

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Carine Cassimiro Cedrola

Potencial de aplicação do biossurfactante produzido pela levedura
***Scheffersomyces shehatae* em cosméticos**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Pinto Vilela

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís Nogueira Barradas

Juiz de Fora

2023

Carine Cassimiro Cedrola

**Potencial de aplicação do biossurfactante produzido pela levedura
Scheffersomyces shehatae em cosméticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Áreas de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Pinto Vilela

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís Nogueira Barradas

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cassimiro Cedrola, Carine.

Potencial de aplicação do biossurfactante produzido pela levedura *Scheffersomyces shehatae* em cosméticos / Carine Cassimiro Cedrola. -- 2023.

58 p.

Orientadora: Fernanda Maria Pinto Vilela

Coorientadora: Thaís Nogueira Barradas

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. *Scheffersomyces shehatae*. 2. biossurfactante. 3. cosméticos. I. Maria Pinto Vilela, Fernanda, orient. II. Nogueira Barradas, Thaís, coorient. III. Título.

Carine Cassimiro Cedrola

Potencial de aplicação do biossurfactante produzido pela levedura *Scheffersomyces shehatae* em cosméticos

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestra em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de concentração:
Produtos Naturais e
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 07 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Thaís Nogueira Barradas - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Sônia Aparecida Figueiredo

Juiz de Fora, 07/11/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 07/12/2023, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sonia Aparecida Figueiredo, Usuário Externo**, em 07/12/2023, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Claudia Chagas de Paula Advocat, Professor(a)**, em 07/12/2023, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais Nogueira Barradas, Professor(a)**, em 07/12/2023, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1564595** e o código CRC **AEF60ADF**.

RESUMO

A maioria dos produtos cosméticos destinados à limpeza da pele apresentam os surfactantes como importante componente de sua formulação, principalmente como emulsificantes e agentes espumantes. Porém, o uso de surfactantes sintéticos pode causar problemas de toxicidade aos usuários, além de danos ambientais associados à sua produção e descarte. Os biossurfactantes são surfactantes de origem natural e comparados aos surfactantes sintéticos são mais biodegradáveis e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade. Assim, tendo em vista a necessidade da indústria cosmética em desenvolver produtos com princípios ativos naturais e renováveis para substituir ou reduzir o uso de surfactantes sintéticos, este trabalho teve como objetivo investigar a adequação de um biossurfactante produzido pela levedura *Scheffersomyces shehatae* para ser utilizado em formulações cosméticas. A avaliação da citotoxicidade do biossurfactante foi realizada através do teste MTT em linhagens celulares de fibroblastos murinos L929 e queratinócitos humanos HaCaT. O potencial de irritação ocular foi avaliado pelo teste da membrana corioalantóica do ovo de galinha (HET-CAM). A avaliação da eficiência de limpeza do biossurfactante foi medida como a capacidade de remoção de maquiagem em peles de orelhas de porco em comparação com água, solução SDS a 1% e uma formulação comercial de água micelar. Os resultados mostraram que a concentração que afeta a viabilidade de 50% das células testadas (IC50) foi de 10,49 mg/mL para L929 e 11,77 mg/mL para linhagem HaCaT, valores superiores a outros valores descritos na literatura para biossurfactantes testados em culturas de células da pele. A exposição da membrana corioalantóica ao biossurfactante produzido por *S. shehatae* (60 mg/mL) não resultou em hemorragia, lise e danos de coagulação, o que classifica a solução de biossurfactante como não irritante. Por fim, a eficácia do biossurfactante em atuar como removedor de maquiagem foi comparável à atividade de limpeza da solução SDS a 1%, surfactante amplamente utilizado em formulações de limpeza de pele e cabelos pela indústria cosmética. Concluindo, os resultados indicam seu potencial uso em aplicações cosméticas.

Palavras-chave: *Scheffersomyces shehatae*, biossurfactante, cosméticos.

ABSTRACT

Most cosmetic products intended for skin cleansing feature surfactants as an important component of their formulation, mainly as emulsifiers and foaming agents. However, the use of synthetic surfactants can cause toxicity problems for users, in addition to environmental damage associated with their production and disposal. Biosurfactants are surfactants of natural origin and compared to synthetic surfactants they are more biodegradable and have low or no toxicity. Thus, in view of the cosmetic industry's need to develop products with more natural and renewable active ingredients to replace or reduce the use of synthetic surfactants, this work aimed to investigate the suitability of a biosurfactant produced by the yeast *Scheffersomyces shehatae* to be used in cosmetic applications. The evaluation of the cytotoxicity of the biosurfactant was performed using the MTT test in fibroblast cell lines L929 and keratinocytes HaCaT. The potential for ocular irritation was assessed by the hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM). The evaluation of the cleaning efficiency of the biosurfactant was measured as the removal ability of make-up in pig ear skins in comparison with water, 1% SDS solution, and a commercial formulation of micellar water. The results showed that the concentration that affects the viability of 50% of the tested cells (IC₅₀) was 10.49 mg/mL for L929 and 11.77 mg/mL for HaCaT, which is higher compared to other values described in the literature for biosurfactants tested in skin cell cultures. Exposure of the chorioallantoic membrane to the biosurfactant produced by *S. shehatae* (60 mg/mL) did not result in hemorrhage, lysis and coagulation damages, which classifies the biosurfactant solution as non-irritant. Finally, the efficacy of the biosurfactant to act as a makeup remover was comparable to the cleansing activity of 1% SDS solution, a surfactant widely used in skin and hair cleansing formulations by the cosmetic industry. In conclusion, the results indicate its potential use in cosmetic applications.

Keywords: *Scheffersomyces shehatae*, biosurfactants, cosmetics.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus.

À Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela, por todos esses anos de dedicação, paciência, ensinamentos e por nunca medir esforços para a realização de cada etapa deste trabalho.

À Profa. Dra. Thaís Nogueira Barradas, por todo apoio, ajuda e ensinamentos.

À minha família que sempre me apoiaram em cada obstáculo.

À CAPES pelo fomento que possibilitou a pesquisa.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de formação da micela	10
Figura 2: Representação esquemática dos surfactantes	11
Figura 3: Principais áreas de aplicação dos biossurfactantes	15
Figura 4: Definições de Ingredientes Naturais segundo referenciais internacionais	22
Figura 5: Requisitos por categoria de produtos a serem cumpridos para certificação	24
Figura 6: Interação dos surfactantes com a pele	28
Figura 7: Viabilidade celular da linhagem de (A) fibroblastos (L929) e (B) queratinócitos (HaCaT) após 24 horas de tratamento com o BS-SS em diferentes concentrações.	35
Figura 8: Fotos de HET-CAM na presença de soluções de NaCl 0,9%, BS-SS, SDS 1% e NaOH (0,1M).....	38
Figura 9: Análise visual (A) e quantitativa (B) da eficiência de limpeza de solução SDS a 1%, solução BS-SS (60 mg/mL), água micelar comercial e água na remoção do lápis de olho, base e batom da pele	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos biossurfactantes e os principais microrganismos produtores	14
Tabela 2: Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes	16
Tabela 3: Lista de produtos grau 1 e grau 2.....	19
Tabela 4: Esquema de pontuação para teste de irritação com membrana corioalantóide de ovo de galinha.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BS	Biossurfactante
BS-SS	Biossurfactante produzido pela levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i>
CAM	Membrana corioalantóide
CMC	Concentração micelar crítica
COSMOS	<i>Cosmetic Organic Standard</i>
DEMEN	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HHBCA	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2yl) -2,5-difeniltetrazolium
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 SURFACTANTES	10
2.2 BIOSSURFACTANTES	13
2.2.1 Biossurfactante produzido pela levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i>	16
2.2.2 Aplicação dos biossurfactantes em produtos cosméticos	18
2.3 COSMÉTICOS	19
2.3.1 Cosméticos naturais	22
2.4 PELE HUMANA	25
2.4.1 Microbiota da pele humana	26
2.5 ÁGUA MICELAR	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 OBTENÇÃO DO BIOSSURFACTANTE	30
4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO BIOSSURFACTANTE	30
4.2.1 Cultura de células	30
4.2.2 Ensaio de viabilidade celular	31
4.3 TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR NA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DO OVO DE GALINHA (HET-CAM)	31
4.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE LIMPEZA	33
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	33
6.2 HET-CAM	36
6.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE LIMPEZA	39
7 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético (ABIHPEC), o Brasil é o quarto maior mercado consumidor do mundo de produtos cosméticos, o segundo maior mercado em fragrâncias, produtos masculinos e desodorantes e o segundo mercado no ranking global de países que mais lançam produtos anualmente. Esses dados mostram a relevância do setor para a economia do país. Só no ano de 2022, houve um aumento de 4,8% na geração de empregos, equivalente a 256,2 mil oportunidades de trabalho (ABIHPEC, 2023).

Em contrapartida ao alavancado crescimento do mercado de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético, o consumidor está cada vez mais engajado na busca por produtos de origem natural e orgânica, que não sejam testados em animais, e possuam um processo de produção sustentável. Por isso, muitas empresas estão empenhadas em atender essa demanda, com produtos naturais, orgânicos e livres de testagem animal (CARRULO, 2020; FLOR; MAZIM; FERREIRA, 2019).

Grande parcela da população utiliza diariamente produtos de higiene pessoal como sabonetes, xampus e condicionadores, maquiagem, pasta de dente, água micelar, entre outros (BEZERRA et al., 2018).

A água micelar desponta no mercado como um dos produtos favoritos à limpeza diária da pele e remoção de maquiagem. Isso ocorre, principalmente por ela promover a limpeza sem agredir a pele, uma vez que, além de serem utilizados surfactantes suaves, outros componentes podem ser incluídos para minimizar possíveis reações adversas causadas por alguns surfactantes como desidratação, vermelhidão, irritação e coceira, decorrentes da solubilização de componentes da barreira de proteção da pele (CARLI, 2015; CASTRO, 2019; MUNHOZ; ROCHA, 2021; WALTERS et al., 2012).

Grande parte dos produtos cosméticos, destinados à limpeza da pele, possuem como importante componente de sua formulação os surfactantes sintéticos com diferentes objetivos, que vão desde detergência, emulsificação, capacidade espumante, molhabilidade até a solubilização. Os surfactantes são substâncias anfipáticas que reduzem a tensão superficial/interfacial e aumentam a solubilidade de compostos imiscíveis em água, além de promoverem a

estabilidade de emulsões. Isso devido a suas propriedades tensoativas e/ou emulsificantes (FELIPE; DIAS, 2017; SANTOS, 2016).

Todavia, o uso de surfactantes sintéticos pode causar problemas de toxicidade nos usuários, como pele seca, dermatite de contato e alergias, os quais podem ser decorrentes de danos na barreira epidérmica, comprometimento dos queratinócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação do sistema imunológico da pele e reações de hipersensibilidade do tipo retardado (KLIMASZEWSKA et al., 2022; FERNANDES, SIMÕES, DIAS, 2023).

Ademais, danos ambientais também são associados à produção e ao descarte de produtos adicionados de surfactantes sintéticos. Existem muitos relatos onde a presença desses surfactantes sintéticos, que geralmente são de difícil biodegradação, perturbam o ecossistema aquático de rios e mares ao diminuir a taxa de evaporação, aumentar a solubilidade de compostos orgânicos, além de o excesso de espuma sobre a superfície da água prejudicar a penetração dos raios solares, reduzindo a solubilidade do oxigênio e ocasionando a morte de peixes, plantas aquáticas e microrganismos (BARBOSA, 2021; JENA, DUTTA, DAVEREY, 2023).

Diante desse cenário, há a necessidade de encontrar alternativas que sejam sustentáveis. Embora a grande maioria dos surfactantes comercializados sejam obtidos a partir de derivados do petróleo, existe um crescente interesse em novos surfactantes naturais (BIONE, 2019).

Os biosurfactantes (BS) possuem propriedades tensoativas e/ou emulsificantes, e em comparação aos surfactantes sintéticos são mais biodegradáveis, possuem baixa ou nenhuma toxicidade e podem ser obtidos por meio de processos metabólicos microbianos a partir de fontes renováveis como compostos oleaginosos e subprodutos agroindustriais (BARBOSA, 2021; MARTINS et al., 2021).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo desenvolver uma formulação de água micelar com biosurfactante produzido pela levedura *Scheffersomyces shehatae* (BS-SS) visando proporcionar uma alternativa para o mercado de um produto que seja eficaz, não tóxico e sustentável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

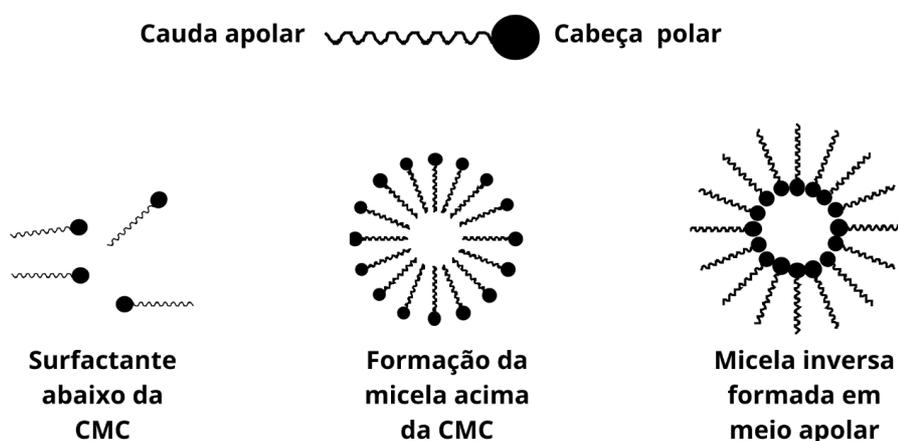
2.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são agentes tensoativos, de natureza anfifílica, capazes de reduzir a tensão superficial entre duas fases imiscíveis. A diminuição da tensão superficial ocorre devido à formação de micelas na interface a partir do momento em que se ultrapassa o limite de solubilidade do tensoativo no líquido. Esses possuem em sua estrutura grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Geralmente, a estrutura se resume em uma porção polar ou de sítio iônico, denominada cabeça, e uma porção apolar, ou cauda (DALTIM, 2011; FELIPE; DIAS, 2017; RIBEIRO, 2018).

Para entender as características dos surfactantes é importante entender o conceito de micela. As micelas são um agregado de moléculas tensoativas que, de maneira dinâmica, associam-se espontaneamente em solução aquosa a partir de uma concentração específica, denominada de concentração micelar crítica (CMC), a concentração mínima necessária para iniciar a formação das micelas. A CMC é intrínseca a cada surfactante e é capaz de prever a eficiência desse. Quanto menor a CMC, significa que menor quantidade de surfactante é necessária para saturar interfaces e formar os agregados (MOREIRA; LYON, 2022).

Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de unímeros. Em meio polar, como a água, quando o tensoativo atinge a CMC as moléculas se agregam e ocorre a formação das micelas (Figura 1). Em meio apolar, as micelas formadas são denominadas de micelas inversas, nas quais os grupos hidrofóbicos ficam voltados para fora das micelas (REIS, 2007).

Figura 1 - Esquema de formação da micela.



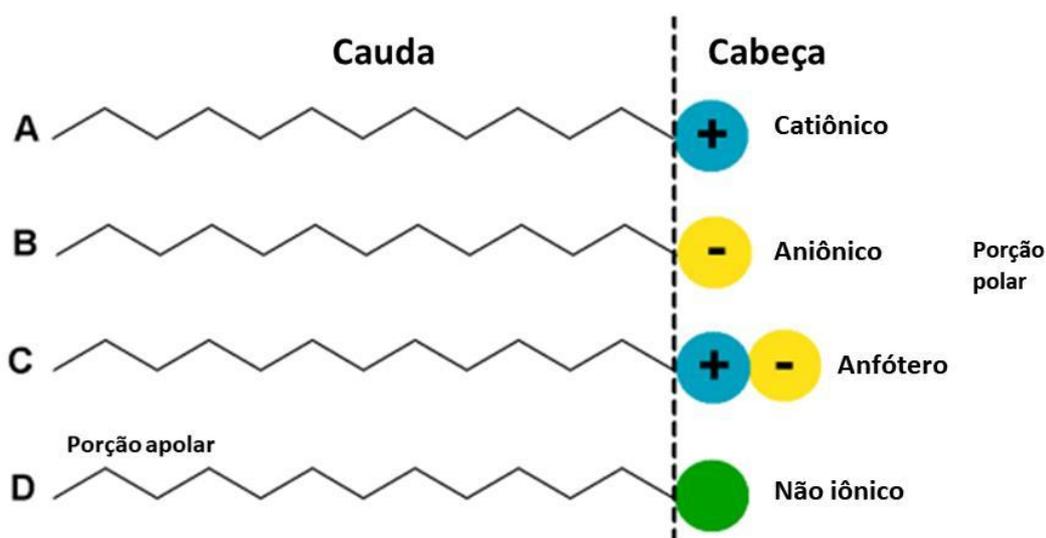
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As micelas podem apresentar diferentes formas dependendo da estrutura molecular do surfactante e das condições do meio em que ele se encontra. São esses agregados que possibilitam a emulsificação, solubilização e dispersão de vários compostos insolúveis em água (TEOTIA; SAMI; KUMAR, 2015).

O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentrações, podendo ser detectado pela variação brusca produzida em determinadas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do tensoativo, como a tensão superficial, pressão osmótica e condutividade elétrica (só para tensoativos iônicos), entre outras (MANIASSO, 2001).

Os surfactantes são classificados, de acordo com o grupo presente na cabeça, em iônicos (cátions e ânions), não iônicos e anfóteros (Figura 2) (FELIPE; DIAS, 2017).

Figura 2 - Representação esquemática dos surfactantes.



Fonte: Adaptado de FELIPE; DIAS, 2017.

Os tensoativos aniônicos apresentam carga negativa na região polar, decorrente da dissociação de um sal em água, podendo ser um grupo carboxilato (CO_2^-), sulfonato (SO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}) ou fosfato (HPO_4). Esses constituem a maior classe de tensoativos. São encontrados em sabões, detergentes, sabonetes e xampus. A presença de carga na parte polar dos tensoativos faz com que sejam muito solúveis em água, não importando se as cargas são negativas ou positivas. São comumente encontrados em formulações cosméticas tensoativos aniônicos que apresentam sulfato na estrutura, como o

dodecil sulfato de sódio (SDS), amplamente empregado em formulações para limpeza (DALTIM, 2011; MANIASSO, 2001; MYRES, 2006).

Os tensoativos catiônicos possuem carga positiva na cabeça. São bastante utilizados como agentes condicionantes de cabelo, apresentam maior toxicidade em ambientes aquáticos quando comparados às outras classes de surfactantes e em comparação com os surfactantes aniônicos, são menos solúveis em água. Além disso, as características físico-químicas deles são extremamente sensíveis a presença de eletrólitos e mudança extrema de pH (KUME; GALLOTTI; NUNES, 2008; NASCIMENTO, 2018).

Os tensoativos anfotéricos apresentam tanto carga negativa quanto positiva, podendo comportar-se como aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH do meio em que se encontram. Em meio alcalino, a alta concentração de hidroxilas neutraliza a carga positiva, e esse se comporta como um tensoativo aniônico. Em meio ácido comportam-se como tensoativos catiônicos. Normalmente, são compatíveis com todas as classes de tensoativos, entretanto são menos utilizados devido ao seu alto custo. Os tensoativos anfotéricos são muito utilizados em produtos que necessitam de uma baixa irritabilidade ocular como xampus infantis (MYRES, 2006; BERA; MANDAL, 2015).

Os tensoativos não iônicos não apresentam cargas verdadeiras em sua porção polar e são a segunda classe mais utilizada. Em geral, são compatíveis com todas as classes de tensoativos. Sua solubilidade decresce com o aumento da temperatura, além de não serem fortemente influenciados pela presença de eletrólitos (DALTIM, 2011; MANIASSO, 2001).

Entre os surfactantes não-iônicos, destacam-se os tensoativos sintéticos oriundos de ésteres de polioxietileno sorbitano, conhecidos como *Tween* amplamente utilizados devido às suas boas propriedades emulsificantes, baixo custo e baixa toxicidade em comparação com outros tensoativos sintéticos. Destacam-se também o monoleato de sorbitano (Span 80) e o monoestearato de sorbitano (Span 60), surfactantes não- iônicos, utilizados em componentes lipídicos. (DINIZ, 2019; RIQUELME; ARANCIBIA, 2020).

Os surfactantes sintéticos são produzidos por sínteses químicas a partir de diferentes matérias-primas, principalmente derivadas do petróleo (FERREIRA et al., 2023). Apesar de possuírem boa propriedade detergente causam impacto negativo no meio ambiente devido sua difícil degradação e sua toxicidade. Por

isso, novas alternativas naturais e ecologicamente corretas são constantemente estudadas (FELIPE; DIAS, 2017).

2.2 BLOSSURFACTANTES

Os BS podem ser obtidos de fontes naturais como as saponinas nos vegetais, a bile nos animais ou a partir de microrganismos como subprodutos metabólicos produzidos por microrganismos. Bactérias, fungos filamentosos e leveduras, podem produzir BS a partir de diferentes substratos como fontes de carbono, carboidratos, hidrocarbonetos, gorduras e óleos. Devido ao fato de sua estrutura consistir em uma porção apolar e uma porção polar, isto é, ser um composto anfifílico, os BS são capazes de diminuir a tensão superficial, além de possuírem boa capacidade emulsificante (DA SILVA, 2020; FENIBO; DOUGLAS; STANLEY, 2019).

Diversas funções fisiológicas são atribuídas aos BS, por exemplo, emulsificação e solubilização de compostos insolúveis permitindo que os microrganismos cresçam em substratos insolúveis em água; transporte de hidrocarbonetos aumentando a biomassa (fonte de energia); aderência e liberação da célula a superfícies. Muitas vezes também apresentam atividade antimicrobiana, com a finalidade de sobressair em diferentes meios frente a outros microrganismos (BEZERRA et al., 2018; DA SILVA, 2020; FERREIRA et al., 2023).

A atividade antimicrobiana faz com que os BS tenham potencial para diversas aplicações médicas. Essa característica está relacionada ao organismo produtor e às condições de cultivo que levam à produção de diferentes tipos de BS. O principal mecanismo antimicrobiano atribuído à atividade dos BS é a interação com as membranas das células-alvo, afetando a integridade da membrana celular e prejudicando o ciclo de nutrição. Além disso, são capazes de inserir ácidos graxos nas bicamadas lipídicas, levando ao aumento da membrana celular modificando sua permeabilidade (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; OLIVEIRA et al., 2022).

Os BS podem ser classificados em função da composição química, origem microbiana e peso molecular. Podem ser glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios ou lipídios neutros e compostos poliméricos (Tabela 1) (FENIBO; DOUGLAS; STANLEY, 2019; OLIVEIRA et al., 2022;).

Tabela 1 – Classificação dos biossurfactantes e os principais microrganismos produtores.

Classe	Representantes	Microrganismo produtor	Peso molecular
Glicolípido	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidaea</i> SNAU02	Baixa massa molar
	Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Trichosporon asahii</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Trichoderma viridis</i> , <i>Fusarium sp. S33</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	
	Trealolipídios	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Gordonia amarae</i> , <i>Nocardia sp</i>	
	Lipídios de Manosileritritol (MEL)	<i>Candida antarctica</i> <i>Ustilagoscitaminea</i>	
Lipopeptídeos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus mojavensis</i>	
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>	
	Iturina, Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus mojavensis</i>	
Poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Alta massa molar
	Liposan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53	
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	

Fonte: BARBOSA, 2021; FENIBO; DOUGLAS; STANLEY, 2019; MARCELINO, 2016.

Os glicolipídios possuem em sua estrutura um carboidrato na parte hidrofílica, a qual pode ser composta por diferentes tipos de açúcares como a ramnose, nos ramnolipídios; a soforose, nos soforolipídios; manose e eritritol, nos lipídios manosileritritol; e a trealose nos trealolipídeos. A cadeia hidrofóbica é composta por um ácido graxo. A maioria dos glicolipídios são de origem bacteriana, mas existem alguns provenientes de fungos e leveduras (COLLA; COSTA, 2003; SANTOS et al., 2016; VARVARESOU; LAKOVOU, 2015).

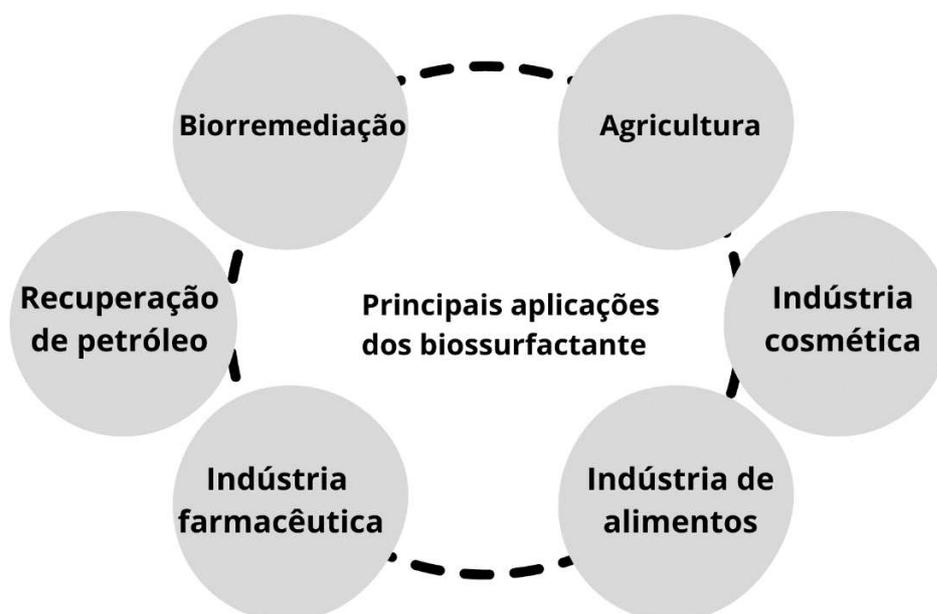
Os lipopeptídeos geralmente são formados por peptídeos cíclicos ligados a um ácido graxo. O BS mais estudado dessa classe é a surfactina, produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* (FENIBO; DOUGLAS; STANLEY, 2019; SANTOS et al., 2016). Os fosfolipídios são produzidos por leveduras e bactérias que utilizam alcanos como fonte de carbono e energia para o crescimento. Sua

estrutura é constituída por ácidos graxos ou lipídeos neutros e grupos fosfatos. Os BS poliméricos ou lipopolissacarídeos são caracterizados por ácidos graxos e um núcleo polissacarídeo ligados covalentemente (FELIPE; DIAS, 2017; SANTOS et al., 2016).

A gama de possíveis aplicações dos BS é consequência de suas diversificadas propriedades, como a grande tolerância à diferentes condições de temperatura, pH e força iônica; biodegradabilidade; baixa toxicidade; capacidade emulsificante e solubilizante. Além de o processo de síntese poder ser realizado a partir de fontes renováveis e subprodutos industriais, como gordura animal, óleos vegetais, bagaço de cana de açúcar, arroz, milho, farelo de soja, soro de leite, efluentes de petróleo, resíduos de óleo, entre outros (BARBOSA, 2021; NITSCHKE; PASTORE, 2002; OLIVEIRA et al., 2022).

Muitas são as aplicações para os BS (Figura 3). A aplicação mais explorada dos BS é a biorremediação de ambientes contaminados, envolvendo processos de biodegradação de pesticidas e compostos orgânicos, como o petróleo e seus derivados. Os BS aumentam a interação superficial A/O, aceleram a degradação de vários desses compostos por microrganismos, além disso ao emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água sua degradação no ambiente é aumentada (MARINHO; SILVA; LUNA, 2022; SANTOS, 2019).

Figura 3 - Principais áreas de aplicação dos biossurfactantes.



Fonte: Adaptado de FELIPE; DIAS, 2017.

Contudo, atualmente as aplicações permeiam entre os diferentes setores industriais (Tabela 2). Na indústria de alimentos, os BS podem ser utilizados como agentes emulsionantes para a formação de consistência e textura, como solubilizante de matérias-primas e até mesmo na emulsificação de gorduras (DA SILVA, 2020). Na agricultura, são utilizados em formulações herbicidas e pesticidas como agentes emulsionantes, além de serem usados no tratamento de solo contaminado com compostos orgânicos, acelerando o processo de degradação e dispersão (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SANTOS, 2019).

Tabela 2 - Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: NITSCHKE, PASTORE, 2002.

Na medicina, os BS podem apresentar atividade antimicrobiana e antibiofilme contra diferentes patógenos. Existem na literatura relatos do emprego de BS também como um agente anticâncer. Um dos BS mais amplamente estudados, a surfactina, é capaz de inibir a formação de coágulos, além de sua atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral. A potencial aplicação na indústria cosmética também é crescente, uma vez que diferentes produtos cosméticos utilizam surfactantes, seja para estabilizar emulsões, solubilizar matérias-primas ou compor produtos para limpeza da pele e cabelo (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; GUDIÑA et al., 2015).

2.2.1 Biossurfactante produzido pela levedura *Scheffersomyces shehatae*

Microrganismos produtores de BS podem ser isolados principalmente de solos, de ecossistema marinho e de ambientes contaminados por óleos (BARBOSA, 2021; BUENO, 2008).

É importante que o microrganismo produtor não apresente riscos de patogenicidade e toxicidade, ou seja, tenham *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*), sendo essa uma das principais vantagens para algumas espécies de leveduras apontadas como vantajosas para produção de BS. Além disso, as leveduras alcançam melhor rendimento na produção de diferentes BS frente a bactérias e apresentam estruturas celulares mais resistentes aos BS secretados no meio de cultivo do que as bactérias (BARBOSA, 2021; MARCELINO, 2016; MONTEIRO et. al.,2009).

O tipo, quantidade e composição dos BS produzidos pelos microrganismos serão influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons no meio de cultura, disponibilidade de oxigênio, temperatura e agitação (BARBOSA, 2021; BUENO, 2008).

A levedura *Scheffersomyces shehatae* possui como propriedade natural a capacidade de converter açúcares pentoses à etanol. Além de ter o status GRAS (ANTUNES, 2015).

O BS-SS é um bioemulsificante produzido a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (HHBCA) e óleo de soja por fermentação submersa. O HHBCA é obtido por hidrólise ácida, com ácido sulfúrico (H_2SO_4), sob aquecimento, pois esse método mostrou eficiência, com elevados rendimentos na liberação de açúcares pentoses fermentescíveis. Entretanto, durante a hidrólise também pode ocorrer a liberação de compostos tóxicos aos microrganismos como furfural, ácidos orgânicos (ácido fórmico e acético) e compostos fenólicos. Por isso, após a hidrólise, o HHBCA é concentrado e submetido ao processo de destoxificação química, combinando o ajuste de pH e a adsorção em carvão ativado, para a remoção desses compostos que podem inibir o crescimento microbiano e alterar o processo fermentativo (BARBOSA, 2021).

Para otimização nutricional do meio de cultivo utilizado para a produção do BS-SS é realizada a suplementação dos meios com extrato de farelo de soja. A fermentação é realizada em frascos *erlenmeyer* contendo 200 mL de meio de

cultivo e aproximadamente 0,1 mg/mL de células. Os cultivos são incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 30 °C, por 144 horas e, transcorrido o período de incubação, as fermentações são interrompidas e centrifugadas para a separação da biomassa celular e sobrenadante. A extração do BS-SS é realizada com etanol (BARBOSA, 2021).

O BS-SS obtido é composto por um complexo de carboidratos-proteínas-lipídios, sendo do tipo polimérico e aniônico, com a CMC de 60 mg/mL. Apresenta importante propriedade emulsificante frente a diversos compostos hidrofóbicos, além de permanecer estável e apresentar ação emulsificante em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade. Diante das características físico-químicas e boa estabilidade do BS-SS, este se destaca por seu potencial de aplicação na indústria farmacêutica e cosmética (BARBOSA, 2021).

2.2.2 Aplicação dos biossurfactantes em produtos cosméticos

Os BS representam uma alternativa vantajosa aos surfactantes sintéticos na indústria cosmética, especialmente para aquelas focadas em desenvolvimento de produtos sustentáveis e seguros. Podem ser usados para detergência, umectação, solubilização, emulsificação, dispersão e formação de espuma, solubilização de matérias-primas ou composição de produtos para limpeza da pele e cabelo. Ademais, os BS, em comparação aos surfactantes sintéticos, apresentam boa compatibilidade e baixa toxicidade cutânea, além de serem biodegradáveis (THAIPHANIT; ANPRUNG, 2016; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; VECINO et al., 2017).

Nas últimas décadas são crescentes as pesquisas em torno dos BS em formulações cosméticas. A classe dos glicolipídios compreende o grupo mais popular e promissor dos BS. Os raminolipídeos possuem propriedades emolientes, emulsionantes e condicionadoras da pele, podendo ser aplicados para produtos anti-idade, xampus para limpeza e tratamento da caspa, limpeza suave da pele e produtos de higiene corporal. Os sofrorlipídios podem ter aplicações antimicrobianas, emulsificantes, desodorante, anti-seborreica, antioxidante, hidratante e protetora da pele, em formulações para higiene da pele e cabelos (SHOEB et al., 2013). Os lipídios de manosileritritol podem ser aplicados para efeito antioxidante, para cuidados com a pele e cabelo, além de

formulações anti-idade, maquiagens e como agentes antimicrobianos (BHATTACHARYA et al., 2017).

Outra classe, os lipopeptídeos, também são bastante pesquisados. Possuem baixos valores de CMC e boas propriedades de limpeza. Podem ser incorporados em produtos anti-idade, hidratantes, anti-acne, antimicrobiano, antiviral, promotores de permeação, entre outros (MNIF; GHRIBI, 2015). Os BS poliméricos são conhecidos principalmente devido ao seu poder emulsionante e hidratante. São bastante utilizados na indústria de alimentos (PÉREZ-RIVERO; LÓPEZ-GÓMEZ, 2023; MOLDES et al., 2021).

2.3 COSMÉTICOS

O termo cosmético deriva da palavra grega *kosmetikós*, que significa “hábil em adornar”. No passado, os cosméticos eram extraídos da natureza, mas com o avanço das pesquisas e tecnologias, produtos sintéticos foram sendo adicionados às formulações cosméticas (CORNÉLIO; ALMEIDA, 2020; GALEMBECK; CSORDAS, 2009).

Segundo a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA):

- Produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes: 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 (BRASIL, 2022).

No Brasil, todos os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes estão sujeitos a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 752, de 19 de setembro de 2022, a qual dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Esses produtos podem ser definidos como Grau 1, quando a formulação possuir características 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; ou Grau 2, quando a formulação possuir indicações específicas cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso. Para melhor nortear essa definição a ANVISA disponibiliza através da RDC 752/2022, uma lista de produtos que se encaixam em cada grupo (BRASIL, 2022).

Tabela 3 - Lista de produtos grau 1 e grau 2.

Lista de grupos de produtos grau 1
1. Água de colônia, Água Perfumada, Perfume e Extrato Aromático; 2. Amolecedor de cutícula (não cáustico); 3. Aromatizante bucal; 4. Base facial/corporal (sem finalidade fotoprotetora); 5. Batom labial e brilho labial (sem finalidade fotoprotetora); 6. Blush/Rouge (sem finalidade fotoprotetora); 7. Condicionador/Creme rinse/Enxaguatório capilar (exceto os com ação antiqueda, anticasca e/ou outros benefícios específicos que justifiquem comprovação prévia); 8. Corretivo facial (sem finalidade fotoprotetora); 9. Creme, loção e gel para o rosto (sem ação fotoprotetora da pele e com finalidade exclusiva de hidratação); 10. Creme, loção, gel e óleo esfoliante ("peeling") mecânico, corporal e/ou facial; 11. Creme, loção, gel e óleo para as mãos (sem ação fotoprotetora, sem indicação de ação protetora individual para o trabalho, como equipamento de proteção individual - EPI - e com finalidade exclusiva de hidratação e/ou refrescância); 12. Creme, loção, gel e óleos para as pernas (com finalidade exclusiva de hidratação e/ou refrescância); 13. Creme, loção, gel e óleo para limpeza facial (exceto para pele acneica); 14. Creme, loção, gel e óleo para o corpo (exceto os com finalidade específica de ação antiestrias, ou anticelulite, sem ação fotoprotetora da pele e com finalidade exclusiva de hidratação e/ou refrescância); 15. Creme, loção, gel e óleo para os pés (com finalidade exclusiva de hidratação e/ou refrescância); 16. Delineador para lábios, olhos e sobrancelhas; 17. Demaquilante; 18. Dentífrício (exceto os com flúor, os com ação antiplaca, anticárie, antitártaro, com indicação para dentes sensíveis e os clareadores químicos); 19. Depilatório mecânico/epilatório; 20. Desodorante axilar (exceto os com ação antitranspirante); 21. Desodorante colônia; 22. Desodorante corporal (exceto desodorante íntimo); 23. Desodorante pédico (exceto os com ação antitranspirante); 24. Enxaguatório bucal aromatizante (exceto os com flúor, ação antisséptica e antiplaca); 25. Esmalte, verniz, brilho para unhas; 26. Fitas para remoção mecânica de impureza da pele; 27. Fortalecedor de unhas; 28. Kajal; 29. Lápis para lábios, olhos e sobrancelhas; 30. Lenço umedecido (exceto os com ação antisséptica e/ou outros benefícios específicos que justifiquem a comprovação prévia); 31. Loção tônica facial (exceto para pele acneica); 32. Máscara para cílios; 33. Máscara corporal (com finalidade exclusiva de limpeza e/ou hidratação); 34. Máscara facial (exceto para pele acneica, peeling químico e/ou outros benefícios específicos que justifiquem a comprovação prévia); 35. Modelador/fixador para sobrancelhas; 36. Neutralizante para permanente e alisante; 37. Pó facial (sem finalidade fotoprotetora); 38. Produtos para banho/imersão: sais, óleos, cápsulas gelatinosas e banho de espuma; 39. Produtos para barbear (exceto os com ação antisséptica);

40. Produtos para fixar, modelar e/ou embelezar os cabelos: fixadores, laquês, reparadores de pontas, óleo capilar, brilhantinas, mousses, cremes e géis para modelar e assentar os cabelos, restaurador capilar, máscara capilar e umidificador capilar; 41. Produtos para pré-barbear (exceto os com ação antisséptica); 42. Produtos pós-barbear (exceto os com ação antisséptica); 43. Protetor labial sem fotoprotetor; 44. Removedor de esmalte; 45. Sabonete abrasivo/esfoliante mecânico (exceto os com ação antisséptica ou esfoliante químico); 46. Sabonete facial e/ou corporal (exceto os com ação antisséptica ou esfoliante químico); 47. Sabonete desodorante (exceto os com ação antisséptica); 48. Secante de esmalte; 49. Sombra para as pálpebras; 50. Talco/pó (exceto os com ação antisséptica); 51. Xampu (exceto os com ação antiqueda, anticaspas e/ou outros benefícios específicos que justifiquem a comprovação prévia); 52. Xampu condicionador (exceto os com ação antiqueda, anticaspas e/ou outros benefícios específicos que justifiquem a comprovação prévia).

Lista de grupos de produtos grau 2

1. Água oxigenada 10 a 40 volumes (incluídas as cremosas exceto os produtos de uso medicinal); 2. Antitranspirante axilar; 3. Antitranspirante pédico; 4. Ativador/ acelerador de bronzeado; 5. Batom labial e brilho labial infantil; 6. Blush/ rouge infantil; 7. Bronzeador; 8. Bronzeador simulatório; 9. Clareador da pele; 10. Clareador para as unhas químico; 11. Clareador para cabelos e pêlos do corpo; 12. Colônia infantil; 13. Condicionador anticaspas/antiqueda; 14. Condicionador infantil; 15. Dentífrico anticárie; 16. Dentífrico antiplaca; 17. Dentífrico antitártaro; 18. Dentífrico clareador/ clareador dental químico; 19. Dentífrico para dentes sensíveis; 20. Dentífrico infantil; 21. Depilatório químico; 22. Descolorante capilar; 23. Desodorante antitranspirante axilar; 24. Desodorante antitranspirante pédico; 25. Desodorante de uso íntimo; 26. Enxaguatório bucal antiplaca; 27. Enxaguatório bucal antisséptico; 28. Enxaguatório bucal infantil; 29. Enxaguatório capilar anticaspas/antiqueda; 30. Enxaguatório capilar infantil; 31. Enxaguatório capilar colorante / tonalizante; 32. Esfoliante "peeling" químico; 33. Esmalte para unhas infantil; 34. Fixador de cabelo infantil; 35. Lenços Umedecidos para Higiene infantil; 36. Maquiagem com fotoprotetor; 37. Produto de limpeza/ higienização infantil; 38. Produto para alisar e/ ou tingir os cabelos; 39. Produto para área dos olhos (exceto os de maquiagem e/ou ação hidratante e/ou demaquilante); 40. Produto para evitar roer unhas; 41. Produto para ondular os cabelos; 42. Produto para pele acneica; 43. Produto para rugas; 44. Produto protetor da pele infantil; 45. Protetor labial com fotoprotetor; 46. Protetor solar; 47. Protetor solar infantil; 48. Removedor de cutícula; 49. Removedor de mancha de nicotina químico; 50. Repelente de insetos; 51. Sabonete antisséptico; 52. Sabonete infantil; 53. Sabonete de uso íntimo; 54. Talco/amido infantil; 55. Talco/pó antisséptico; 56. Tintura capilar temporária/progressiva/permanente; 57. Tônico/loção Capilar; 58. Xampu anticaspas/antiqueda; 59. Xampu colorante; 60. Xampu condicionador anticaspas/antiqueda; 61. Xampu condicionador infantil; 62. Xampu infantil.

Fonte: BRASIL, 2022.

2.3.1 Cosméticos naturais

O mercado de produtos cosméticos naturais, orgânicos e veganos é crescente nas últimas décadas. Logo, é de suma importância que todos os conceitos envolvidos nesse universo estejam bem elucidados. No Brasil, não existe uma regulamentação específica que defina cosméticos naturais. Todos os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes estão sujeitos a RDC 752/2022. Outras agências de saúde com relevância mundial, como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA), também não apresentam normas que definam exclusivamente cosméticos naturais e orgânicos. Diante da necessidade de padronização dos conceitos e definições que envolvem os produtos naturais, existem alguns referenciais internacionais, como o *Cosmetic Organic Standard* (COSMOS), *Natrue* e a *International Organization for Standardization* (ISO), reconhecidos e aceitos mundialmente, que estabelecem regras e conceitos (Figura 4), além de oferecer certificação (FLOR; MAZIM; FERREIRA, 2019).

Figura 4 - Definições de Ingredientes Naturais segundo referenciais internacionais.

COSMOS	Natrue	ISO 16128
São ingredientes de origem vegetal, animal ou microbiológica que passaram por processos físicos permitidos pela certificadora. Os minerais permitidos devem ser puros e naturais submetidos apenas a processos físicos.	São ingredientes de origem vegetal, inorgânico-mineral ou animal (com exceção dos que causam sofrimento) e suas misturas, processados fisicamente, de acordo com as definições no referencial.	São obtidos de plantas, animais, minerais (exceto os de origem fóssil) ou microorganismos, incluindo os derivados desses materiais que são obtidos por meio de processos físicos ou de outros processos que não resultem em modificações químicas intencionais.

Fonte: Cosmos, 2018; Natrue, 2021, ISO 16128, 2017.

O COSMOS é um referencial europeu privado, independente e sem fins lucrativos, com sede em Bruxelas. O padrão COSMOS define os critérios que as empresas devem atender, em toda cadeia produtiva, para garantir aos consumidores que seus produtos são cosméticos orgânicos ou naturais genuínos, produzidos com as mais altas práticas de sustentabilidade (COSMOS, 2018). É uma referência bastante difundida no continente Europeu e, apesar de não ser popular no Brasil, empresas brasileiras que tenham interesse em exportação devem adequar-se.

A *Natrue* é uma associação internacional sem fins lucrativos, a qual estabelece normas que são aplicáveis a matérias-primas e produtos acabados destinados ao uso cosmético. O Selo *Natrue*, criado em 2008, garante ao consumidor final o padrão de cosmético natural e orgânico de alta qualidade (NATRUE, 2021).

A ISO 16128, foi publicada pela primeira vez no ano 2016 e conta com abordagens para calcular índices de origem natural e orgânica que se aplicam às categorias de ingredientes definidas (ISO 16128, 2017).

No Brasil, o Instituto Biodinâmico de Desenvolvimento Rural (IBD) é a única certificadora de produtos orgânicos e naturais. Localizado em Botucatu / SP (Brasil), desde a sua fundação, o IBD atua em todos os estados brasileiros, bem como em mais de 20 países, oferecendo certificação aceita globalmente. A maior certificadora da América Latina, além dos protocolos de certificação orgânica, também oferece certificações de sustentabilidade (IBD, 2022).

Diante da inexistência de legislação própria para os cosméticos naturais, o seu desenvolvimento pode ser ainda mais desafiador. Inicialmente, a empresa deve estabelecer qual referencial irá adotar para garantir a certificação que abrangerá o mercado alvo. Além disso, a restrição de ingredientes, os custos e a padronização da matéria-prima também são questões complicadoras durante o desenvolvimento deste tipo de cosmético.

Para obter o selo Ingredientes Naturais, as formulações cosméticas devem atender aos requisitos mínimos por níveis de substâncias naturais (cor verde), níveis máximos de substâncias naturais derivadas (cor laranja), como demonstrados na Figura 5 (IBD, 2022).

Além disso, os cosméticos naturais deverão destacar em seu rótulo quais ingredientes são naturais e/ou orgânicos e/ou oriundos de extrativismo certificado. O rótulo pode indicar que o produto contém ingredientes naturais e/ou orgânico. No caso de usar a palavra orgânico, ela só poderá ser usada na parte traseira do rótulo do produto, junto à lista de componentes (IBD, 2022).

Figura 5 - Requisitos por categoria de produtos a serem cumpridos para certificação.

		1 ***	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 ***	12 #	13
Conteúdo de matéria-prima em relação ao produto acabado (%)		Produtos de limpeza e cuidados faciais livres de água e óleo	Parfums, Eau de Parfum, Eau de Toilette, Eau de Cologne)	Emulsões A/O e oleogéis para pele	Maquiagens contendo água	Desodorantes e antiperspirantes	Emulsões O/A e géis para pele	Fotoprotectores	Produtos capilares	Produtos de limpeza da pele com surfactantes	Higiene bucal	Maquiagens anidras	Sabonetes e produtos de limpeza da pele anidros	Águas
<i>NATRUE</i>														
Cosméticos naturais (nível 1) - NATRUE E IBD	Concentração mínima de substâncias naturais	80	60	30	10	10	10	10	3	3	2	1	1	0,1
	Máximo de derivado	20	10	30	30	30	25	55	40	85	70	50	99	10
Cosméticos orgânicos (nível 2) - NATRUE	Concentração mínima de substâncias naturais	90 *	60 *	30 *	15 *	15 *	15 *	15 *	15 *	15 *	15 *	15 *	1 *	15 *
	concentração máxima de substâncias derivadas de naturais	10 **	10 **	20 **	15 **	15 **	20 **	30 **	15 **	25 **	15 **	15 **	99 **	5 **

* Nenhum requisito ou limitação específica sobre o conteúdo percentual de substâncias idênticas ao natural ou água, exceto quando indicado

* Conteúdo de substâncias naturais oriundas da agricultura orgânica certificada (item 3.3)

** Produção de substâncias derivadas de naturais fabricadas a partir de material orgânico.

*** Produto isento de água (anidros) podem conter até 5% de água adicionada.

Para produtos da categoria 12 (Sabonetes e produtos de limpeza da pele anidros contendo surfactantes) o conteúdo orgânico mínimo necessário (respectivamente $\geq 95\%$ do conteúdo como em * e **) refere-se às porções naturais e derivadas de naturais a serem adicionadas.

Fonte: Adaptado de IBD, 2022.

2.4 PELE HUMANA

A pele, maior órgão do corpo humano, é constituída por uma estrutura bastante complexa e heterogênea. É reconhecida como um órgão de múltiplas funções, entre elas a proteção à entrada de substâncias tóxicas e patógenos, perspiração, transpiração, pigmentação, queratogênese, termorregulação, defesa e absorção da radiação solar (UV), síntese de vitamina D, eliminação de substâncias químicas, além de possuir papel importante na estética (ALMEIDA, 2020; AGUIAR et al., 2017; BENTO, 2015; TESTON et al., 2010).

A epiderme, camada mais superficial da pele, é a responsável pelo contato com o ambiente externo. Não é um tecido vascularizado e, por isso, depende dos nutrientes provenientes da derme. Estruturalmente é composta por células compactadas justapostas, com diferentes morfologias, grau de maturidade e profundidade (ALMEIDA, 2020; BROHEM et al., 2011; MURPHREE, 2017).

A subcamada mais externa da epiderme é o estrato córneo, constituído por queratinócitos mortos preenchidos com queratina proteica, sendo constantemente descartado e reabastecido por subcamadas abaixo, e corresponde à principal barreira de penetração cutânea. A camada granulosa, localizada abaixo do estrato córneo, é compreendida por células achatadas, nucleadas e com grânulos lamelares e querato-hialina, que são responsáveis pela impermeabilização da pele à água, impedindo a desidratação. A camada espinhosa é formada por células de Malpighi, que fornecem adesão celular e resistência a forças mecânicas. A camada mais interna da epiderme, a camada basal ou camada germinativa, é a responsável pela renovação contínua da epiderme e pela nutrição das camadas superiores. É formada, principalmente, por proteínas colágeno do tipo IV e proteoglicanos e povoada por células tronco (ALMEIDA, 2020; BROHEM et al., 2011; MURPHREE, 2017; WELLER et al., 2008).

Além disso, na epiderme estão presentes melanócitos, produtores de melanina, que tem como principal função proteger o núcleo da célula epidérmica contra a ação dos raios ultravioleta; as células de Langerhans, imunocompetentes, capazes de reconhecer, processar e fagocitar antígenos na pele; e as células de Merkel, células neuroendócrinas cutâneas, responsáveis

pelo sensorial cutâneo (ALMEIDA, 2020; BROHEM et al., 2011; MURPHREE, 2017; WELLER et al., 2008).

Entre a epiderme e a derme está a junção dermo-epidérmica, formada por uma rede de fibras de proteínas com colágeno IV, laminina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e fatores de crescimento (ALMEIDA, 2020).

A derme, camada intermediária da pele, é um tecido de sustentação no qual atravessam vasos e nervos, onde estão implantados os anexos cutâneos como as glândulas sudoríparas, pelos, glândulas sebáceas e unhas. As células mais abundantes nesse tecido são os fibroblastos, responsáveis pela síntese e renovação da matriz extracelular, produção de colágeno, elastina e glicosaminas. Constituída por uma matriz de tecido conjuntivo contendo fibras de colágeno, filamentos e substância fundamental amorfa, a derme é subdividida em derme papilar, subpapilar e derme reticular. A derme papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo e contém alças capilares responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e oxigenação da camada basal da epiderme. A camada subpapilar é formada em tecido conjuntivo frouxo assim como a camada papilar, mas se distribui em torno dos anexos cutâneos. A derme reticular é formada por tecido conjuntivo denso e é quem promove a rede vascular e linfática (ALMEIDA, 2020; BARONI et al., 2012; MURPHREE, 2017; SHIMIZU, 2016).

A hipoderme corresponde a camada mais profunda da pele, formada majoritariamente por células adiposas que se moldam aos músculos adjacentes, com as funções de amortecer a pressão física externa contra traumas, reter a umidade e gerar calor (ALMEIDA, 2020; MARIONNET; TRICAUD; BERNERD, 2015).

2.4.1 Microbiota da pele humana

A superfície da pele humana é uma barreira física capaz de evitar a invasão de patógenos estranhos, mas ao mesmo tempo é colonizada por uma ampla gama de microrganismos, que podem ser tanto comensais, quanto mutualistas. A microbiota cutânea possui papel essencial na proteção contra patógenos, na modulação do sistema imunológico e na degradação de produtos naturais. Se a barreira cutânea tiver sua integridade violada e houver um desequilíbrio entre colonização de microrganismos benéficos e patogênicos pode resultar em doenças de pele, como no caso da acne vulgar com a presença

do *Cutibacterium acnes*, ou até mesmo doenças sistêmicas (ADU et al., 2020; BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018).

Durante os últimos anos, devido aos grandes avanços das técnicas de estudos de sequenciamento metagenômico foi possível compreender que a composição do microbioma da pele humana é inerente sobretudo a fisiologia do local da pele. Locais sebáceos como a glabella são predominantemente colonizados por *Cutibacterium acnes*, enquanto em ambientes úmidos como a fossa antecubital, o antebraço e os espaços entre os dedos dos pés a presença das espécies *Staphylococcus spp* e *Corynebacterium spp* se destaca. Além disso, em diferentes regiões da superfície corporal são encontrados fungos do gênero *Malassezia* como nas regiões centrais do corpo e do braço. Enquanto os pés são colonizados por uma combinação de fungos das espécies *Malassezia spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Epicoccum spp.*, entre outros. Já a colonização por vírus, diferente das bactérias e fungos, parece ser inerente ao indivíduo e não ao local anatômico (SCHOMMER; GALLO, 2013).

Existem algumas substâncias fisiológicas na superfície cutânea capazes de equilibrar e proteger a pele, como as bacteriocinas, enzimas e defensinas. Os BS também podem ser uma alternativa importante para a manutenção da pele devido a mecanismos inibitórios frente a patógenos cutâneos. Além disso, produtos cosméticos e de higiene pessoal podem auxiliar na proteção da pele, limpeza, hidratação, inibição do crescimento de patógenos, entre outras (ADU et al., 2020; MOLDES et al., 2021).

2.5 ÁGUA MICELAR

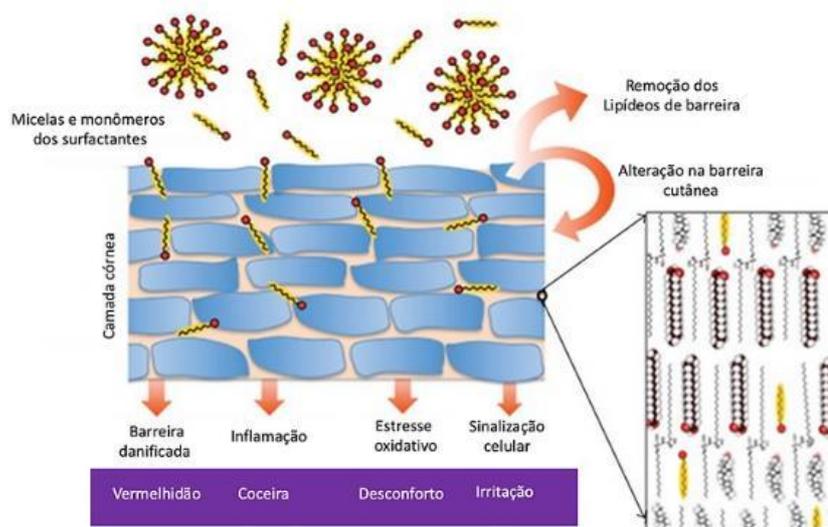
Atualmente, a limpeza é um importante passo no cuidado diário da pele. Promove redução de infecções cutâneas, diminuição de disseminação de doenças contagiosas, além de promover o embelezamento da pele. Para isso, existem diferentes produtos capazes de exercer essa atividade, como sabonetes líquidos e em barras, demaquilantes, *cleasing oil*, água micelar, entre outros. O grande desafio dessas formulações é limitar a interação dos surfactantes apenas às sujidades indesejáveis e evitar danos ao estrato córneo, a barreira de proteção cutânea (CONFORTI et al., 2021; DRAELOS, 2017).

A água micelar foi desenvolvida na França há mais de cem anos como uma alternativa para driblar a dificuldade de limpeza facial causada pela elevada dureza da água parisiense. É uma solução de limpeza para pele que tem água,

um surfactante suave e um hidratante como ingredientes principais. Tem como finalidade retirar as impurezas da pele sem causar ressecamento, sendo indicado principalmente para usuários de pele seca e sensível (CASTRO, 2019; DRAELOS, et al., 2013; MUNHOZ; ROCHA, 2021).

Os surfactantes podem solubilizar componentes da pele como lipídeos, enzimas, fatores hidratantes naturais, além de romper e remover o estrato córneo, comprometendo a função de barreira da pele. Também podem permanecer no estrato córneo e resultar em uma exposição crônica ao surfactante. Diante disso, a grande vantagem da água micelar frente a outras formulações de limpeza para a pele é a combinação de surfactantes menos agressivos aliados, principalmente, a ingredientes hidratantes resultando em um sistema de limpeza suave e eficaz, minimizando possíveis danos ao estrato córneo (WALTERS et al., 2012).

Figura 6 – Interação dos surfactantes com a pele.



Fonte: Adaptado de WALTERS et al., 2012.

A água micelar pode ser monofásica, indicada para limpeza da pele e remoção de maquiagens a base d'água, com uma formulação composta primordialmente por água, surfactante e conservantes; ou bifásica, que além da água, surfactante e conservante também há a presença de um composto lipídico volátil, promovendo uma maior remoção de maquiagens a prova d'água, devido

a maior carga de substâncias hidrofóbicas presentes (CARLI, 2015; MUNHOZ; ROCHA, 2021).

Como discutido anteriormente, as micelas são as responsáveis pelas características dos surfactantes. É importante ressaltar que a conformação das micelas é dinâmica e adapta-se ao meio em que está presente. O mecanismo de limpeza da água micelar é baseado nessas características. Quando a água micelar é aplicada em algodão de característica hidrofílica, devido a celulose em sua composição, a parte hidrofílica do surfactante será atraída pelo algodão, deixando a parte hidrofóbica disponível para interagir e com as sujidades oleosas da pele, retirando-as com sucesso.

Cerezzo (2017) realizou um levantamento dos principais componentes de diferentes formulações de água micelar e observou que a água aparece como o ingrediente majoritário, que além de ser o veículo da formulação, muitas vezes também funciona como solvente. Além dela pode ser necessário o uso de outros co-solventes para facilitar a solubilização de componentes, como alguns álcoois, polissorbato 20, butileno glicol e metilenopropanediol.

O surfactante é o ingrediente que será responsável pela formação das micelas e consequente limpeza da pele, podendo ser utilizados diferentes tensoativos ou combinações desses, a depender do objetivo. Entre os mais utilizados estão os poloxamer 188, poloxamer 184, poloxamer 124, PEG-6 triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, PEG-40 óleo de rícino hidrogenado, PEG-7 cocoato de glicerila, cocoanfodiacetato dissódico e SDS (CASTRO, 2019; CEREZZO, 2017).

Outro ingrediente extremamente importante para esse tipo de formulação são os conservantes, visto que devido à elevada proporção de água existe grande propensão a contaminação microbológica. Entre os conservantes usuais estão o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fenoxietanol, brometo de cetrimônio e butileno glicol. Além desses ingredientes pode ser necessário a adição de emolientes, hidratantes e corretores de pH, para evitar que a formulação cause danos à barreira cutânea (CARLI, 2015; CEREZZO, 2017; MUNHOZ; ROCHA, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial de segurança e eficácia para a aplicação BS-SS em formulações cosméticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade do BS-SS em linhagens celulares de fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT.

Avaliar potencial de irritação ocular do BS-SS e da formulação de água micelar contendo o BS-SS.

Avaliar a eficiência da limpeza da água micelar contendo o BS-SS em pele de orelha de porco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

O BS-SS, obtido a partir HHBCA e óleo de soja por fermentação submersa, foi gentilmente fornecido na forma de pó seco pelo Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, coordenador do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL/USP).

4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO BIOSSURFACTANTE

4.2.1 Cultura de células

O ensaio de citotoxicidade do BS-SS foi realizado conforme Mossman (1983) com modificações, em células de fibroblastos da linhagem murina L929 e queratinócitos da linhagem humana HaCaT, no Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os fibroblastos foram cultivados em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) e os queratinócitos em meio DMEM e Ham's F-12 (proporção 1:1), ambos suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% da solução dos antibióticos penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular de 75 cm³ (KASVI) e mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Panasonic, MCO-18ACL-PA, EUA) até atingirem 80% de confluência. Em seguida, removeu-se o meio, lavou-se com solução salina tamponada com fosfato e adicionou-se 2 mL de solução de tripsina/EDTA 2,5% às garrafas de cultura dos fibroblastos e queratinócitos, as quais foram incubadas por 4 minutos, a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após, acrescentou-se 4 mL dos respectivos meios suplementado com 10% SBF e 1%

da solução de antibióticos para inativação da enzima. Recolheu-se o meio contendo as células e transferiu-se para um tubo de centrifugação estéril de 15 mL, procedendo a centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células L929 foram ressuspensas em meio DMEM e as células de HaCaT em DMEM/ Ham's F-12, ambos suplementado com 10% SBF e 1% de antibiótico. As suspensões de células foram diluídas diretamente no corante Azul de Trypan 10x para a contagem em câmara de Neubauer para iniciar o ensaio de viabilidade celular.

4.2.2 Ensaio de viabilidade celular

O teste colorimétrico do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) conforme Mossman (1983), com algumas modificações, foi utilizado para mensurar a viabilidade dos fibroblastos e queratinócitos. As células foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de 5×10^3 células/poço para L929 e 1×10^4 células/poço para HaCaT e incubadas por 24 horas em incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, removeu-se o meio e adicionou-se 150 µL de meio DMEM ou DMEM/ Ham's F-12 suplementados (10% de SBF e 1% da solução de antibióticos) em cada poço. Em seguida, foram adicionados 50 µL das amostras, de modo a obter-se concentrações do BS-SS variando entre 2 a 32 mg/mL para os fibroblastos e 1 a 8 mg/mL para os queratinócitos. Como controles foram utilizados meio DMEM ou DMEM/ Ham's F-12 (controle negativo) e solução de DMSO 5% (v/v) (controle positivo). Os experimentos foram realizados em quadruplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 90 µL de meio DMEM ou DMEM/ Ham's F-12 suplementado acrescido de 10 µL de solução de MTT à 5 mg/mL.

As células foram incubadas com o MTT por 2,5 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação o precipitado de formazan, de coloração roxa, formado pela metabolização do MTT pelas células metabolicamente viáveis, foi dissolvido em 100 µL de DMSO e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 595 nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com o BS-SS em diferentes concentrações foi feito a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade.

4.3 TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR NA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DO OVO DE GALINHA (HET-CAM)

O potencial de irritação ocular do BS-SS foi classificado utilizando o método de teste recomendados pelo ICCVAM (Publicação do NIH N^o 10–7553, 2010) e o método descrito por Lüepke (1985). Ovos de galinha fertilizados foram selecionados e incubados sob rotação a 37,5 °C por oito dias. Após esse período, foi realizada a ovoscopia. Os ovos inviáveis foram descartados e os viáveis foram devolvidos à incubadora com a câmara de ar voltada para cima e a rotação desligada. No décimo dia, a casca ao redor da câmara de ar foi removida e as membranas internas extraídas para expor a membrana corioalantóide.

O teste consistiu em aplicar 0,3 mL de solução de BS-SS (60 mg/mL) na membrana corioalantóide. Soluções controle de NaCl 0,9% (controle negativo) e SDS (1%, p/v) e soluções de NaOH (0,1M) (controles positivos) também foram testadas. A concentração escolhida do BS-SS é o valor de sua CMC, 60 mg/mL (BARBOSA et al.,2022) e a concentração da solução de SDS (1 %, p/v) é a recomendada para soluções de limpeza para a pele (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). A integridade da membrana foi avaliada por 300 segundos. O teste HET-CAM é considerado aceitável se os controles positivos (NaOH 0,1 M e SDS 1,0 %) forem classificados como severamente irritantes (IS > 9) com IS variando entre 10 e 19. O controle negativo (NaCl 0,9 %) deve ser classificado como não irritante (ICCVAM, 2010; LUEPKE, 1985).

Como a solução do BS-SS é um pouco turva, ao final do teste a membrana foi lavada com NaCl 0,9% para melhor visualização da membrana corioalantóide. O experimento foi realizado em triplicata (3 ovos para cada solução). Após o exame da membrana, a pontuação de irritação (IS) foi calculada por meio de pontuações numéricas dependentes do tempo para lise, hemorragia e coagulação (Tabela 4) somadas para dar um único valor numérico indicando o potencial de irritação da substância de teste.

Tabela 4 - Esquema de pontuação para teste de irritação com membrana corioalantóide de ovo de galinha.

Quantificação IS			
Efeito	Tempo (segundos)		
	30	120	300
Hiperemia / lise	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Classificação	
Score	Categoria irritante
0–0.9	Não irritante
1–4.9	irritante fraco ou leve
5–8.9	iirritante moderado
9.0–21	irritante forte ou severa

Fonte: ICCVAM (Publicação NIH N° 10–7553,9 2010)9 e Lüepke,1985.

4.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE LIMPEZA

A eficiência da limpeza cosmética foi avaliada usando pele de orelha de porco de acordo com os métodos modificados relatados anteriormente (KNOTH et al., 2019; MARTO et al., 2016; PAKKANG et al., 2018; WEBER et al., 2018;). A pele da orelha suína foi obtida do matadouro local, lavada com água e utilizada imediatamente. Em uma área de 1 cm² de pele foram aplicadas quantidades semelhantes de batom comercialmente disponível, base e lápis de olho. A maquiagem foi mantida para secagem natural na pele por 30 minutos. Em seguida, um mililitro da solução de BS-SS (60 mg/mL, p/v em água destilada) foi aplicado em uma almofada de algodão que foi usada para limpar a área de teste. A pele foi friccionada três vezes com dois dedos para dissolver a maquiagem no algodão contendo a solução. O mesmo procedimento foi realizado com água, SDS 1% (p/v em água destilada) e com água micelar comercial para comparar a eficácia de limpeza. As limpezas foram realizadas em triplicata. Após cada limpeza foram tiradas fotos para quantificar o percentual de remoção da maquiagem utilizando o software *ImageJ*®. A extensão e a intensidade da mancha foram quantificadas usando o determinante da mancha de intensidade de área, que levou em consideração tanto a intensidade refletida quanto as áreas manchadas associadas. A eficácia da remoção de maquiagem (% de eficiência

de limpeza) foi determinada calculando a variância nos valores determinantes de intensidade de área antes e depois do processo de limpeza.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA)/Dunnett, considerando-se o nível de significância de 0,05. A comparação entre as amostras foi feita através do teste de significância de Tukey.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

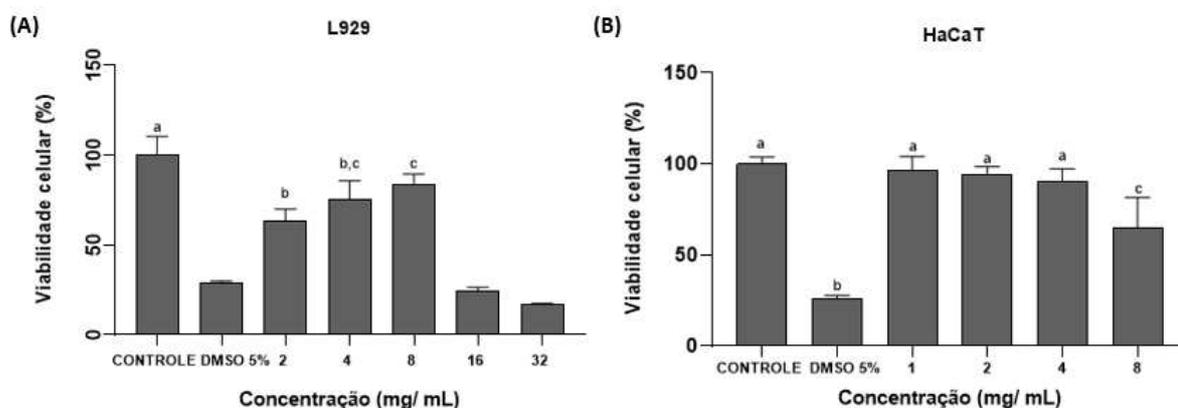
6.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O BS-SS é produzido a partir de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) e óleo de soja por fermentação submersa. É composto por um complexo de carboidratos-proteínas-lipídios, sendo do tipo polimérico e aniônico. Possui importante propriedade emulsificante frente a diversos compostos hidrofóbicos, além de se manter estável e apresentar ação emulsificante sob diferentes condições de temperatura, pH e salinidade (BARBOSA et al., 2022).

Uma questão importante ao considerar a utilização de BS em produtos cosméticos é a sua segurança. Por esta razão, a citotoxicidade do BS-SS foi avaliada em linhagens de células da pele com base no potencial de aplicação cosmética.

De acordo com os resultados do teste de citotoxicidade, a redução da viabilidade dos fibroblastos L929 ocorreu significativamente apenas nas concentrações de 32 mg/mL e 16 mg/mL. A concentração que afeta a viabilidade de 50% das células testadas (IC50) calculada para o BS-SS foi de 10,49 mg/mL (Figura 7- A). Para a linhagem celular de HaCaT, o IC50 foi de 11,77 mg/mL (Figura 7- B). De acordo com a ISO 10993-5/2009, viabilidade celular acima de 70% não caracteriza efeitos tóxicos significativos.

Figura 7 – Viabilidade celular da linhagem de (A) fibroblastos (L929) e (B) queratinócitos (HaCaT) após 24 horas de tratamento com o BS-SS em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os resultados foram expressos em porcentagem em comparação com o controle (tratamento DMEM/ Ham's F-12). Os dados são apresentados como média \pm S.E.M. (média do erro padrão) de valores quadruplicados para cada concentração. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras minúsculas diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$).

Este estudo descreve pela primeira vez dados de toxicidade *in vitro* relacionados ao BS-SS. Uma vez que os BS têm sido destacados como potenciais alternativas ao uso de surfactantes sintéticos em formulações para cuidados com a pele, os dados de citotoxicidade dos BS nas células da pele são de grande importância. Embora não existam dados na literatura sobre o BS-SS, pode-se fazer uma comparação com a citotoxicidade de BS produzidos por outros microrganismos em linhagens celulares da pele.

Estudos anteriores demonstraram que BS obtidos de *Saccharomyces cerevisiae* não apresentaram citotoxicidade contra a linhagem de fibroblastos L929 na concentração de 0,2 mg/mL (RIBEIRO et al., 2020).

Rodríguez-López e colaboradores (2020) avaliaram a citotoxicidade de BS produzidos a partir de *Bacillus* isolado de água de maceração de milho e *Lactobacillus pentosus*. O estudo foi realizado em células fibroblásticas de camundongo (NCTC clone 929) usando o kit de ensaio de proliferação celular MTS (Abcam). Ambos os BS não apresentaram citotoxicidade a 1 mg/mL, apresentando viabilidade celular superior a 80%.

Em outro estudo, soluções contendo 5 mg/mL de BS *Lactobacillus paracasei* mostraram valores de proliferação celular de 97% na linhagem celular

de fibroblastos de camundongo 3T3 usando o ensaio de sulforrodamina B (SRB). Na maior concentração de BS testada (10 mg/mL) a proliferação celular foi superior a 64% (FERREIRA et al., 2017).

Sharma et al. (2022) avaliaram a citotoxicidade de um BS de *Lactobacillus pentosus* NCIM 2912 através do ensaio MTT. O estudo de citotoxicidade realizado em células de rim embrionário humano (HEK 293), fibroblasto de camundongo ATCC L929 e linhas celulares do tipo epitelial humano (HEP-2) registrou viabilidade de $90,3 \pm 0,1\%$, $99,2 \pm 0,43$ e $94,3 \pm 0,2\%$, respectivamente. Estes resultados não demonstraram nenhum efeito substancial na redução da viabilidade celular em concentrações de 1 mg/mL.

BS ramnolipídeos produzidos pelas linhagens de *Marinobacter MCTG107b* e *Pseudomonas MCTG214* foram investigados quanto à sua citotoxicidade contra queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) pelos ensaios de azul de alamar e iodeto de propídio. Ambos os BS exibiram citotoxicidade insignificante em concentrações de até 0,25 mg/mL da linhagem celular HaCaT. No mesmo estudo, também foram testados dois tensoativos sintéticos amplamente utilizados em formulações cosméticas e farmacêuticas, Crodasinic LS30 e Texapon N70. Seus achados indicaram que ambos os surfactantes industriais foram capazes de induzir citotoxicidade em concentrações muito mais baixas ($>0,002$ mg/mL) em comparação com os BS ($>0,5$ mg/mL) (VOULGARIDOU et al., 2021).

BS obtidos de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*, na concentração de 0,2 mg/mL, não apresentaram citotoxicidade contra linhagens celulares de fibroblastos (L929) e macrófagos (RAW 264.7) (RIBEIRO et al., 2020). Por fim, o BS produzido por *Rhodococcus sp erythropolis* 51T7, apresentou menor toxicidade em células fibroblásticas e queratinócitos, comparado ao surfactante sintético SDS (MARQUES et al., 2009).

Em comparação com os dados de citotoxicidade de outros BS apresentados em estudos anteriores, o BS-SS apresentou maiores valores de IC50 sugerindo ser uma nova oportunidade segura para uso em cosméticos e formulações farmacêuticas tópicas.

Arechabala et al. (1999) compararam a citotoxicidade de seis surfactantes sintéticos pertencentes a diferentes classes (não-iônicos, catiônicos e aniônicos) contra uma cultura primária de fibroblastos humanos usando o teste do vermelho

neutro e o ensaio MTT. Os tensoativos testados foram classificados na seguinte ordem crescente de citotoxicidade: Tween 80, Texapon N40, Tween 60, Texapon K1298, Triton X100 e cloreto de benzetônio. O surfactante menos citotóxico, Tween 80, apresentou valores de IC50 de 0,85 mg/mL e 0,21 mg/mL usando os ensaios de vermelho neutro e MTT, respectivamente.

Devido à menor citotoxicidade dos BS em comparação com os sintéticos, os BS têm sido relatados como alternativas adequadas para uso em cosméticos e produtos farmacêuticos tópicos. Assim, como dados preliminares, os resultados de citotoxicidade sugere-se que o potencial uso do BS-SS em formulações tópicas em concentrações de até 8 mg/mL.

6.2 HET-CAM

O teste HET-CAM é amplamente utilizado e aceito mundialmente para prever a irritação ocular de produtos cosméticos, sendo uma alternativa ao teste de Draize, que consiste em testes em olhos de coelhos vivos. O teste de Draize, considerado padrão ouro para avaliação de irritação ocular, é um dos métodos mais criticados pelos danos causados aos animais e tem sido substituído principalmente por questões éticas (RIVERO et al., 2021; TAVASZI, BUDAI, 2007). Através do teste HET-CAM é possível visualizar reações irritantes como hemorragia, lise, coagulação e hiperemia na membrana corioalantóide de ovos de galinha com embriões (BUDAI et al., 2021). A ocorrência desses danos em resposta a um composto é a base para o uso dessa técnica como indicação de que um produto ou substância danifica as mucosas, principalmente o olho, em ensaios realizados *in vivo* (TAVASZI; BUDAI, 2007).

O potencial irritante do BS-SS e substâncias controles foram observados através de alterações na membrana corioalantóica do ovo de galinha após 300 segundos de exposição.

A exposição da membrana ao BS-SS não resultou em hemorragia, lise e dano de coagulação na membrana corioalantóide na concentração utilizada (60 mg/mL) durante o tempo avaliado, o que classifica a solução de BS-SS como não irritante de acordo com a metodologia utilizada. Os resultados encontrados para os controles corroboram com os descritos na literatura. O NaCl 0,9% (controle não irritante) não apresentou reação no CAM, sendo classificado como

não irritante. SDS 1% e NaOH (controles irritantes) foram classificados como severamente irritantes apresentando IS de 12 e 19, respectivamente (Figura 8).

Figura 8. Fotos de HET-CAM na presença de soluções de NaCl 0,9 %, BS-SS (60mg/mL), SDS (1%) e NaOH (0,1M).

	Tempo (s)			Pontuação de irritação (IS)	Classificação
	t= 0	t= 20	t= 300		
NaCl 0.9 %				sem reação	não irritante
BS (60 mg/ mL)				sem reação	não irritante
SDS 1%				12	irritante severo
NaOH (0.1 M)				19	irritante severo

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Os resultados corroboram com um estudo anterior realizado em que BS foram testados em membrana corioalantóide BS produzidos por *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus pentosus*, os quais também não causaram nenhum dano à membrana, sendo classificados como não irritantes (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2019).

O SDS foi incluído no experimento pois além de ser um controle, também foi testado para fins de comparação entre um tensoativo sintético comum, amplamente utilizado na indústria cosmética e farmacêutica, e o BS-SS. Além

do SDS, outros tensoativos frequentemente utilizados nas indústrias cosmética e farmacêutica, como cloreto de benzalcônio, lauril éter sulfato de sódio, lauril poliglicosídeo e brometo de cetil dimetil amônio, foram considerados irritantes no teste HET-CAM (VIERA et al., 2022).

Os resultados encontrados reforçam os dados descritos na literatura que demonstram uma menor toxicidade dos BS em relação aos surfactantes sintéticos. Além disso, trazem dados inovadores sobre a ausência de potencial de irritação ocular do BS-SS, avaliada pelo teste HET-CAM. Essa descoberta abre novas oportunidades para o uso desse BS-SS como ingrediente em produtos cosméticos ou farmacêuticos de uso tópico, por exemplo.

Diante desses resultados, outros ensaios *in vitro* devem ser realizados visando complementar os dados de segurança do BS-SS, como permeabilidade e opacidade de córnea bovina ou olho isolado de galinha; ensaios em epiderme humana reconstituída e avaliação da permeação e retenção cutânea (ANVISA, 2012).

6.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE LIMPEZA

Fotografias da pele da orelha de porco coberta com diferentes produtos de maquiagem foram capturadas em condições de iluminação consistentes e submetidas à análise através do software de processamento ImageJ®. A eficiência de limpeza do BS-SS foi avaliada macroscopicamente em termos da capacidade de remover produtos de maquiagem e a eficácia foi comparada com SDS 1%, água micelar comercial (C) e água (Figura 9).

Os resultados mostram a eficácia do BS-SS em atuar como removedor de maquiagem comparável à atividade de limpeza da água micelar comercial tanto para base quanto para batom. Além disso, a capacidade de remoção de maquiagem do BS-SS mostrou-se superior à solução SDS, considerando o delineador. A eficácia de limpeza de BS-SS, solução SDS, água micelar e água considerando o produto batom foi de 90,1%, 82,4%, 83,9% e 67,1%, respectivamente. Considerando o produto base, as eficiências de limpeza obtidas foram de 98,1% para a solução SDS, 85,4% para o BS-SS, 85,5% para a água micelar e 58,2% para a água.

O lápis de olho foi o produto mais difícil de remover da pele. A água micelar apresentou eficácia de limpeza de 60,9%, seguida pela solução SDS

(39,5%), BS-SS (34,2%) e água (8,9%). A capacidade de remoção de maquiagem do BS-SS foi semelhante à solução SDS, considerando o lápis de olho.

Como esperado, o produto demaquilante comercial apresentou desempenho superior às amostras testadas. Ressalta-se que na formulação comercial há sinergismo de componentes responsáveis pela limpeza da pele, enquanto a capacidade de limpeza do BS-SS pode ser atribuída exclusivamente a ele.

O estudo realizado revelou descobertas notáveis na remoção de produtos de maquiagem. O BS-SS exibiu um padrão distinto de eficiência de remoção para os variados itens de maquiagem. Os resultados indicaram que o BS apresentou maior eficiência de remoção para base, seguido do batom e depois do lápis de olho.

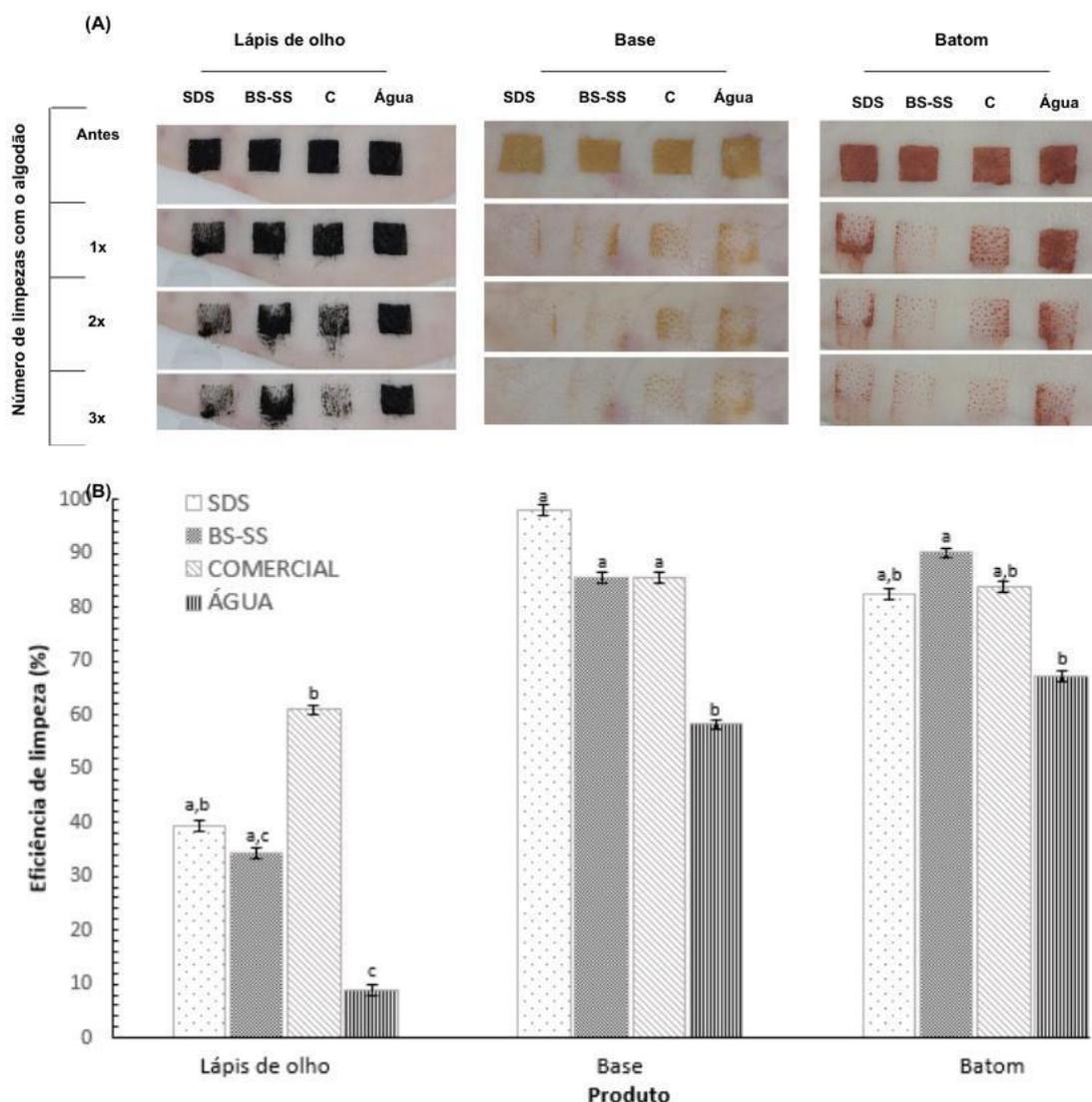


Figura 9. Análise visual (A) e quantitativa (B) da eficiência de limpeza de solução SDS a 1%, solução BS-SS (60 mg/mL), água micelar comercial e água na remoção de lápis de olho, base e batom.

Fonte: elaborado pela própria autora, 2023.

Os resultados encontrados são promissores quando se trata de outros dados publicados anteriormente para BS. Por exemplo, Knoth et al. (2019) testaram a capacidade de limpeza de um BS derivado de milho. A eficácia da limpeza foi comparada com a de outros produtos de limpeza e pôde-se observar que a atividade de limpeza do BS era algo semelhante à atividade de limpeza suave da água pura. Significativamente, a adição de BS à formulação de água micelar levou a uma redução na sua eficácia de limpeza.

Assim, pode-se inferir que o BS-SS utilizado neste trabalho apresenta propriedades emulsificantes e umectantes adequadas, parâmetros importantes para produtos de limpeza de maquiagem.

7. CONCLUSÕES

Em alinhamento com o impulso global em direção à matérias-primas de origem naturais, renováveis e não tóxicas, novos ingredientes, como o BS, constituem um caminho essencial em direção a uma nova geração de produtos cosméticos que proporcionam uma sinergia harmoniosa entre cuidados pessoais e meio ambiente.

Neste contexto, o BS oferece uma solução promissora, proveniente de origens naturais, para substituição de surfactantes sintéticos convencionais que em sua maioria são conhecidos pela sua toxicidade e não biodegradabilidade, representando ameaças significativas ao nosso ecossistema. A biodegradabilidade superior do BS, biocompatibilidade, baixa toxicidade e estabilidade em diversas condições ressaltam seu potencial como agentes ecologicamente conscientes. Além disso, a versatilidade inerente aos BS permite perfeitamente sua atuação em formulações cosméticas.

Este estudo contribui com caminho para a formulação de produtos cosméticos. Os resultados mostraram que o BS-SS apresentou propriedades de limpeza promissoras, até mesmo comparáveis à solução SDS a 1% para diferentes tipos de produtos de maquiagem, ou seja, lápis de olho, batom e base. Além disso, os resultados de toxicidade ocular e de toxicidade celular *in vitro* mostraram que o BS-SS pode ser tolerável e seguro para fins cosméticos.

Em suma, os resultados aqui apresentados impulsionam a exploração do BS nas práticas da indústria cosmética pautada na perspectiva de produtos eficazes, seguros e sustentáveis.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético. **Panorama do Setor**, 2023.

ABOUSEOUD, M.; YATAGHENE, A.; AMRANE, A., & MAACHI, R. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **J Hazard Mater**, 180 (1-3), p. 131–136. 2010

ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi J Biol Sci**, [S. l.], 28, n. 1, p. 669–679. 2021.

ADU, S. A.; NEUGHTON, P. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. **Pharmaceutics** 12, 1099, 2020.

AGUIAR, R. V. S. C.; OLIVEIRA, C.; BARELLI, N.; MELO, B.; GONÇALVES, T.; FEITOSA, G. P. V. Fotoenvelhecimento nos diferentes grupos étnicos. **Revista de Iniciação Científica, Saúde e Bem-estar** 6, n.5, p.19-30, 2017.

AHMADI-ASHTIANI, H.R.; BALDISSEROTTO, A.; CESA, E.; MANFREDINI, S.; ZADEH, H. S.; GORAB, M. G.; KHANAHMADI, M.; ZAKIZADEH, S.; BUSO, P.; VERTUANI, S. Microbial Biosurfactants as Key Multifunctional Ingredients for Sustainable Cosmetics. **Cosmetics** 7, p.46, 2020.

ALMEIDA, B. L. Modelo de pele humana reconstruída como plataforma para estudos de fotoenvelhecimento. 2020. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2020.

ANTUNES, F. A. F. Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leite fluidizado. 2015. **Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)** - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

ARAUJO, L. V., FREIRE, D. M. G., e NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim Nova**. 36, n. 6. 2013.

ARECHABALA, B., COIFFARD, C., RIVALLAND, P., COIFFARD, L. J. M., & ROECK-HOLTZHAUER, Y. D. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. **J Appl Toxicol**, 19(3), p.163–165. 1999.

BARBOSA, F. G. Influência da adição de óleo de soja na produção de biossurfactante por *Scheffersomyces shehatae* utilizando meio de cultivo a base de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar. **Tese (doutorado)**. Universidade de São Paulo, escola de engenharia de Lorena, Lorena – SP, 2021.

BARBOSA, F.G.; MARCELINO, P.R.F.; LACERDA, T.M.; PHILIPPINI, R.R.; GIANCATERINO, E.T.; MANCEBO, M.C.; dos SANTOS, J.C.; da SILVA, S.S. Production, Physicochemical and structural characterization of a bioemulsifier produced in a culture medium composed of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate and soybean oil in the context of biorefineries. **Fermentation**. 8, 61, 2022.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol**, 30, n. 3, p. 257–262, 2012.

BENTO, B. S. Fotoenvelhecimento cutâneo: processo/produtos. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2015.

BERA, A.; MANDAL, A. Microemulsions: a novel approach to enhanced oil recovery: a review. **J Pet Explor Prod Technol**. 5, p. 255-268, 2015.

BEZERRA, K. G. O.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARRUBBO, L. A. Saponins and Microbial Biosurfactants: Potential Raw Materials for the Formulation of Cosmetics. **Biotechnol. Prog.** 34, n. 6, 2018.

BHATTACHARYA, B.; GHOSH, T. K.; & DAS, N. Application of bio-surfactants in cosmetics and pharmaceutical industry. **Sch. Acad. J. Pharm**, 6(7), p.320-329. 2017.

BIDE, Y.; FASHAPOYEH, M.A.; SHOKROLLAHZADEH, S. Structural investigation and application of Tween 80-choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination. **Sci Rep** 11. 2021.

BIONE, A. P. M. Produção de biossurfactante por *syncephalastrum racemosum* UCP 1302 utilizando substratos agroindustriais e monitoramento computadorizado da temperatura. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade

Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 752, de 19 de setembro de 2022.

BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: Concepts and applications. **Pigment Cell Melanoma Res**, 24, n. 1, p. 35–50, 2011.

BUDAI P.; KORMOS, É.; BUDA, I.; SOMODY, G.; LHEL, J. Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products. **Toxicol In Vitro**, 74. 2021.

BUENO, S. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. **Tese (doutorado)**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, SP. 2008.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; CRUZ, C. H. G. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Quim Nova** 33 (7). 2010.

BUGAY, C. Biossurfactante produzido por Bacillus sp.: estudos de produção e caracterização. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Federal do Paraná. 2009.

BYRD, A.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. The human skin microbiome. **Nat Rev Microbiol** 16, p.143–155 (2018).

CARLI, B. Creating micellar water. **Institute of Personal Care Science**. 28 jun. 2015.

CARRULO, D. C. Cosméticos naturais e sustentáveis: uma tendência expressa em rotulagem e certificação. **Dissertação (mestrado)**, Universidade Beira Interior. 2020.

CASTRO, D. Micellar Water Characterization: A Laser Scattering Application. **Brookhaven Instruments**. 2019.

CEREZZO, B. I. Nuevas tendencias em dermofarmacia: el agua micelar, análisis de composición y consumo. **(Trabalho de Conclusão de Curso)**. Universidad Complutense, 2017.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor, Rio Grande**, 13: p.85-103. 2003.

CONFORTI, C.; GIUFFRIDA, R.; FDDA, S.; FAI, A.; ROMITA, P.; ZALAUDEK, I.; DIANZANI, C. Topical dermocosmetics and acne vulgaris. **Dermatol Ther**, 2021.

CORNÉLIO, M. L.; ALMEIDA, E. C. C. Decifrando a composição dos cosméticos: riscos e benefícios. Uma visão do consumidor sobre o uso de produtos cosméticos. **Braz J Dev**, 6, n. 5, p. 30563-30575, 2020.

Cosmos-Standard. Manual de Controle Referencial COSMOS Requisitos para acreditação e certificação, Versão 3. **Brussels**, 2018.

DA SILVA, I. A. Sobremesa farinácea tipo cupcake utilizando biossurfactante como emulsificantes. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Pernambuco. 2020.

DAL-BÓ, A. G. Associação de micelas mistas de surfactantes aniônicos com polímero hidrofobicamente modificado etil(hidroxietil) celulose (EHEC) **Dissertação (mestrado)**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. **Editora Edgard Blucher Ltda**. Cap 1. p. 1-19. 2011.

DINIZ, C. C. Síntese e caracterização de surfactantes zwitteriônicos derivados de triazol. 2019. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2019.

DRAELOS Z, HORNBY S, WALTERS R.M, APPA Y. J. Hydrophobically modified polymers can minimize skin irritation potential caused by surfactant-based cleansers. **J Cosmet Dermatol**. p. 314-21. 2013.

DRAELOS, Z. D. The science behind skin care: Cleansers. **J Cosmet Dermatol** p. 17:8–14. 2018.

Ecocert. Statement on ISO 16128-2:2017.

FELIPE, L. O; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química e Sociedade**, 39, N° 3, p. 228-236, São Paulo ,2017.

FENIBO, E. O.; DOUGLAS, S. I.; STANLEY, H. O. A Review on Microbial Surfactants: Production, Classifications, Properties and Characterization. **J Adv Microbiol** 18(3): 1-22, 2019.

FERNANDES, N. A. T.; SIMÕES, L. A.; DIAS, D. R. Comparison of Biodegradability, and Toxicity Effect of Biosurfactants with Synthetic Surfactants. **Advancements in Biosurfactants Research**. Springer, Cham. 2023.

FERNANDES, T.C.C. Investigação dos Efeitos Tóxicos do Biossurfactante Ramnolipídio e suas Implicações Quando Usado na Biorremediação de Águas Contaminadas por Petróleo. **Ph.D. Tese**, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, 2011.

FERREIRA, A.; VECINO, X.; FERREIRA, D.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B.; RODRIGUES, L. R. Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. **Colloids Surf B Biointerfaces**. 155. p. 522-529, 2017.

FLOR, J.; MAZIM, M. R., FERREIRA, L. A. Cosméticos Naturais, Orgânicos e Veganos. **Cosmetics & Toiletries**, 31, Brasil. 2019.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. Cosméticos: A Química da beleza. **Net. Sala de Leitura**. Rio de Janeiro, 2009.

GUDIÑA, E.J. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Front Microbiol**, 6, p.59, 2015.

IBD. Diretrizes para a certificação de produtos cosméticos e higiene pessoal. 8ª Edição. 2022

ICCVAM-recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. **National Toxicology Program**. 2010.

JENA, G.; DUTTA, K.; DAVEREY, A. Surfactants in water and wastewater (greywater): environmental toxicity and treatment options. **Chemosphere**, 341. 2023.

KIM, E. J.; KONG, B. J.; KNOW, S. S.; JANG, H. N.; PARK, S. N. Preparation and characterization of W/O microemulsion for removal of oily make-up cosmetics. **Int J Cosmet Sci**, 36, 606–612. 2014

KLIMASZEWSKA, E.; WIECZOREK, D.; LEWICKI, S.; STELMASIAK, M.; OGORZALEK, M.; SZYMANSKI, Ł.; TOMASIUK, R.; MARKUSZEWSKI, L. Effect of New Surfactants on Biological Properties of Liquid Soaps. **Molecules**, 27, 5425. 2022.

KNOTH A, D.; RINCÓN-FONTÁNA, M.; STAHLA, P-L.; PELIKHA, O.; ECKERTA, R-W.; DIETRICH, H.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B.; KECKA, C. M. Evaluation of a biosurfactant extract obtained from corn for dermal application. **Int J Pharm** p.225–236. 2019.

KUME, G.; GALLOTTI, M.; NUNES, G. Review on Anionic/Cationic Surfactant Mixtures. **J Surfactants Deterg**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2008.

LI, S.; PI, Y.; BAO, M.; ZHANG, C.; ZHAO, D.; LI, Y.; LU, J. Effect of rhamnolipid biosurfactant on solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mar Pollut Bull**, 101(1), p. 219–225. 2015.

LOURITH, N. KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **Int J Cosmet Sci**, 31, p. 255-261. 2009.

LÜEPKE, N.P., 1985. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food Chem Toxicol**. 23, p. 287–291.

MANIASSO, N; Ambientes Micelares em Química Analítica. **Quim Nova**, 24, p. 87-93. 2001.

MARCELINO, P.R.F. Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo. Escola de engenharia de Lorena, Lorena, 2016.

MARINHO, PS da S.; SILVA, RR da.; LUNA, JM de. Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, 11, n. 12, 2022.

MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. **Int J Mol Sci**, 16, n. 1, p. 68–90, 2015.

MARQUES, A.M.; PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; ESPUNY, M.J. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chem Phys Lipids**, 2009.

MARTINS, R. C. et al. Multivariate analysis of nutritional parameters required for the submerged cultivation of three coprinaceous fungi for biosurfactant production. **Ciência e Agrotecnologia [online]**, 45. 2021.

MARTO, J.; GOUVEIA, L. F.; GONÇALVES, L.; CHIARI- ANDRÉO, B. G.; ISAAC, V.; PINTO, P.; OLIVEIRA, E.; ALMEIDA, A. J.; RIBEIRO, H. M. Design of novel starch-based Pickering emulsions as platforms fo skin photoprotection. **J Photochem Photobiol**, 162, p. 56–64. 2016.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Peptide Science**, 104, n. 3, p. 129-147, 2015.

MOLDES, A. B.; LÓPEZ, L. R.; FONTÁN, M. R.; PRIETO, A. L.; VECINO, X.; CRUZ, J. M. Synthetic and Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants in the Cosmetic Industry: An Overview. **Int J Mol Sci**. 2021.

MONTEIRO, A.S.; COUTINHO, J.O.P.A.; JÚNIOR, A.C.; ROSA, C.A.; SIQUEIRA, E,P.; SANTOS, V.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. **J Basic Microbiol**, 49, p. 553–563, 2009.

MOREIRA, L. M.; LYON, J. P. Surfactantes iônicos e não-iônicos: micelas, micelas reversas e sistemas micro heterogêneos. **PUBVET**, v. 16, p. 207, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J Immunol Methods**, 65: p. 55–63. 1983.

MUNHOZ, A. J.; ROCHA, L. S. C. Desenvolvimento de uma formulação de água micelar com extrato de *Galdieria sulphuraria*. **(Trabalho de Conclusão de Curso)**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), 2021.

MURPHREE, R. W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics of North America**, 52, n. 3, p. 405–417, 2017.

MYRES, D. Surfactant Science and Technology. **John Wiley & Sons, Inc**. 2006.

NASCIMENTO, S. M. S. Caracterização Termo-Óptica de Surfactantes Catiônicos. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Federal de Alagoas. 2018.

Natruel. Natruel Label: requirements to be met by natural and organic cosmetics 3.9. Brussels, 2021.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim Nova**, 25(5), p.772-776, 2002.

OHADI, M.; DEGHANNOUDEH, G.; FOROOTANFAR, H.; SHAKIBAIE, M.; RAJAEI, M. Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behavior of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. **Int J Biol Macromol**, 112, 712–719. 2018.

OLIVEIRA, T. S.; SANTOS, S. C. dos; SILVA, S. C.; CAMPOS, A. C. V. Atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Pseudomonas* sp. CCMICS 105. **Scientia Plena**, [S. l.], 18, n. 1, 2022.

PAKKANG, N.; URAKI, Y.; KODA, K.; NITHITANAKUL, M.; CHAROENSAENG, A. Preparation of water-in-oil microemulsion from the mixtures of castor oil and sunflower oil as makeup remover. **J Surfact Deterg.** 2018.

PÉREZ-RIVERO, C.; LÓPEZ-GÓMEZ, J. P. Unlocking the Potential of Fermentation in Cosmetics: A Review. **Fermentation**, v. 9, n. 5, p. 463, 2023.

PIRES, P. A. R. Síntese e propriedades de soluções de tensoativos catiônicos derivados de (3- Dimetilaminopropil) amidas de ácido carboxílicos. **Tese (doutorado)**. 2002

REIS, R. C. N. Síntese de Surfactantes Derivados da D-ribonolactona. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil, 2007.

RIBEIRO, B. G. Biossurfactate produzido por leveduras para aplicação na formulação de biscoito tipo cookie. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

RIBEIRO, B.G; GUERRA C. J. M; SARUBBO, L. A. Potencial aplicação alimentar de um biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Bioeng. Biotecnologia**, 2020.

RIQUELME, N.; ARANCIBIA, C. Obtaining nanoemulsions using quillay saponins as a substitute for a synthetic surfactant. **Mundo nano**, 12 n.23. 2020.

RIVERO, M. N.; LENZE, M.; IZAGUIRRE, M.; DAMONTE, S. H. P.; AGUILAR, A.; WIKINSKI, S.; GUTIÉRREZ, M. L. Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. **Food Chem Toxicol**,153. 2021.

ROCHA, P. M. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ L, LÓPEZ-PRIETO A, LOPEZ-ÁLVAREZ M, PÉREZ-DAVILA S, SERRA J, GONZÁLEZ P, CRUZ J.M, MOLDES A.B.

Characterization and Cytotoxic Effect of Biosurfactants Obtained from Different Sources. **ACS Omega**. 2020.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L.; RINCON-FONT, M.; VECINO, X. CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Preservative and irritant capacity of biosurfactants from different sources: A comparative study. **J Pharm Sci**, 1-9. 2019

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients – Sixth edition. **Pharmaceutical Press**. 2009.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. de C.; NETO, A. A. D.; MACIEL, M. A.M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica**, RJ: EDUR, 25, n.1-2, p. 73-85, 2006.

SANTOS, D.K.F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **Int J Mol Sci**, 17(3), p.401, 2016.

SANTOS, E. M. da S. Produção de biosurfactante por cãndida sphaerica UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Católica de Pernambuco. 2019.

SANTOS, E. M. da S. S.; LIRA, I. R. A. da S; MEIRA,H. M; AGUIAR, J. dos S; RUFINO, R. D; ALMEIDA, D. G; CASAZZA, A. A; CONVERTI, A; SARUBBO, L. A; LUNA, J. M. Enhanced Oil Removal by a Non-Toxic Biosurfactant Formulation. **Energies**, 14, 467. 2021.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D. Application of a Biosurfactant Produced in Low-cost Substrates in the Removal of Hydrophobic Contaminants. **The Italian Association of Chemical Engineering Online**. 43, 2015.

SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. **Trends in microbiology**, 21, n. 12, p. 660-668, 2013.

SHARMA, V.; SINGH, D.; MANZOOR, M.; BANPURKAR, A. G.; SATPUTE, S. K.; SHARMA, D. Characterization and cytotoxicity assessment of biosurfactant derived from Lactobacillus pentosus NCIM 2912. **Braz J Microbiol** 53, p. 327–340. 2022.

SHIMIZU, H. **Shimizu's Dermatology**. 2. ed. India: Wiley Blackwell, 2016.

SHOEB, E.; AKHLAQ, F.; BADAR, U.; AKHTER, J.; IMTIAZ, S. Classification and industrial applications of biosurfactants. **Academic Research International**, 4(3), 243. 2013.

SILVA, G.K.B. Isolamento, identificação, Caracterização e Potencial Biotecnológico na Produção de Biosurfactante por *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1355 Isolado de Solo da Caatinga-PE, Brasil. **Ph.D. Tese**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2015.

SILVA, N. T. P. Determinação da concentração micelar crítica a partir de medidas de condutividade e tensão superficial. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal Sul e Sudeste do Pará. 2014.

SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA J.M.; SALGUEIRO A. A.; CAMPOS-TAKAKI G.M.; LEITE, L.F.C. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995, *Process Biochemistry*. 2008.

TAVASZI, J. BUDAI, P. The use of HET-CAM test in detecting the ocular irritation. **Commun Agric Appl Biol Sci**. 2007; 72(2):137-41

TEOTIA, A. K.; SAMI, H.; KUMAR, A. Thermo-responsive polymers. Switchable And Responsive Surfaces and Materials For Biomedical Applications, **Zhang Z., editor**.p.3-43, 2015.

TESTON, A. P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. Envelhecimento cutâneo: Teoria dos radicais livres e tratamento visando a prevenção e rejuvenescimento. **UNINGÁ Review**, 1, p.71-84, 2010.

THAIPHANIT, S.; ANPRUNG, P. Physicochemical and emulsion properties of edible protein concentrate from coconut (*Cocos nucifera* L.) processing by-products and the influence of heat treatment. **Food Hydrocolloids**,52, p.756-765, 2016.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **J Tissue Viability**, 26, n. 1, p. 37–46, 2017.

VARVARESOU, A.; LAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. **Lett Appl Microbiol** 61, 214—223, 2015.

VECINO, X.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Crit Rev Biotechnol**, 37(7):911-923. 2017.

VIEIRA, L. M A. L. Comparação dos diferentes protocolos do ensaio da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) pela avaliação do potencial irritante ocular de substâncias químicas. **Dissertação (mestrado)**. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz. 2020.

VIERA, L. M. D. A. L., SILVA, R. S., da SILVA, C. C., PRESGRAVE, O. A. F., & BOAS, M. H. S. V. Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. **Toxicol In Vitro**, 78, 105255. 2022.

VOULGARIDOU, G.-P.; MANTSO, T.; ANESTOPOULOS, I.; KLAVARIS, A.; KATZASTRA, C.; KIOUSI, D.-E.; MANTELA, M.; GALANIS, A.; GARDIKIS, K.; BANAT, I.M.; GUTIERREZ, T.; SALEK, K.; EUSTON, S.; PANAYIOTIDIS, M. I.; PAPPA, A. Toxicity profiling of biosurfactants produced by novel marine bacterial strains. **Int J Mol Sci**, 22, 2383. 2021.

WALTERS, R. M.; MAO, G.; GUNN, E.; HORNBY, S. Cleansing Formulations That Respect Skin Barrier Integrity. **Dermatol Res Pract**, 2012, 2012.

WEBER, N.; SCHWABE, K.; SCHEMPP, C. M. Effect of a botanical cleansing lotion on skin sebum and erythema of the face: A randomized controlled blinded half-side comparison. **J Cosmet Dermatol**. 2018.

WELLER, R. et al. **Chapter 2: The function and structure of the skin**, p. 19-42, 2008.