.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A; GOMES, E. R. S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3. ed. New York: **Oxford Science Publications**, 936p., 2000.

HENRIQUE, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: generalidades e aspectos básicos**. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis., p. 641-642, 2000.

HESS, J.; LEITNER, C.; HESS, C.; KULBE, K. D.; HINTERSTOISSER, B.; STEINWENDER, M. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, p. 229-241, 2002.

HURTADO, T. L. T.; HUERTAS, C. E. M. Aplicación de la microscopía electrónica de barrido en la evaluación de materias primas cosméticas como restauradoras de La cutícula capilar. **Revista Colombiana de Ciência Química Farmacêutica**, v. 39, n. 1, p. 5-20, 2010.

IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. New Analytical Techniques in food science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 41, p. 413-450, 2001.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2004.

INÁCIO, M. R. C.; LIMA, K. M. de; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D.; TEIXEIRA, G. H. de A. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1160-1164, 2013.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

IYER, G.; CHATTOO, B. B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 1, p. 121-126, 2003.

JEZINI, V. S. Uso do Planejamento Estatístico Experimental Aplicado ao Desenvolvimento de Xampu Anticaspa com Extratos de Alecrim e Arnica. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Engenharia Química), UEA-EST, 2013.

KAHRAMAN, S. S.; GURDAL, I. H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 215-217, 2002.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Os flavonóides da polpa de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) e seus antioxidantes e atividades anti-inflamatórias. **Food Chemistry**. v. 128, 152 – 157, 2011.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. Histologia e biologia celular. **Elsevier Brasil**. 2012.

KOHLER, R. C. O. A química da estética capilar como temática no ensino de química e na capacitação dos profissionais de beleza. **Dissertação** (Mestrado em Educação em Ciências).

Centro de Ciências Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. Rio Grande do Sul. 112f., 2011.

KORTING, H. C.; HUBNER, K.; GREINER, K.; HAMM, G. BRAUN-FALCO, O. Differences in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparations of pH 5,5 and pH 7,0. **Acta Dermato Venereologica**. v. 14, p. 101-104, 1990.

KUBICEK, C. P. **Fungi and Lignocellulosic Biomass Fungi and Lignocellulosic Biomass**. 2013, 290 p.

KUMAR, A.; LI, S.; CHENG, C. M.; LEE, D. Recent Developments in Phase Inversion Emulsification. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2015.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciências Rural**, v. 36, p. 1283-1287, 2006.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 145-151, 2009.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, p. 969-978, 1988.

LATREILLE, B.; PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1666-1668, 1990.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: RR Donnelly, 2014.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 3-4, p. 185-227, 2001.

LIMA, A. B.; SANTANA, M. B.; CARDOSO, A. S.; SILVA, J. K.; MAIA, J. G. S.; CARVALHO, C. T.; SOUSA, P. J. C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine**, v. 16, p. 555-559. 2009.

LIMA, E. G.; SILVA, D. A. **Resíduos gerados em indústrias de móveis de madeira situadas no pólo moveleiro de Arapongas-PR**. Floresta, Curitiba, PR, v. 35, n. 1, 2005.

LOMASCOLO, A.; CAYOL, J-L.; ROCHE, M.; GUO, L.; ROBERT, J-L.; RECORD, E.; LESAGE-MEESSEN, L.; OLLIVIER, B.; SIGOILLOT, J-C.; ASTHERR, M. Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monocaryotic strains for laccase hyperproduction. **Mycology Research**, v. 106, n. 10, p. 1193 -1203, 2002.

MACIEL, G. M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. **Dissertação** (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 146f., 2006.

MACIEL, O. M. C.; TAVARES, R. S. N.; CALUZ, D. R. E.; GASPAR, L. R.; DEBONSI, H. M. Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylon stygium*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 178, p. 316–322, 2018.

MAINARDI, P. H. Produção de lacases pelo fungo filamentososo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada. **Dissertação** (Mestrado). Instituto de Biociências, Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro/SP. 68f. 2015.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. V. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULEY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, p. 167-172, 1986.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MÁXIMO, N. V. M.; FISCHBORN, A. C.; DUVOISIN JÚNIOR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. Produção de lacase fúngica em meio sólido utilizando resíduos florestais como substrato. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 701-708, 2015.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MAZIERO, R. Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica). Instituto de Biociências USP, Universidade de São Paulo, São Paulo. 136f., 1990.

MELO, C. T.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L.; LIMA, V. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, F. M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, B. G. S.; SOUSA, F. C. Anxiolytic-like effects of (o-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 451-454. 2006.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. **Estudos tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MERCANTE, R.; CIELO, I. D.; ILVA, F.; RODRIGUE, K. F.; FRANZ, A. C.; HAHN, P.; BUENO, R. K. Sabonetes líquidos: Fabricando sabonetes líquidos. **Projeto Gerar**. Vol: VIII. 22p. 2009.

MICHAEL-JUBELI, R.; BLETON, J.; BAILLET-GUFFROY, A. High-temperature gas chromatography–mass spectrometry for skin surface lipids profiling. **Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 1, p. 143–151, 2011.

MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A.; CORTE, T. W. F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 649-657, 2007.

MILIAUSKAS, G.; VAN BEEK, T. A.; VENSKUTONIS, P. R.; LINSEN, J. P. H.; WAARD, P. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 253-261. 2004.

MINAMI, P. S. Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses. Barueri: **Manole**, 199p., 2003.

MORAES, I. P.; CANUTO, R. F. C. A importância da estabilidade em produtos cosméticos. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, 2011.

MOTTA, E. F. O. **Dossiê Técnico: Fabricação de produtos de higiene pessoal**. Rio de Janeiro: Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2007.

MYERS, D. Surfactant Science and Technology. **VCH Publishers Inc**, New York, USA, 1988.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, v. 25, p. 11–17, 2004.

NIKU-PAAVOLA, M. L.; KARHUNEN, E.; KANTELINEN, A.; VIIKARI, L.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2-3, p. 211-221, 1990.

NOGUEIRA, A. C. S. Efeito da radiação ultravioleta na cor, na perda proteica e nas propriedades mecânicas do cabelo. **Dissertação** (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 59f., 2003.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920-924, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, (Pt 2), p. 135-152, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000b.

PATRAVALE, V. B.; MANDAWGADE, S. D. Novel cosmetic delivery systems: an application update. **International journal of cosmetic science**, v. 30, n. 1, p. 19-33, 2008.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 17 abr. 2018.

PEREIRA JR, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A **Biotecnologia Microbiana: Conceitos e Aplicações**. Séries em biotecnologia: Tecnologia de bioprocessos. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, v. 1, p. 8-10., 1. ed., 2008.

PERIASAMY, R.; PALVANNAN, T. Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 548-556, 2010.

PIETRO, R. C. L. R.; SALVAGNINI, L. E.; MIGLIATO, K. F.; RANGEL, V. L. B. I.; CORREA, M. A.; MARONA, H. R. N. Efficacy evaluation of preservatives associated to *Achillea millefolium* extract against *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 75-77, 2006.

POINTING, S. B.; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 317-318, 2000.

PORTINHO, J. A.; et al. Efeitos benéficos do Açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 2012.

POZDNYAKOVA, N. N.; TURKOVSKAYA, O. V.; YUDINA, E. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, Y. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: Purification and characterization. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 56-61, 2006.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.

RAMPINELLI, J. R. Utilização de casca de banana para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* ccb 019. **Tese** (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 132f., 2016.

REUBER, S.; BORNMAN, J. F.; WEISSENBOCK, G. A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. **Plant Cell Environ.** v. 19, p. 593-601. 1996.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas e Sustentáveis**. Manaus: SEBRAE. 2000.

RIDE, J. P. The effects of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. **Physiological Plant Pathology**, v. 16, p. 187-196. 1980.

RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. **Dissertação** (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 107f., 2006.

RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**, Casa do Pão: Campinas, 326p., 2005.

RODRIGUES, L. M. Desenvolvimento e estudo de estabilidade preliminar de emulsões óleo/água (o/a) a base de óleos vegetais para prevenção e/ou adjuvante no tratamento de úlceras por pressão. **Monografia** (Farmácia). Universidade de Brasília-UNB, faculdade de Ceilândia, DF, 2013.

RODRIGUES, R. M. Cosméticos verdes: uma tendência mundial. **Revista Racine**, v. 65, p. 2830, 2001.

ROSAS, J. **Curso de Biología Molecular y Celular. Enzimas: Aceleradores de Iões Reacciones Químicas de los Seres Vivos**. 2003. Disponível em: <<http://interbiologia.virtualave.net/molecula/enzimas.html>> Acessada em: 20/03/2018.

ROSEN, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 2. ed. New York: **John Wiley & Sons**, 1989.

RYAN, K. G.; SWINNY, E. E.; MARKHAM, K. R.; WINEFIELD, C. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia leaves*. **Phytochemistry**. v. 59, p. 23–32, 2002.

SALES-CAMPOS, C. Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na Região Amazônica. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 182 pp. 2008.

SALES-CAMPOS, C. Bioeconomia um nicho inexplorado: Pesquisas do INPA sinalizam potencial econômico para os derivados dos cogumelos nos segmentos medicinais e alimentar, uma opção a ser agregada ao modemo ZFM. Entrevista, **Revista Pim** v. 41, p. 2934. Ed. Balponte, Manaus-AM, 2013.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. N. de. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazônica**. v. 41, n. 1, p. 1-8, 2011.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N de. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 539-543, jul./set., 2010.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1321–1337, 2010.

SANTANA, J. L.; PEÑA, M.; MARTINEZ, F.; GÓMEZ, A.; CORDONÍO, E.; GARCIA, O.; GARCIA, G.; VARGAS, L. M.; GARCIA, M.; GARCIA, C. **Evaluación de la actividad antimicrobiana, fotoprotectora, antielastasa y antioxidante de polifenóis de origen natural, empleados en formulaciones cosméticas**. XV Congr. Lat. Ameri. e Ibér. de Quím. Cosmét. Buenos Aires, Argentina. 2001

SANTANA, T. T.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.018>

SANTOS, Y. V. S. dos; CAVALLAZZI, J. R. P. A new sustainable approach for laccase production and bioremediation. **IIOABJ**. v.8, n.1, p.11-14. 2017.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8598–8603, 2006.

SCHNEIDER, W. D. H.; FONTANA, R. C.; MENDONÇA, S.; DE SIQUEIRA, F. G.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 1–11, 2018. doi:10.1016/j.procbio.2018.03.005

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cosméticos à base de produtos naturais**. Relatório de estudo de mercado. Brasília: ESPM, 2008.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. 2. ed. Florida: CRC Press, 576p. 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, J. J. da; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H. de; SOUZA, S. G. H. de; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 191-196, jul./dez. 2012.

SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9422-9426, 2007.

SILVA, P. H. S.; COELHO, R. Z.; SILVA, G. F.; CASTILHO, R. B.; ALBUQUERQUE, P. M. **Análise do fator de proteção solar em extratos glicólicos e óleos fixos de plantas da Amazônia**. Xi Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 2015.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2606, 1996.

SOUZA, C. G. M.; TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, D. F. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 129-136, 2004.

SOUZA, F. L. C. Desenvolvimento de bases emulsionadas de silicone e água e avaliação comparativa com bases emulsionadas de óleo e água para uso externo de uso mais comum em manipulação. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 198f., 2007.

SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K.F. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v. 380, p. 155-164, 1999.

STAMATAS, G. N.; NIKOLOVSKI, J.; MACK, M. C.; KOLLIAS, N. Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on in vivo studies. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 1, p. 17-24. 2011.

STOBIECKI, M.; MATYSIAK-KATA, I.; FRANSKI, R.; SKALA, J.; SZOPA, J. Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of

transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 62, n. 1, p. 959-969, 2003.

TEIXEIRA, M. S. M. Avaliação da atividade fotoprotetora de formulação cosmética contendo a associação entre fração em clorofórmio de *Garcinia cambogia* desr. (clusiaceae) e filtro sintético de amplo espectro. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Farmácia). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG. 2016.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

TLECUITL-BERISTAIN, S.; SÁNCHEZ, C.; LOERA, O.; ROBSON, G.D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. **Mycological Research**, v. 112, n. 9, p. 1080-1084, 2008.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**. v. 43, n. 3, p. 907-914, 2010.

TRINDADE, S. L. da; NUNES, P. de O.; FERNANDES, K. das G. Avaliação da distribuição de cobre associado a compostos de diferentes massas moleculares na polpa de açai. **Acta Amazônica**, v. 42, n. 2, p. 287-292, 2012.

UNIOESTE. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. **Sabonetes líquidos: fabricando sabonetes líquidos**. 2009. Projeto Gerart. Volume VIII. Disponível em: <<<http://projetos.unioeste.br/projetos/gerart/apostilas/apostila8.pdf>>> Acesso em: 15/03/2018.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, n. 2-3, p. 99-104, 2001.

VARELA, A. E. M. Um estudo sobre os princípios ativos dos produtos para alisamento e relaxamento de cabelos oferecidos atualmente no mercado brasileiro. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Tecnologia em Cosmetologia e Estética). Universidade do Vale do Itajaí. Balneário Camboriú. Santa Catarina. 2007.

VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N.K. Optimal conditions of in vitro mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. **Mycoscience**, v. 49, n. 3, p. 215-219, 2008.

VELÁZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 201-207, 2002.

VIEIRA F. R. Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 115 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 115f., 2012.

WAGNER, R. C. C. A estrutura da medula e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo. **Tese** (Doutorado em Química). Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. São Paulo. 2006.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WOICIECHOWSKI, A. L. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido. **Tese** (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. 2005.

WOLFRAM, L. J. Hair cosmetics. In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. (Eds.). Handbook of Cosmetic. **Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 2. ed., cap. 51, p. 581-603, 2001.

YAMAGUCHI, K. K. L.; SANTARÉM, L. S.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Avaliação in vitro da Atividade Fotoprotetora de Resíduos de Frutas Amazônicas. **Scientia Amazonia**, v. 5, n.1, 109-116, 2016.

YANG, J.; LIN, H.; MAU, J. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 229-235, 2002.

YANNAS, I. V. Regeneration of Skin. In: Tissue and Organ Regeneration in Adults. **Springer New York**, p. 89-136, 2015.

YAROLOPOV, A. I.; SKOROBOGATKO, O. V.; VARTANOV, S. S.; VARFOLOMEYEV, S. D. Laccase properties, catalytic mechanism and applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 49, n. 3, p. 257-280, 1994.

YILMAZ, N.; SOLMAZ, M.; TÜRKEKUL, I.; ELMASTAS, M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. **Food Chemistry**, v. 99, p. 168-174, 2006.

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres**. O programa de saúde dos antioxidantes. Rio de Janeiro: Campus, 151p. 1995.

ZADRAZIL, F.; PUNIA, A. K. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 85-87, 1995.

ZHANG, K-M.; YU, H-J.; SHI, K.; ZHOU, Y-H.; YU, J-Q.; XIA -J. Photoprotective roles of anthocyanins in *Bergonia semperflorens*. **Plant Sci**. v. 179, p. 202-208, 2010.