

ALESSANDRA CRISTINE NOVAK

POTENCIAL COSMÉTICO DOS ESPOROS DE *Ganoderma lucidum*

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2013

PREFÁCIO

Este trabalho trata dos estudos de Doutorado da aluna da Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Alessandra Cristine Novak Sydney. Foi um estudo de triagem das principais propriedades do extrato dos esporos do fungo *Ganoderma lucidum*, tradicionalmente conhecido por suas propriedades e benefícios à saúde humana. Os estudos voltaram-se à aplicação desse extrato em produtos cosméticos analisando a sua compatibilidade e algumas de suas propriedades.

Por se tratar de um estudo complexo e com etapas muito distintas entre si, verificou-se a necessidade da divisão do conteúdo em capítulos que reunissem dados e informações congruentes, de forma a facilitar a discussão dos resultados e a posterior leitura e interpretação.

No Capítulo 1 os esporos de *Ganoderma lucidum* foram analisados em relação à sua composição geral, e as condições que determinavam a obtenção do extrato mais promissor para a aplicação em produtos cosméticos foram estabelecidas. Assim, explorou-se o potencial do extrato em relação ao seu potencial antioxidante/antienvhecimento. Além disso, esse capítulo traz uma extensa revisão bibliográfica a respeito do micro-organismo analisado em relação às suas propriedades e aplicações.

Já no Capítulo 2 foi avaliado o potencial antimicrobiano do extrato, buscando-se assim ações adicionais e que pudessem ser atribuídas ao produto final, agregando ainda mais valor ao mesmo. A sabedoria popular, principalmente a oriental, atribui inúmeras propriedades ao *Ganoderma*, e, portanto, torna-se interessante buscar comprovar cientificamente algumas dessas propriedades.

De posse da caracterização em termos de composição e propriedades, concluiu-se ser primordial, antes de aplicar o extrato em uma formulação cosmética, estabelecer limites de toxicidade do extrato utilizando *Artemia salina*, sendo os resultados encontrados no capítulo 3. Assim, para estudos posteriores de toxicidade em mamíferos e seres humanos, já se tem um estudo inicial que restringe as faixas

de concentração a serem testadas, diminuindo assim o número de indivíduos necessários para a realização do teste.

Para esse trabalho, o estudo de toxicidade foi importante também para determinar a concentração segura do extrato nas formulações finais cosméticas desenvolvidas. Essas formulações foram testadas em relação à sua estabilidade físico-química e microbiológica, avaliando-se a compatibilidade entre fórmula e princípios ativos, o que foi retratado no Capítulo 4. Em seguida, no capítulo 5, procedeu-se ao *Challenge Test*, teste específico para produtos cosméticos que avalia a ação de determinada substância contra contaminações propositalis de produtos cosméticos por microrganismos específicos.

Desta forma está organizado esse documento, que traz dentro de cada capítulo conclusões específicas, e ao final do documento, uma lista com as perspectivas para trabalhos futuros e as referências utilizadas em todo o estudo.

RESUMO

Ganoderma lucidum é um basidiomiceto que vem sendo consumido pelo ser humano há milênios. Muitos são os benefícios à saúde atribuídos ao seu consumo, o que está sendo comprovado por diversos estudos científicos. Todas as partes do fungo (micélio, corpos de frutificação e esporos) e seus produtos demonstram bioatividade, incluindo um elevado potencial antioxidante. Nesse contexto, esse trabalho trata dos estudos preliminares sobre o potencial cosmético dos esporos de *Ganoderma lucidum*. Inicialmente, várias extrações foram realizadas visando a obtenção de extrato com alto potencial antioxidante e alto teor de compostos fenólicos. O melhor resultado foi obtido utilizando-se água como solvente em uma proporção de 1:16 (esporo:solvente), atingindo IC₅₀ de 36,5 mg/ml e teor de compostos fenólicos de 2,25 mg/ml em equivalente de ácido gálico. O extrato foi analisado e é composto por açúcares (2,66 g/l de glucose e 0,52 g/l de maltose), proteínas (0,86 g/l), lipídeos (6,61%) e cinzas (0,0037%). Devido ao grande interesse em ativos multi-propósito o potencial antimicrobiano desse extrato foi analisado e resultou na eficaz inibição de crescimento e esporulação de *Aspergillus niger*. A etapa seguinte consistiu na avaliação do potencial citotóxico, realizado através do teste de mortalidade de *Artemia salina*, chegando-se a um DL₅₀ de 6,48g/L. Para validar a aplicabilidade do extrato de esporos de *G. lucidum* como ativo cosmético foi realizado um ensaio de estabilidade acelerada adicionando-o a um creme e um gel-creme. Nenhuma modificação contundente foi notada, a não ser um leve amarelamento da fórmula exposta à luz, observado apenas no final do teste e que indica que o produto deve ser mantido ao abrigo da luz. Finalmente, foi realizado o *Challenge Test*, que verifica a eficácia do sistema conservante de uma formulação cosmética por meio da adição proposital de uma contaminação por bactérias, fungos e leveduras. Os resultados mostraram que o extrato possui um importante caráter preservante quando comparado aos cremes contendo agentes preservantes químicos, podendo atuar sinergicamente ou isoladamente como agente conservante em uma formulação cosmética. Neste contexto, o extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* apresentou um grande potencial para uso pela indústria cosmética como agente antioxidante e antimicrobiano, além de mostrar compatibilidade com fórmulas cosméticas e baixa toxicidade.

PALAVRAS CHAVE: *Ganoderma lucidum*, Antioxidante, Cosméticos, Antimicrobiano, Teste de Estabilidade, Citotoxicidade, *Challenge Test*

ABSTRACT

Ganoderma lucidum is a basidiomycete that has been consumed by humans for years. There are many health benefits attributed to its consumption, which is been proved by numerous scientific studies. All parts of the fungus (mycelium, fruiting bodies and spores) and some of its products demonstrate bioactivity, including a high antioxidant potential. In this context, this paper deals with the preliminary studies on the potential cosmetic spores of *Ganoderma lucidum*. Initially, several extractions were performed in order to obtain extracts with high antioxidant activity and high phenolic content. The best result was obtained by using water as a solvent in a ratio of 1:16 (spore: solvent) reaching IC50 of 36.5 mg / ml and phenolic content of 2.25 mg / ml gallic acid equivalent . The extract was analyzed and comprises sugars (2.66 g / l of glucose and 0.52 g / l maltose), proteins (0.86g / l), lipids (6,61%) and ash (0 , 0037%). Due to the great interest in active multi-purpose antibacterial potential this extract was analyzed and resulted in effective inhibition of growth and sporulation of *Aspergillus niger*. The next step was to evaluate the cytotoxic potential, conducted by testing the mortality of *Artemia salina*, coming to an LD50 of 6.48 g/L. To validate the applicability of the extract of spores of *G. lucidum* as cosmetic active an accelerated stability test were carried out by adding the extract to a cream and to a gel-cream. No change was noted but a slight yellowing of the formula exposed to light, which was observed only at the end of the test, indicating that the product should be kept away from light. Finally, the Challenge Test was performed to verify the effectiveness of the preservative system in the cosmetic formulation. The results showed that the extract has an important preservative characteristic when compared to creams containing chemical preservatives and may act synergistically or alone as a preservative in a cosmetic formulation. The conclusion is that the extract of *Ganoderma lucidum* spores showed great potential for use in the cosmetic industry as antioxidant and antimicrobial agents, showing compatibility with cosmetic formulas and low toxicity.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, Antioxidant, Cosmetics, Antimicrobial Test, Stability, Cytotoxicity, Challenge Test

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ILUSTRAÇÃO DAS APLICAÇÕES E PROPRIEDADES DE <i>Ganoderma lucidum</i>	2
FIGURA 2: <i>Ganoderma lucidum</i>	3
FIGURA 3: ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE BASIDIOCARPOS, INCLUINDO-SE <i>Ganoderma lucidum</i>	4
FIGURA 4: ESTRUTURAS DE ALGUNS ÁCIDOS GANODÉRICOS JÁ IDENTIFICADOS. EXTRAÍDO DE Liu et al, 2006	6
FIGURA 5: MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> . (AMPLIAÇÃO: 4500X, LARGURA DA IMAGEM: 28,5 MICRÔMETROS, BARRA: 5 MICRÔMETROS)	13
FIGURA 6: IMAGENS OBTIDAS POR MEV DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> LISADOS SOB PRESSÕES DE OPERAÇÃO DIFERENTES. BARRA=6 µM: (A) INTACTAS, (B) 35 MPA, 2 h, (C) 35 MPA, 3 h, (D) 30 MPA, 4 h; (E) MPA 33, 4 h, E (F) MPA 35, 4 h	14
FIGURA 7: DIFERENTES TAMANHOS DE PELLETS DE <i>G. LUCIDUM</i> OBTIDOS COM A ADIÇÃO DE POLÍMEROS AO CULTIVO, VISANDO A MENOR GRANULOMETRIA POSSÍVEL: CONTROLE (SEM ADIÇÃO DE ÁGAR) (A); ADIÇÃO DE 0,1% DE ÁGAR (B); ADIÇÃO DE 0,2% DE ÁGAR (C); ADIÇÃO DE 0,4% DE ÁGAR (D)	15
FIGURA 8: ETAPAS DE EXTRAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> . ESPOROS; ESPOROS MISTURADOS COM O SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO EM FRASCO DE ERLNMEYER; EXTRATO BRUTO CENTRIFUGADO (VER ESPOROS AO FUNDO E SOBRENADANTE IMPURO ACIMA); EXTRATO SEPARADO DOS ESPOROS, AINDA COM IMPUREZAS; EXTRATO SENDO TRIPLAMENTE FILTRADO EM FILTRO DE PAPEL; EXTRATO PURIFICADO E PRONTO PARA ANÁLISE OU INCORPORAÇÃO	21
FIGURA 9: ÓLEO PRESENTE NO EXTRATO AQUOSO DE ESPOROS DE <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (GOTÍCULAS SOBRENADANTES)	34
FIGURA 10: PLACAS DE CRESCIMENTO DE <i>Escherichia coli</i> (a), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (b), <i>Staphylococcus aureus</i> (c), <i>Candida albicans</i> (d) e <i>Aspergillus niger</i> (e) FRENTE AO EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i> , COM DESTAQUE AO HALO E INIBIÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE <i>A. niger</i> (f).	47
FIGURA 11: APARATO MONTADO PARA A ECLOSÃO DOS CISTOS DE <i>A. salina</i>	54
FIGURA 12: PLACA DE ELISA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i> , DEPOIS DE INSERIDOS OS NÁUPLIOS	55
FIGURA 13: REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS DE CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i> VERSUS PROBITS DO NÚMERO DE INDIVÍDUOS DE <i>A. salina</i> MORTOS	57
FIGURA 14: CREMES NUMERADOS DE 1 A 5 SEM EXTRATO, NOMEADOS BRANCOS (A); CREMES NUMERADOS DE 6 A 10 COM EXTRATO, NOMEADOS AMOSTRA (B); CREMES-GEL NUMERADOS DE 1 A 5 SEM EXTRATO, NOMEADOS BRANCOS (C); CREMES-GEL NUMERADOS DE 6 A 10 COM EXTRATO, NOMEADOS AMOSTRA (D)	70
FIGURA 15: DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE DOS CREMES E GÉIS	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ABUNDÂNCIA RELATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS ENCONTRADOS NO MICÉLIO DE <i>Ganoderma lucidum</i> (EXTRAÍDO DE LIU ET AL, 2007)	11
TABELA 2 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> COM ETANOL	27
TABELA 3 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> COM METANOL	28
TABELA 4 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> COM ACETONA	29
TABELA 5: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> COM ÁGUA	29
TABELA 6: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM EXTRAÇÃO SEQUENCIAL	31
TABELA 7: ANÁLISE COMPARATIVA DOS MELHORES RESULTADOS DE CADA EXTRAÇÃO PARA A ESCOLHA DO MELHOR SOLVENTE PARA O PREPARO DE EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i>	32
TABELA 8: COMPOSIÇÃO DOS ESPOROS DE <i>G. lucidum</i> ANTES E DEPOIS DA EXTRAÇÃO AQUOSA	33
TABELA 9: COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES PRESENTES NO EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i>	35
TABELA 10: COMPOSIÇÃO GERAL DO EXTRATO DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidium</i>	35
TABELA 11: CONCENTRAÇÕES EQUIVALENTES DE EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i>	44
TABELA 12: HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS TESTADOS FRENTE AO EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i>	45
TABELA 13: COMPOSIÇÃO DA ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL UTILIZADA NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i> FRENTE A <i>Artemia salina</i>	54
TABELA 14: CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO E TAXA DE MORTE DOS NÁUPLIOS, ACOMPANHADO DOS SEUS RESPECTIVOS VALORES EM TERMOS DE LOG E PROBIT	56
TABELA 15: AVALIAÇÃO DE ASPECTO, COR E ODOR DOS CREMES CONTROLE E GANODERMA DURANTE O TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA	75
TABELA 16: AVALIAÇÃO DE ASPECTO, COR E ODOR DOS GÉIS CONTROLE E GANODERMA AO LONGO DO TEMPO DA AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA (90 DIAS)	76
TABELA 17: VALORES DE PH MÉDIO DOS CREMES DURANTE O TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA	77
TABELA 18: VALORES DE PH MÉDIO DOS GÉIS DURANTE O TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA	78
TABELA 19: ATIVIDADE DE ÁGUA DOS CREMES CONTROLE (A) E GANODERMA (B) AO LONGO DO TEMPO DE ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA	79

TABELA 20: ATIVIDADE DE ÁGUA DOS CREMES-GÉIS CONTROLE (A) E GANODERMA (B) AO LONGO DO TEMPO DE ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA	79
TABELA 21: VALORES DE ESPALHABILIDADE PARA CADA CREME EM CADA CONDIÇÃO PARA CREMES E GÉIS, GANODERMA E CONTROLE; VALORES MÉDIOS CONSIDERANDO OS 90 DIAS DE EXPERIMENTO	81
TABELA 22: COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS PARA EXECUÇÃO E INTERPRETAÇÃO DO <i>CHALLENGE TEST</i> POR DIFERENTES ENTIDADES	85
TABELA 23: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO CREME UTILIZADO PARA O <i>CHALLENGE TEST</i>	88
TABELA 24: RESULTADOS DA CONTAGEM MICROBIANA NOS QUATRO CONJUNTOS DE CREMES TESTADOS (COMBINAÇÕES COM E SEM CONSERVANTE E COM E SEM EXTRATO DE ESPOROS DE <i>G. lucidum</i>) PARA CADA MICRORGANISMO AVALIADO (<i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)	91
TABELA 25: RESULTADOS DA CONTAGEM MICROBIANA REPRESENTADA EM TERMOS DE “LOG”	92
TABELA 26: REDUÇÃO DO LOG DA CONTAMINAÇÃO SOFRIDA POR CADA MICRORGANISMO EM CADA CONJUNTO DE CREMES, ANALISANDO SE ESTÁ DE ACORDO COM A NORMA DA ABC (OK) OU NÃO (NÃO).	94

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: PRINCIPAIS ATIVIDADES JÁ RELATADAS DE EXTRATOS DE <i>G. lucidum</i> (ESPOROS, MICÉLIO E POLISSACARÍDEO)	35
QUADRO 2: COMPOSIÇÃO DO CREME E CREME GEL UTILIZADOS NOS TESTES DE ESTABILIDADE	82

LISTA DE SIGLAS

AG – Ácidos Ganodéricos

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

TLC – Thin Layer Chromatography

GSL – Ganoderma Spore Lipid

MEV – Micrografia Eletrônica de Varredura

NIR – Near Infrared Reflectance Spectroscopy

LPB – Laboratório de Processos Biotecnológicos

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

UFC – Unidade Formadora de Colônia

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ICS – International Collaborative Study

US FDA – United States Food and Drug Administration

CIM – Concentração Inibitória Mínima

ABC – Associação Brasileira de Cosmetologia

COLIPA – European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association

USP – United States Pharmacopeia

LISTA DE ABREVIATURAS

g – grama

l – litro

Da – Dalton

h – hora

m – metro

Pa – Pascal

C/N – relação Carbono:Nitrogênio

rpm – rotações por minuto

min – minuto

IC₅₀ – concentração na qual 50% dos radicais livres são inibidos

pH – potencial hidrogeniônico

LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

® - marca registrada

‰ – por mil

°C – graus Celsius

SUMÁRIO

PREFÁCIO	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
Capítulo 1. Análise do Basidiomiceto <i>Ganoderma lucidum</i> em relação à sua composição e ao seu potencial cosmético	1
1. Introdução	1
1.1 <i>Ganoderma lucidum</i> e suas características	3
1.1.1 Composição.....	4
1.1.2 Triterpenóides	5
1.1.3 Açúcares e Polissacarídeos.....	7
1.1.4 Proteínas e Afins	9
1.1.5 Vitaminas, Minerais Essenciais e Ácidos Graxos.....	10
1.2 Os esporos de <i>Ganoderma lucidum</i> : um mistério a ser desvendado.....	13
1.3 Cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i>	13
1.4 Extrato de <i>Ganoderma lucidum</i> : caracterização, controle de qualidade e estabilidade	13
1.5 Aplicações e Propriedades.....	13
2. Objetivos.....	20
3. Metodologias	20
3.1 Extração para análises e obtenção de biocompostos	20
3.2 Escolha do Extrato.....	21
3.3 Analisador CNHS.....	22
3.4 Carboidratos	23
3.5 Proteína.....	23
3.6 Lipídios	24
3.7 Cinzas	24

3.8 Potencial Antioxidante	24
3.9 Teor de Compostos Fenólicos	25
4. Resultados e Discussão.....	25
4.1 Parâmetros de Extração dos Compostos Bioativos dos Esporos de <i>G. lucidum</i>	25
4.1.1 Extração única	25
4.1.2 Extração Sequencial.....	30
4.1.3 Escolha das Melhores Condições de Extração dos Esporos de <i>Ganoderma lucidum</i>	31
4.2 Caracterização do Extrato de esporos de <i>Ganoderma lucidum</i>	32
4.2.1 Composição Centesimal	32
4.3 Estabilização do extrato de esporos de <i>Ganoderma lucidum</i>	32
4.3.1 Análise microbiológica	32
5. Conclusão	37
Capítulo 2. Potencial Antimicrobiano do Extrato de Esporos de <i>Ganoderma lucidum</i>	38
1. Introdução	38
2. Objetivos	41
3. Materiais e Métodos	41
3.1 Controle de Turbidez para preparação do Inóculo	41
3.2 Preparo do Inóculo	42
3.3 Inoculação nas placas de teste.....	42
3.4 Aplicação dos Discos nas Placas de Ágar Inoculadas	43
3.5 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados	43
4. Resultados e Discussão	44
5. Conclusão	51
Capítulo 3. Citotoxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	52
1. Introdução	52

2. Objetivos.....	53
3. Materiais e Métodos.....	53
4. Resultados e Discussão.....	56
5. Conclusão.....	59
Capítulo 4. Formulação cosmética contendo extrato de esporos de <i>Ganoderma lucidum</i> e ensaios de estabilidade.....	60
1. Introdução	60
1.2 Estabilidade Preliminar	61
1.2.1 Ciclos de congelamento-descongelamento.....	61
1.2.2 Centrifugação	61
1.3 Estabilidade Acelerada	62
1.3.1 Aspecto	61
1.3.2 Cor e Odor.....	61
1.3.3 pH.....	61
1.3.4 Atividade de Água.....	61
1.3.5 Espalhabilidade	61
2. Objetivos	66
3. Material e Métodos.....	67
3.1 Estudos de Estabilidade	61
3.1.1 Estabilidade Preliminar	61
3.1.1.1 Ciclos de congelamento-descongelamento.....	61
3.1.1.2 Centrifugação	61
3.1.2 Estabilidade Acelerada	69
3.1.2.1 Aspecto, Cor e Odor	71
3.1.2.2 pH.....	71
3.1.2.3 Atividade de Água.....	71
3.1.2.4 Espalhabilidade	71

4. Resultados e Discussão	72
4.1 Escolha de Formulação	72
4.2 Teste de Estabilidade Preliminar e Acelerada	73
4.2.1 Estabilidade Preliminar	74
4.2.1.1 Ciclos de Congelamento-Descongelo	73
4.2.1.2 Centrifugação	74
4.2.2 Estabilidade Acelerada	74
4.2.2.1 Cor, Aspecto e Odor	74
4.2.2.2 pH.....	74
4.2.2.3 Atividade de Água.....	74
4.2.2.4 Espalhabilidade	80
5. Conclusão	82
Capítulo 5. <i>Challenge Test</i> de Formulação Cosmética contendo Extrato de Esporos de <i>Ganoderma lucidum</i>	83
1. Introdução	83
2. Objetivos	87
3. Materiais e Métodos.....	87
3.1 Preparo do inóculo.....	87
3.2 Inoculação nos cremes	88
4. Resultados e Discussão.....	89
5. Conclusão	96
Trabalhos Futuros	98
Referências.....	98

Capítulo 1. Análise do Basidiomiceto *Ganoderma lucidum* em relação à sua composição e ao seu potencial cosmético

1. Introdução

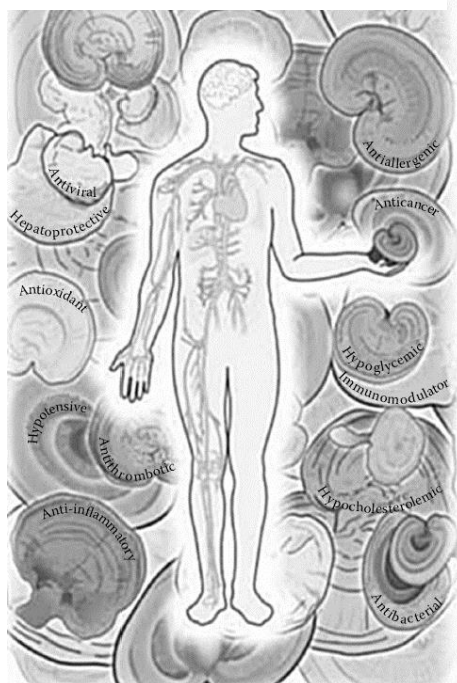
Com os crescentes avanços da ciência e tecnologia, o ser humano vem, com o passar dos séculos, alcançando níveis de longevidade cada vez maiores. Para disfrutar melhor esse tempo, com mais qualidade de vida, é incessante a busca do ser humano pelo seu bem-estar físico, mental, espiritual. Nesse contexto, busca-se prolongar a aparência e vitalidade da juventude, pois seria inútil um espírito jovem em um corpo que não aparente ou não possibilite os movimentos, prazeres e necessidades desse ser humano ativo e que busca o bem-estar.

Houve uma época em que se acreditava que moléculas sintéticas poderiam trazer incontáveis benefícios ao corpo humano; depois de provados inúmeros efeitos colaterais que algumas delas podem causar, a humanidade tem retornado às origens e buscado na natureza respostas para a longevidade que tanto buscam, seja em termos de alimentação, geração de energia, cuidados com a mente e com o corpo. Da cultura oriental vem a crença de que elementos da natureza trazem consigo a cura de doenças, energia, vitalidade, e muitas vezes, o segredo da vida, se não eterna, no mínimo muito longa.

Vários fungos têm sido relatados como potenciais para utilização em cosméticos seja na forma de cremes, pomadas ou loções, ou nutricosméticos, na forma de cápsulas ingeríveis. Diversas espécies como *Agaricus subrufescens*, *Choiromyces maeandriiformis*, *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus ulmarius*, *Lentinula edodes*, *Polyporus* spp., *Trametes versicolor*, dentre vários outros, tem sido utilizados por diversas culturas, sendo muito populares no oriente, onde acredita-se que são espécies portadoras do segredo da vida longa. Pela ciência, essas

espécies têm sido reportadas como fonte de moléculas antioxidantes, anti-idade, revitalizadoras ou clareadoras de pele, ou mesmo recomendadas para cuidados com os cabelos, dentre outras aplicações cosméticas e outras inúmeras aplicações em ciências da saúde devido ao seu potencial anticâncer, antimicrobiano e por possuir propriedades imunoprotetoras (Hyde et al, 2010).

FIGURA 1: ILUSTRAÇÃO DAS APLICAÇÕES E PROPRIEDADES DE *Ganoderma lucidum*.



Dentre esses fungos, destaca-se o *Ganoderma lucidum*, acreditado pelos povos do oriente como sendo o “Cogumelo da Longevidade”, sendo a ele atribuídas diversas funções (Figura 1). Vários autores já pesquisaram especificamente as suas aplicações, e vários artigos de revisão já foram escritos; a literatura acerca desse gênero e dessa espécie de basidiomiceto é extensa e vasta. Uma revisão ampla foi escrita por Paterson (2006), fonte detalhada sobre composição e aplicações específicas de produtos e extratos de *Ganoderma lucidum*. Nesse contexto, também de grande relevância é o trabalho de Silva (2004), que apresenta um compêndio com vários estudos das diversas frações e moléculas obtidas a partir de *G. lucidum* e as respostas celulares e fisiológicas obtidas com a sua ministração.

A revisão bibliográfica aqui apresentada é voltada especificamente aos aspectos importantes para o desenvolvimento desse trabalho, objetivando a caracterização de extratos de *Ganoderma lucidum* com propriedades úteis para a sua aplicação em produtos cosméticos.

1.1 *Ganoderma lucidum* e suas características

Ganoderma lucidum é capaz de degradar uma grande variedade de madeiras, sendo conhecido como um dos fungos da podridão da madeira, e encontrado naturalmente na forma de basidiocarpos, (Figura 2) coletado e processado em forma de alimentos e chás. É um fungo muito utilizado na cultura chinesa, sendo lá chamado de “Lingzhi”; a ele são atribuídas propriedades curativas para doenças do corpo e da mente (Paterson, 2006). Já no Japão o fungo é conhecido por “Rheishi” (Zhang et al, 2000); por ser raro na natureza, a sua exploração por extrativismo é insustentável (Sanodiya et al, 2009), sendo, nesse contexto, pesquisas acerca do seu cultivo controlado de crucial importância.



FIGURA 2: *Ganoderma lucidum*

Fonte:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/81/Ganoderma_lucidum_01.jpg/240px-Ganoderma_lucidum_01.jpg

Ganoderma lucidum apresenta várias etapas de crescimento e desenvolvimento, apresentando todas as etapas de desenvolvimento dos basidiocarpos. O ciclo completo de vida dos basidiocarpos está sistematizado na Figura 3. Nela é possível verificar que são liberados basidiósporos (ou simplesmente esporos) que germinam para formar hifas haplóides.

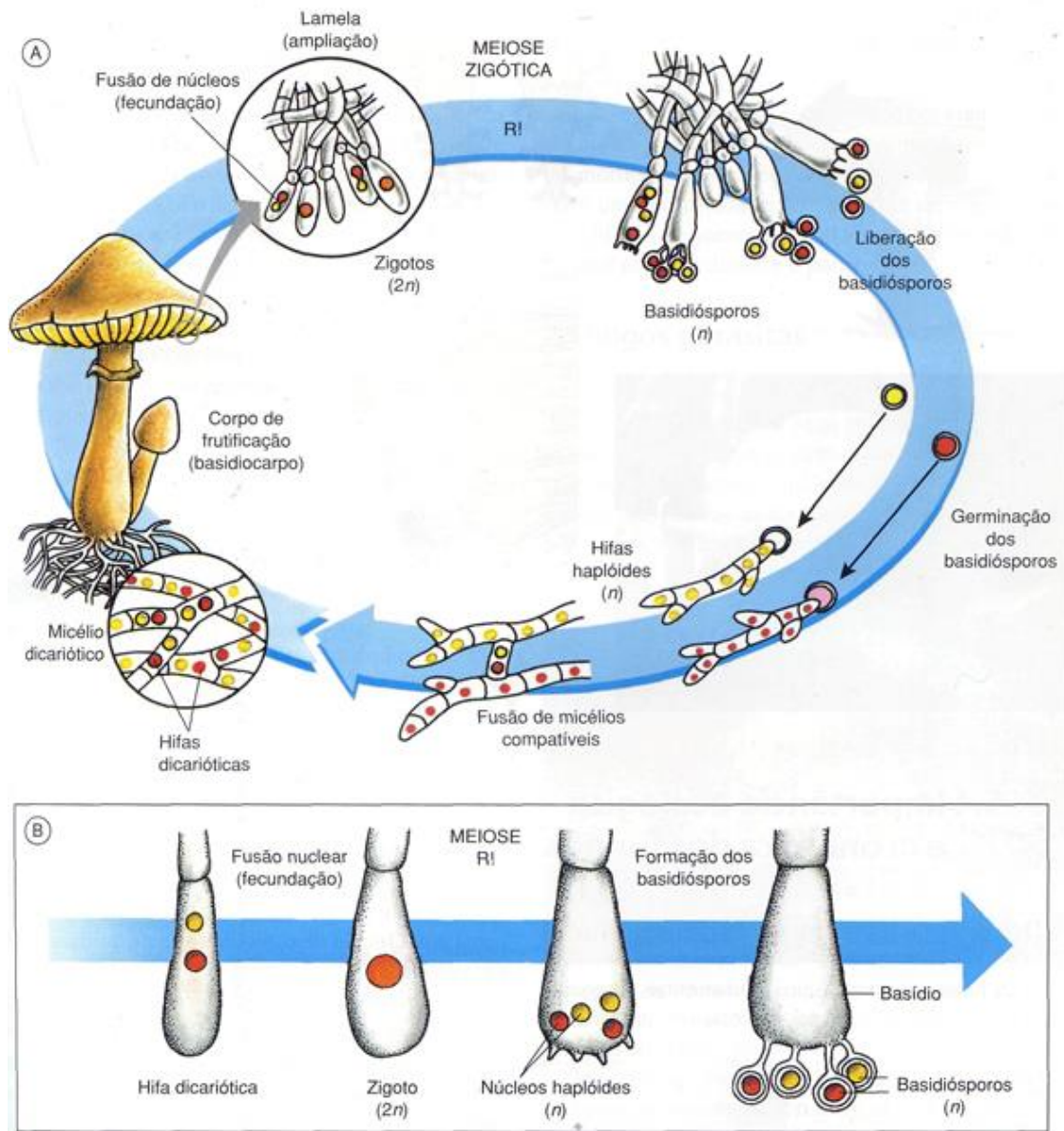


FIGURA 3: ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DE BASIDIOCARPOS, INCLUINDO-SE *Ganoderma lucidum*.

Fonte: <http://estudandoabiologia.files.wordpress.com/2012/10/basiodcarpo-1.jpg>

1.1.1 Composição

Mais de 400 compostos bioativos já foram isolados de *G. lucidum*, pertencentes às mais diversas classes, incluindo triterpenóides, polissacarídeos, nucleotídeos, esteroides, ácidos graxos, peptídeos e proteínas (Sanodiya et al, 2009). Dentre esses compostos, destacam-se os ácidos ganodéricos, uma série de compostos pertencentes à classe dos triterpenóides, possuindo as mais diversas estruturas, mas sendo produzidas a baixos níveis durante o crescimento do fungo (Shi et al, 2010). As duas substâncias ativas de *G. lucidum* mais reportadas como tendo atividades benéficas à saúde são os polissacarídeos e os triterpenóides (Chen et al, 2012).

Visando melhorar os baixos rendimentos de moléculas bioativas, já foi realizado o sequenciamento genético da espécie (Chen et al, 2012), o que está permitindo que sejam elucidadas várias vias metabólicas, inclusive da produção de enzimas lignolíticas e triterpenóides (Liu et al 2012). Isso tem sido feito especificamente identificando-se os genes altamente correlacionados com uma maior produção de ácidos ganodéricos (Shi et al, 2012) ou outras moléculas bioativas (Lin et al, 2009), o que pode permitir que esses genes possam ser isolados e/ou estimulados ou implantados em outros organismos de forma a obter maiores quantidades de tais moléculas bioativas.

1.1.2 Triterpenóides

Os triterpenóides vêm sendo estudados mais profundamente desde a década de 1980 e são metabólitos secundários (Shi et al, 2010). Especificamente, os obtidos a partir de *Ganoderma lucidum* foram chamados de Ácidos Ganodéricos (AG) e reportados a partir de 1988, época em que também se iniciou o estudo científico das suas propriedades (Lin et al, 1988). Aos poucos, os extratos foram sendo cada vez mais elucidados, o que fez com que mais AGs passassem a ser identificados com o passar do tempo (Hirotsu e Furuya, 1985). Atualmente estão descritos mais de 200 triterpenóides, incluindo formas de ácidos ganodéricos e seus derivados, possuindo as mais diversas atividades e aplicações (Shi et al, 2012; Liu et al, 2012). Alguns deles são representados na Figura 4.

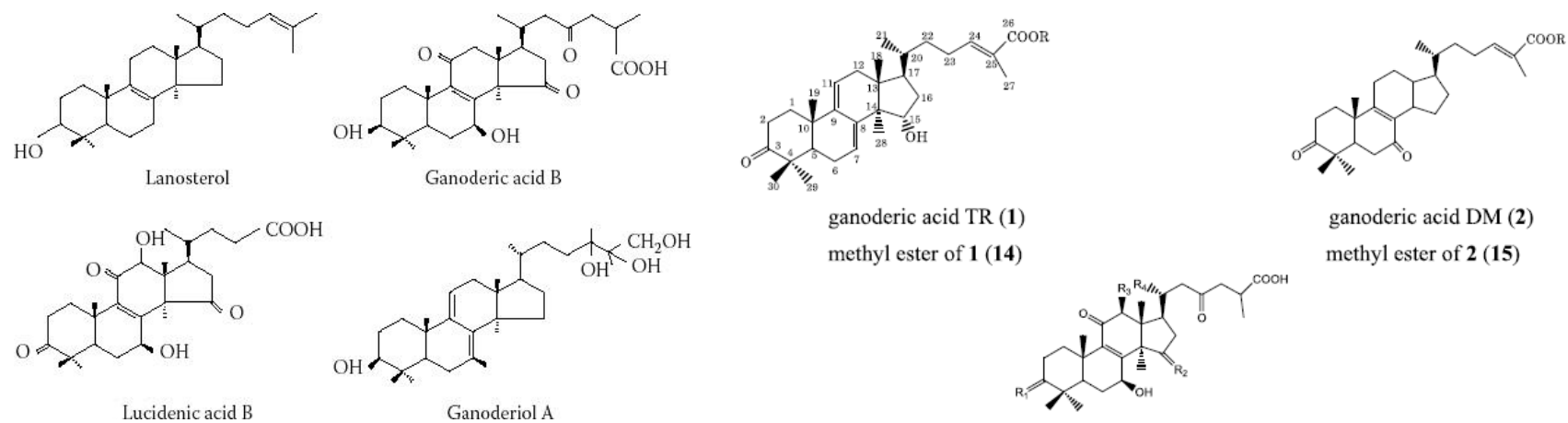


FIGURA 4: ESTRUTURAS DE ALGUNS ÁCIDOS GANODÉRICOS JÁ IDENTIFICADOS. EXTRAÍDO DE Liu et al, 2006.

Os ácidos ganodéricos podem ser encontrados tanto no micélio quanto nos esporos de *G. lucidum*, e muitos estudos vêm sendo feitos para a melhoria do bioprocessamento do cultivo submerso deste fungo visando a obtenção dessas moléculas. Muitos parâmetros foram otimizados e a tendência dos resultados mostra que uma transferência de oxigênio em taxas elevadas e uma elevada área superficial de líquido estão altamente correlacionadas com uma maior produção de ácidos ganodéricos. Depois de otimizações realizadas por diversos autores, partiu-se de uma produtividade de 207,9 mg/l chegando-se a 1427,2 mg/l de AGs, um aumento de quase 7 vezes apenas manipulando-se as condições de cultivo (Xu et al, 2010).

Estudos demonstram que o perfil de triterpenóides varia também de acordo com as diferentes fases de crescimento de *G. lucidum* (Liu et al, 2012), o que pode ser interessante, já que os baixos níveis produzidos impactam fortemente na viabilidade da sua produção. Assim, se determinada molécula de interesse é produzida nos primeiros ou últimos estágios de cultivo, uma colheita prematura ou tardia pode viabilizar a recuperação de uma quantidade maior de moléculas de interesse.

Os triterpenóides são tradicionalmente identificados por meio de dois métodos. Um deles é por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) ou TLC (*Thin Layer Chromatography*), e o outro é uma estimativa por método colorimétrico, como o método espectroscópico vanilina-ácido perclórico. Ambos são demorados e destrutivos, além de requererem condições severas de temperaturas altas e ácidos fortes, não sendo viáveis para análises de rotina. Nesse caso, verifica-se o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e com menor custo, como a baseada na espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) (Chen et al, 2012).

1.1.3 Açúcares e Polissacarídeos

A composição dos polissacarídeos produzidos por *G. lucidum* varia amplamente com o substrato utilizado para o crescimento do fungo. Nara e colaboradores (2011) relataram o uso de diversos resíduos de poda de diversos cultivares (caqui, amoreira,

cereja, ameixa, maçã, uva e carvalho) na obtenção de polissacarídeos. Nesse estudo, a produtividade foi muito variada: com base em 10 g de substrato, obteve-se desde 28,3 até 90,2 mg de polissacarídeo hidrossolúvel, com diferentes composições e diferentes proporções entre os seus blocos constituintes. Assim, pode-se pensar em determinados substratos de forma a direcionar a obtenção de determinados polissacarídeos cujas propriedades sejam interessantes do ponto de vista da bioatividade.

Por outro lado, não apenas o substrato pode influenciar na composição do fungo; a sua origem também é essencial. Dependendo do local onde foi isolado, *G. lucidum* pode apresentar diferentes valores de produtividade de micélio (variando de 3,1 a 28,2 g/l) e diferentes valores de polissacarídeos intracelulares (variando de 20,0 a 53,3 mg/g) (Stajic et al, 2011), já tendo sido alcançados valores de 112,82 mg/g (Skalicka-Woźniak et al, 2012). Já a quantidade de polissacarídeos extracelulares apresenta menores variações (0,2 a 1,5 mg/ml, já tendo sido atingido o valor de 5,7 g/l em condições de batelada alimentada (Wagner et al, 2004). Os fatores que mais influenciam a produção de polissacarídeos são a agitação e a aeração (Yang & Liau, 1998).

Para a grande maioria dos exemplares, a glucose é o principal componente dos polissacarídeos intracelulares (Bao et al, 2001; Wang et al 2002). No entanto, alguns heteropolímeros podem conter xilose, manose, galactose e fucose em diferentes conformações, incluindo ligações β 1–3, 1–4, e 1–6, e α -D (ou L)-substituintes (Bao et al, 2002). Além de afetar as proporções e composições dos açúcares, as diferenças metabólicas entre os exemplares extraídos de diferentes lugares podem afetar inclusive a bioatividade das suas frações (Stajic et al, 2011). Por exemplo, a conformação das ramificações da molécula dos polissacarídeos e as características de solubilidade afetam consideravelmente as suas propriedades antitumorais (Bao et al 2001; Zhang, Zhang & Chen 2001).

Existem relatos da produção de α e β glucanas por *G. lucidum* (Bao et al, 2001). Zhang e colaboradores (2000) demonstraram a aplicabilidade de α -glucanas sulfatadas de *G. lucidum* com atividade antitumoral. Várias outras atividades biológicas dos seus polissacarídeos já foram relatadas, como anti-inflamatória, hipoglicêmica, antiúlcera,

imunomodulatória, etc (Hikino et al 1985; Tomoda et al 1986; Bao et al 2001; Wachtel-Galor, Buswell et al 2004).

O fungo também possui uma matriz de quitina, que é indigesta para o ser humano, e parcialmente responsável pela dureza física do cogumelo (Upton, 2000). Assim, os produtos à base de polissacarídeos comercializados devem ser refinados, de forma a potencializar a sua bioatividade (Gao et al, 2005).

A extração dos polissacarídeos normalmente é realizada com água quente seguida por precipitação com etanol ou metanol, mas pode também ser feita com água e base (Borchers et al, 2008). Os polissacarídeos de *G. lucidum* são principalmente analisados por meio de métodos colorimétricos, como método de Fenol-sulfúrico ou método de Antrona-Sulfúrico. Assim como para a análise rotineira de triterpenóides, trata-se de métodos demorados e com altos gastos de energia e reagentes; assim, figuram novamente novas metodologias a base de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) (Chen et al, 2012).

1.1.4 Proteínas e afins

G. lucidum contém alguns outros compostos que podem contribuir para o seu efeito medicinal, além dos polissacarídeos e triterpenóides, como proteínas e lecitinas. O conteúdo proteico (peso seco) da espécie chega a 7-8%, o que é menor do que em muitos outros cogumelos (Chang & Buswell 1996; Mau, Lin, & Chen 2001).

Várias proteínas bioativas que podem contribuir para o efeito medicinal de *G. lucidum* já foram isoladas e analisadas, como a LZ-8, uma proteína imunossupressiva purificada do micélio (Van Der Hem et al, 1995); uma preparação de peptídeos (GLP) que exibiu atividades antioxidante e hepatoprotetora (Sun, He & Xie, 2004; Shi, Sun et al, 2008); e uma proteína de 15 kDa denominada ganodermina, que apresentou propriedades antifúngicas e foi isolada de corpos de frutificação (Wang & Ng, 2006).

Lecitinas são proteínas ou glicoproteínas não enzimáticas que ligam carboidratos; muitas espécies de animais, plantas e micro-organismos produzem lecitinas e exibem um amplo espectro de funções, incluindo processos celulares e funcionamento do sistema imune (Wang, Ng & Ooi, 1998). Algumas lecitinas foram isoladas dos corpos de frutificação e dos micélios do cogumelo (Kawagishi et al 1997), incluindo uma nova lecitina hexamérica de 114 kDa, que mostrou atividade hemaglutinante em eritrócitos humanos pronase-tratados (Thakur et al 2007). Outros compostos isolados de *G. lucidum* incluem enzimas como metaloproteases, capazes de aumentar o tempo de coagulação sanguínea (Wasser 2005; Paterson 2006).

Algumas proteínas e peptídeoglicanos de *G. lucidum* já foram isolados e demonstraram possuir bioatividade, como atividade antiviral (Li, Liu & Zhao 2005) e potencial imunomodulatório (Ji et al 2007). Para viabilizar a produção biotecnológica dessas proteínas o gene que as codifica foi clonado a partir de *G. lucidum* e expresso em *Pichia pastoris* recombinante, tendo sido corretamente expressa e tendo mantido as suas atividades biológicas previamente descritas (Lin et al, 2009).

1.1.5 Vitaminas, minerais essenciais e ácidos graxos

Os lipídios representam de 10 a 15% dos esporos de *Ganoderma lucidum* (Liu et al, 2007). Poucos estudos tem reportado a bioatividade desses lipídios. No relato de Wang et al (2012) os lipídios extraídos dos esporos foram ministrados a portadores de leucemia, e verificou-se o aumento da apoptose de células cancerosas, o que pode indicar o efeito benéfico desses lipídios contra câncer. O perfil de ácidos graxos do micélio de *G. lucidum* é retratado na Tabela 1.

TABELA 1: ABUNDÂNCIA RELATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS ENCONTRADOS NO MICÉLIO DE *Ganoderma lucidum* (EXTRAÍDO DE LIU ET AL., 2007).

ÁCIDOS GRAXOS	% EM PESO	NOME OFICIAL	NOME POPULAR
C _{12:0}	ND	Ácido dodecanóico	Ácido Láurico
C _{14:0}	0,21	Ácido tetradecanóico	Ácido mirístico
C _{14:1}	ND	Ácido tetradecenóico	Ácido miristoléico
C _{15:0}	0,99	Ácido pentadecanóico	Ácido pentadecílico
C _{16:0}	15,80	Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico
C _{16:1}	3,74	Ácido hexadecenóico	Ácido palmitoléico
C _{17:0}	0,21	Ácido heptadecanóico	Ácido margárico
C _{17:1}	0,21	Ácido 10-Heptadecenóico	
C _{18:0}	4,55	Ácido octadecanóico	Ácido esteárico
C _{18:1}	60,3	Ácido octadecenóico	Ácido oleico
C _{18:2}	14,2	Ácido octadecadienóico	Ácido linoleico
C _{18:3}	ND	Ácido octadecatrienóico	Ácido linolênico
C _{20:0}	0,04	Ácido eicosanóico	Ácido araquídico
C _{20:1}	0,06	Ácido eicosenóico	Ácido gadoléico
C _{20:2}	ND	Ácido eicosadienóico	
C _{22:0}	ND	Ácido docosanóico	Ácido behênico
C _{22:1}	ND	Ácido docosenóico	Ácido cetoléico
Σ_{sat}	21,45		
$\Sigma_{\text{monoinsat}}$	64,31		
$\Sigma_{\text{poliinsat}}$	14,20		
Σ_{insat}	78,51		
$\Sigma_{\text{sat}}/\Sigma_{\text{insat}}$	0,27		

* $\Sigma_{\text{monoinsat}}$: somatório de ácidos graxos monoinsaturados;

* $\Sigma_{\text{poliinsat}}$: somatório de ácidos graxos poliinsaturados;

* Σ_{insat} : somatório de ácidos graxos insaturados;

* ND: não detectado.

Segundo Wang et al (2012), os esporos de *Ganoderma lucidum* vem sendo usados na medicina Chinesa para o tratamento do câncer. Apesar de não ter sido ainda completamente elucidado o mecanismo com que isso ocorre, estudos indicam que os lipídeos bioativos presentes nos esporos podem estar envolvidos com a apoptose de células cancerígenas, através da ativação de um sistema conhecido de proteínas quinases que geram respostas apoptóticas, como o sistema JNK1/2 (P-specific c-Jun N-terminal Kinase).

Assim como outros quesitos, a composição de ácidos graxos de um produto comercial baseado em lipídeos (como os GSL – *Ganoderma Spore Lipid*) pode ser usado para verificar adulterações e garantir a qualidade do produto. Além do perfil de ácidos graxos, padrões de Carbono-13 e teores de ergosterol, bem como cor e odor, também devem ser considerados.

Vários elementos minerais já foram detectados na análise de corpos de frutificação de *G. lucidum*, sendo os principais fósforo, sílica, enxofre, potássio, cálcio e magnésio. Já ferro, sódio, zinco, cobre, manganês e estrôncio também foram detectados em pequenas quantidades, assim como metais pesados como chumbo, cádmio e mercúrio (Chen et al 1998). Os resultados mais relevantes são que, em algumas espécies, o conteúdo de potássio, cálcio e magnésio pode chegar a 10,2% da sua composição, demonstrando o seu potencial como suplemento alimentar. Em muitos exemplares não foram encontrados mercúrio ou cádmio (Chiu et al 2000), o que reforça que a qualidade do cogumelo está estritamente relacionada à qualidade no seu cultivo, já que é um organismo que absorve com facilidade metais e acumula-os nos seus tecidos.

Em *G. lucidum* já foram detectados níveis acima de 72 µg/g em peso seco de selênio (Se & Falandysz, 2008), sendo ele capaz de biotransformar de 20 a 30% de selênio inorgânico presente no substrato de crescimento em proteínas ligadas a selênio (com biodisponibilidade muito maior para o ser humano) (Du et al, 2008).

O mineral germânio foi encontrado em quantidades significativas (489 µg/g) em corpos de frutificação de *Ganoderma* spp (Chiu et al, 2000) – em algumas plantas como ginseng, aloe vera e alho ele é encontrado em termos de partes por bilhão (Mino et al, 1980). Embora ele não seja um elemento essencial, em doses baixas, tem sido reportado como tendo atividade imunopotenciadora, antitumoral, antioxidante e antimutagênica (Kolesnikova, Tuzova, & Kozlov, 1997). Apesar desses dados, ainda não há evidências de que esse elemento seja o responsável pelos benefícios que o cogumelo traz à saúde.

1.2 Os esporos de *Ganoderma lucidum*: um mistério a ser desvendado

No início dos anos 2000, estudos sobre qual fração de *G. lucidum* continha um maior teor de triterpenóides ainda eram muito controversos (Paterson, 2006). Muitos estudos recentes relatam que os esporos de *G. lucidum* têm níveis maiores de conteúdo e de produtividade de AGs que o micélio em si (Huie e Di, 2004; Liu et al, 2005; Xu et al, 2010). A grande desvantagem desse fato é que a produção dos esporos envolve o cultivo em estado sólido e condições específicas para o crescimento dos corpos de frutificação (o cogumelo em si) e a sua esporulação, o que demora um tempo relativamente longo para acontecer (em relação ao rápido e mais facilitado cultivo submerso do micélio), o que pode inviabilizar o seu processo de extração, apesar do seu alto valor agregado (Xu et al, 2010).

Os esporos de *G. lucidum* são pequenos, com tamanho variando de 5 a 12 μm e tem um formato ovoide, visto por microscopia eletrônica (Figura 5). Eles são ejetados pelo lado de baixo dos píleos de *Ganoderma* maduros; são extremamente duros e têm paredes chamadas esporodermes, constituídas por duas camadas resilientes, o que torna difícil a sua quebra para extração dos lipídios e outras moléculas bioativas situadas no seu interior. Em países como China, Japão, Honk Kong e EUA já é comercializado GSL (*Ganoderma Spore Lipid*), uma mistura de triglicerídeos e substâncias bioativas, que tem o custo de 13 a 25 dólares por grama (Liu et al, 2007).



FIGURA 5: MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum*. (AMPLIAÇÃO: 4500X, LARGURA DA IMAGEM: 28,5 MICRÔMETROS, BARRA: 5 MICRÔMETROS). FONTE: Liu et al, 2007.

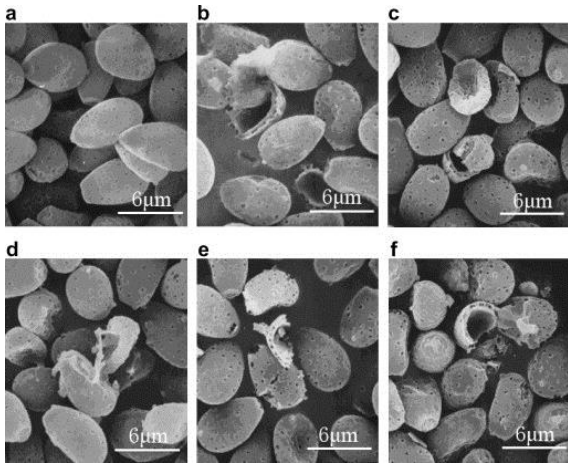


FIGURA 6: IMAGENS OBTIDAS POR MEV DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* LISADOS SOB PRESSÕES DE OPERAÇÃO DIFERENTES. BARRA=6 μ M: (A) INTACTAS, (B) 35 MPa, 2 h, (C) 35 MPa, 3 h, (D) 30 MPa, 4 h; (E) MPa 33, 4 h, E (F) MPa 35, 4 h.
 FONTE: Fu et al, 2009.

Alguns métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de lisar os esporos de *G. lucidum* e assim liberar o seu conteúdo, dentre elas, a extração por CO₂ supercrítico. Fu e colaboradores (2009) mostraram através de Microscopia Eletrônica de Varredura a evolução do tratamento por esse método, mostrando a presença de esporos com a esporoderme quebrada em diferentes combinações nas condições de tratamento (Figura 6).

A extração de biocompostos existentes nos esporos de *G. lucidum* ainda necessita de muito desenvolvimento, uma vez que os esporos tem uma rígida parede, além de serem extremamente

pequenos (microescala). Isso faz com que o corpo humano não consiga prender e absorver adequadamente os esporos (Liu et al, 2005), perdendo assim a possibilidade de usufruir de todas as suas propriedades. Além disso, tratamentos muito bruscos para o rompimento da membrana podem levar à perda de atividade biológica dos AGs ou outras moléculas que estejam dentro do esporo.

1.3 Cultivo de *Ganoderma lucidum*

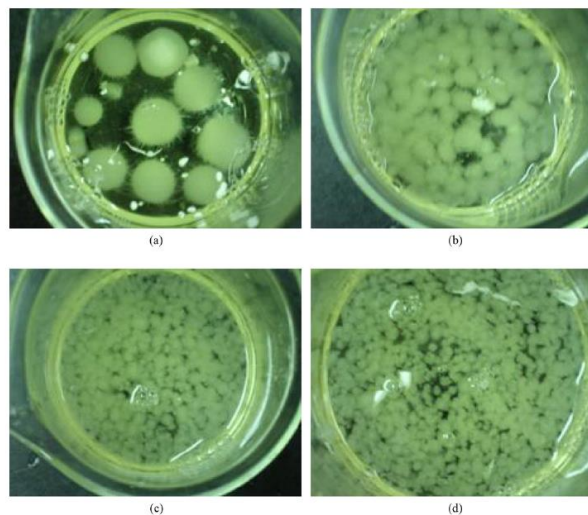
Devido às inúmeras propriedades farmacológicas dos seus produtos e extratos, *G. lucidum* desperta grande interesse na prospecção de moléculas, e por isso muitos estudos têm sido feitos objetivando a viabilidade da sua produção em larga escala, seja em fermentação sólida ou submersa (Sanodiya et al, 2009). A maioria dos estudos vem sendo feita na China, Coréia, Japão e Estados Unidos (Paterson, 2006).

Como já mencionado, encontrar *G. lucidum* na natureza é relativamente raro e impossibilitaria o uso comercial de seus extratos (Choong et al, 2011). Por isso,

diversos estudos acerca de otimização da sua produção controlada e de busca de meios de cultivo alternativos vem sendo feitos, de forma a encontrar uma produção ótima de moléculas de interesse a preços baixos, que viabilizem o seu cultivo e comercialização.

A obtenção de micélio por meio de fermentação submersa também tem sido alvo de muitas pesquisas. A morfologia e estrutura macro e microscópica de *G. lucidum* são bastante influenciadas por características do cultivo, como meio de cultivo, agitação e adição de polímeros (que funcionam como suporte para o crescimento). Assim, Yang, Yang e Chen (2009) aumentaram em 5 vezes a quantidade de micélio obtida inicialmente modificando apenas a estratégia de agitação e a indução de uma morfologia de pellets menores com a adição de ágar. Essa morfologia diminuída é desejável, uma vez que pellets muito grandes sofrem uma autólise na sua região central, devido a limitações de nutrição. Além disso, pellets menores (da ordem de 200 a 400 μm) são considerados ótimos, já que a viscosidade permanece mais baixa e evita problemas de transporte de massa (Yang, Yang e Chen, 2009). Do trabalho desses autores foi retirada a Figura 7, que mostra os diferentes tamanhos de pellets obtidos com a adição de polímeros ao cultivo submerso.

FIGURA 7: DIFERENTES TAMANHOS DE PELLETS DE *G. lucidum* OBTIDOS COM A ADIÇÃO DE POLÍMEROS AO CULTIVO, VISANDO A MENOR GRANULOMETRIA POSSÍVEL: CONTROLE (SEM ADIÇÃO DE ÁGAR) (a); ADIÇÃO DE 0,1% DE ÁGAR (b); ADIÇÃO DE 0,2% DE ÁGAR (c); ADIÇÃO DE 0,4% DE ÁGAR (d). EXTRAÍDO DE Yang, Yang e Chen, 2009.



Fang, Tang e Zhong (2002) relataram que pellets menores estão ligados também a uma maior produtividade de polissacarídeo. Esses autores determinaram que a taxa de inóculo também é significante para a produtividade de polissacarídeo, crescimento de micélio e acúmulo de ácidos ganodéricos. Eles testaram uma faixa de inóculo de 70 a 670 mg/l (em termos de massa seca) e obtiveram a máxima concentração celular (15,7 g/l em termos de peso seco) com uma concentração de inoculação de 330 mg/l.

Yang e Liao (1998) também relataram o impacto da agitação no cultivo de *G. lucidum*, dessa vez demonstrando a interferência na formação e secreção de polissacarídeos. Enquanto em cultivo em frascos agitados a velocidade ótima de rotação foi determinada em 150 rpm, em biorreator velocidades muito altas de agitação acabam afetando negativamente o crescimento micelial e a formação de polissacarídeo, embora tenham facilitado a sua excreção e a eficiência na mistura.

Alguns estudos demonstraram que a utilização de meios complexos *versus* meios sintéticos ou semissintéticos aumenta a produtividade no cultivo de *G. lucidum*, tanto em termos de biomassa quanto de ácidos ganodéricos (Xu et al, 2012). Acredita-se que os meios complexos, quando comparados aos semissintéticos, evitam o efeito negativo da repressão catabólica na produção de metabólitos secundários (Xu et al, 2008). Assim, vários autores tem proposto a utilização de substratos alternativos (Nara et al, 2011; Hsieh e Yang, 2003; Zapata, Rojas e Atehortua, 2012; Peksen e Yakupoglu, 2009). Zapata, Rojas e Atehortua (2012) propuseram um meio de cultivo baseado em farinha de cevada ao custo de USD \$0,11 o litro, com rendimento de biomassa de 23,5 g/l, de polissacarídeos de 2,72 g/l e de polissacarídeos intracelulares de 2,22 g/l. Além disso, relataram a obtenção de cerca de 300 mg/l de ácidos ganodéricos. Dessa forma, o meio de cultivo impactaria em apenas 36 centavos de dólar o custo da produção de 1 g de ácidos ganodéricos, que pode ser vendido por até 25 dólares, o que permite a obtenção de lucro, considerando que ainda existem outras etapas de produção custosas (purificação, secagem, embalagem, etc).

Peksen e Yakupoglu (2009) concluíram que tanto o substrato quanto a espécie (ou origem de isolamento) são os fatores que afetam a composição e os rendimentos de produção de bioprodutos de *G. lucidum*. Eles propuseram que resíduos de produção

de chá podem ser adequados como suplementos no preparo de substratos à base de serragem ou palha de árvores, como o choupo-branco, para a fermentação em estado sólido do fungo e a consequente obtenção de corpos de frutificação e esporos. Hsieh e Yang (2003) utilizaram resíduos de soja proveniente do processamento de tofu para o cultivo em estado sólido de *G. lucidum*, concluindo que a melhor relação C/N (carbono/nitrogênio) nesse tipo de cultivo situa-se entre 70 e 80.

G. lucidum também foi descrito como potencial micro-organismo utilizado em bioremediação. Vários estudos sugerem que o seu crescimento em substratos contendo resíduos com corantes ou tintas pode diminuir o seu potencial tóxico (Bhatti et al, 2008; Hafiz et al, 2008; Asgher et al, 2010). Lacases produzidas por *G. lucidum* mostraram-se eficientes na descoloração de pigmentos reativos quando o microrganismo foi cultivado em estado sólido em substrato contendo tais resíduos recalitrantes (Murugesan et al, 2007).

1.4 Extrato de Ganoderma lucidum: caracterização, controle de qualidade e estabilidade

Produtos de uso tópico, como cosméticos e medicamentos, podem possuir como compostos ativos substâncias sintéticas, que muitas vezes causam efeitos adversos e indesejados no paciente ou consumidor, além de poderem causar danos a células saudáveis. Assim, busca-se cada vez mais compostos de origem natural e/ou biotecnológica com propriedades tais que possam substituir de maneira satisfatória os compostos sintéticos utilizados em medicamentos e cosméticos, sem diminuir e preferencialmente aumentando o seu potencial e diminuindo a sua toxicidade.

De acordo com Choong et al (2011) a qualidade dos extratos de *G. lucidum* pode ser influenciada por diversos critérios, externos e internos, como origem do material devido a fatores como variações de temperatura, umidade e luminosidade no estoque, material da embalagem, características do local onde a embalagem é deixada na loja, e os métodos ou processos de extração e liofilização. Além disso, ainda devem ser

consideradas as reações químicas intra e intermoleculares e o tempo de prateleira, que podem gerar mudanças químicas e alterar a qualidade do material original. Em geral, as variações não são significativas em termos de textura, cor ou aparência. Ao mesmo tempo, é muito difícil identificar variações nas constituições químicas por meio de métodos analíticos rotineiros.

De acordo com alguns parâmetros, como os perfis de ácidos graxos e a quantidade de ácidos graxos específicos, bem como teor de ergosterol, cor e odor, Liu et al (2007) propuseram métodos analíticos que podem discriminar facilmente a adulteração de produtos de GSL (*Ganoderma Spore Lipids*) com óleos vegetais comuns.

Paterson (2006) defende a validação das espécies e dos produtos derivados, já que o teor de ácidos ganodéricos nos esporos pode variar de acordo com o local de isolamento, espécie e condições de cultivo, conforme já foi mencionado. Além disso, trata-se de um parâmetro importante de qualidade, e o mesmo autor ressalta a lacuna existente nesse controle de qualidade, sugerindo a elaboração de kits de identificação das espécies e produtos, mostrando que uma simples análise em HPLC já é capaz de diferenciar produtos elaborados a partir de *G. lucidum* e *G. tsugae*, desde que utilizados os padrões corretos de comparação. Nesse sentido, Chen et al (2012) desenvolveram análises de Espectroscopia-NIR (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*) para determinar os teores de polissacarídeos e ácidos ganodéricos de duas espécies de *Ganoderma* (*atrum* e *lucidum*) com diferentes origens, comparando-os a métodos de referência. Encontraram que os métodos são altamente correlacionados, com a vantagem de o NIR ser muito mais rápido que os métodos usuais, sendo ainda que não utiliza nenhum reagente químico. Assim, os autores propõem esse método como sendo usual para acompanhar a colheita e produção, bem como o controle de qualidade, de alimentos funcionais contendo extratos ou partes das espécies citadas.

A industrialização e as técnicas de controle modernas, aliadas à crescente demanda de qualidade e repetitividade das características dos produtos, tão desejado pelos consumidores, fez com que surgissem técnicas para a avaliação da estabilidade de extratos complexos, como é o caso de extratos de *G. lucidum*. Choong e

colaboradores (2011) relataram o emprego de Espectroscopia FTIR e “Second-derivative spectroscopy combined with 2D-IR Spectroscopy” para avaliar a estabilidade de extrato aquoso de *G. lucidum* durante 22 meses. Com essas técnicas, foi possível obter espectros que identificavam as bandas respectivas a polissacarídeos, proteínas e lipídios do extrato, o que possibilitou o acompanhamento direto da estabilidade de cada uma dessas classes. De uma forma geral, os extratos mantiveram-se estáveis durante o tempo analisado, e a técnica utilizada mostrou-se confiável para uma análise rápida e direta da estabilidade desse extrato, podendo ser uma ferramenta importante para o uso industrial desse tipo de extrato.

1.5 Aplicações e Propriedades

Muitos estudos tem relatado o potencial benéfico de extratos de *Ganoderma* sp. para a saúde humana. Já na década de 1990 ficou relatada a correlação entre o potencial antioxidante de extratos aquosos de três espécies de *Ganoderma* (*G. lucidum*, *G. neo-japonicum* e *G. formosanum*) e o seu efeito hepatoprotetor. Isso pode ser explicado devido à hipótese de que danos no fígado são causados por peroxidação lipídica, e os extratos possuem potencial antioxidante, sendo assim capazes de proteger esse fenômeno no fígado de ratos (Lin et al, 1995). Dois anos depois, Kim e colaboradores relataram a inibição do efeito citopático causado pela imunodeficiência do vírus-1 (causador do HIV) utilizando também o extrato aquoso de *G. lucidum*, sem causar toxicidade nas concentrações testadas.

Extratos etanólicos foram relatados como tendo efeito cardioprotetor contra substâncias tóxicas, supostamente devido ao seu potencial antioxidante, capaz de degradar de forma diferente tais moléculas, prevenindo os danos induzidos por superóxidos (Wong et al, 2004).

Extratos de *Ganoderma lucidum* já foram reportados como tendo inúmeros potenciais, sumarizados no quadro 1.

<ul style="list-style-type: none"> • Ações: <ul style="list-style-type: none"> ○ Anti-arterosclerótica ○ Anti-inflamatória ○ Analgésica ○ Anti-tumoral ○ Antibacteriana ○ Antiviral (incluindo anti-HIV) 	<ul style="list-style-type: none"> • Químico e radio prevenção • Promoção do sono • Imunomodulação • Hipolipidêmico • Anti-fibrótico • Hepatoprotetor • Anti-diabético • Anti-androgênico • Anti-angiogênico 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-herpético • Antioxidante e capaz de capturar radicais livres • Anti-envelhecimento • Hipoglicêmico • Atividade estrogênica • Anti-úlceras • Adjuvante no tratamento da leucemia
--	---	--

QUADRO 1: PRINCIPAIS ATIVIDADES JÁ RELATADAS DE EXTRATOS DE *G. lucidum* (ESPOROS, MICÉLIO E POLISSACARÍDEO)

2. Objetivos

Esse capítulo tem como objetivo trazer uma revisão bibliográfica a respeito de *Ganoderma lucidum*, retratando o seu atual estado da arte e posicionando-o em relação ao seu potencial cosmético. Além disso, em termos laboratoriais, objetiva-se a caracterização em termos de composição centesimal do extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* bem como a determinação dos melhores parâmetros de extração para obtenção de um extrato a ser incorporado em um produto cosmético visando o retardamento do envelhecimento.

3. Metodologias

3.1 Extração para análises e obtenção de biocompostos

Os esporos de *G. lucidum* de origem chinesa foram mantidos no Laboratório de Processos Biotecnológicos – LPB em freezer (-4°C). A extração deu-se selecionando uma alíquota de esporos (padrão de 1 g) e misturando-se a determinada quantidade de solvente, variáveis (havendo uma prévia maceração – não mostrada – com Graal e pistilo) antes da transferência para um frasco de Erlenmeyer. Depois de respeitado o

tempo e a condição de extração, a mistura de esporos e solventes foi separada por meio de centrifugação e triplamente filtrada em filtro de papel.

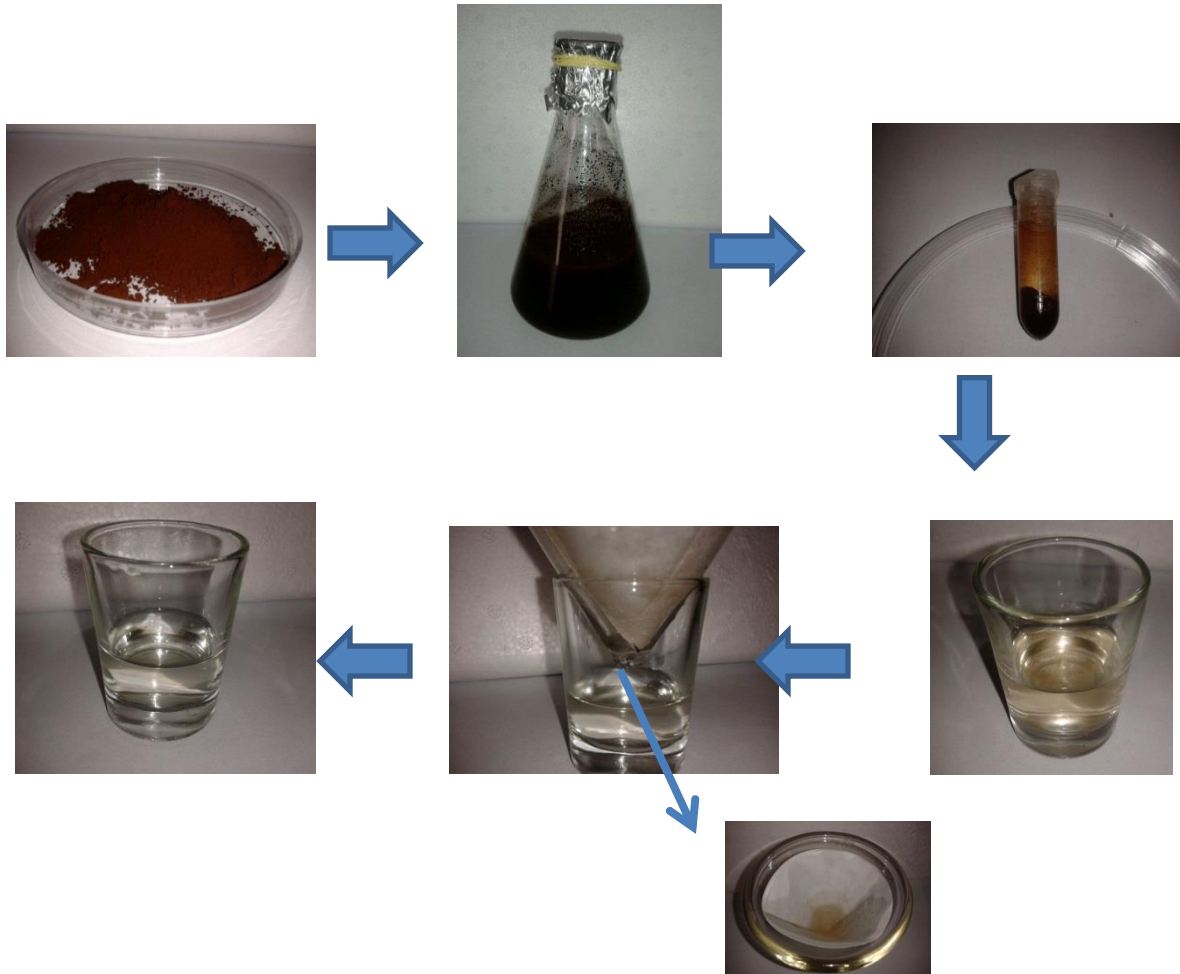


FIGURA 8: ETAPAS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS ESPOROS DE *Ganoderma lucidum*. ESPOROS; ESPOROS MISTURADOS COM O SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO EM FRASCO DE ERLENMEYER; EXTRATO BRUTO CENTRIFUGADO (VER ESPOROS AO FUNDO E SOBRENADANTE IMPURO ACIMA); EXTRATO SEPARADO DOS ESPOROS, AINDA COM IMPUREZAS; EXTRATO SENDO TRIPLAMENTE FILTRADO EM FILTRO DE PAPEL; EXTRATO PURIFICADO E PRONTO PARA ANÁLISE OU INCORPORAÇÃO.

3.2 Escolha do Extrato

Foram preparadas extrações dos compostos bioativos presentes nos esporos em frascos apropriadamente esterilizados e limpos, sendo testadas diferentes proporções entre esporos e solventes, escolhidas em 1:8, 1:16 e 1:40 (m/v), padronizando-se a

massa de esporos a ser extraída em 1 g. Assim, buscou-se avaliar se a qualidade do extrato varia com o aumento ou diminuição da proporção de solvente utilizado, procurando estabelecer um processo econômico. As extrações foram realizadas com solventes P.A. (padrão analítico), tendo sido usados acetona, metanol e etanol, e as diluições adequadas foram obtidas com água destilada. Foram pesquisadas 5 diluições, variando-se de 100% (solvente puro) até 20%.

Depois de misturar os esporos nas proporções adequadas com os solventes, os frascos para extração foram mantidos em shaker a 120 rpm e 30°C durante 24 h para extração dos compostos ativos. Intervalos maiores de tempo não alteraram os resultados e intervalos menores não foram satisfatórios, o mesmo acontecendo para agitação e temperatura (dados não mostrados). Os esporos foram separados do sobrenadante por meio de centrifugação (10000 rpm, 15 minutos; Sorvall* Legend* XT/XF Centrifuge Series Thermo Scientific) e filtrado 3 vezes em papel filtro Whatman nº01 para remoção completa dos esporos. O sobrenadante separado foi denominado a partir daqui como extrato.

Os esporos foram analisados antes e após a sua extração, podendo-se assim verificar quanto material havia e quanto permaneceu no esporo após essa extração. Esses dados, analisados em conjunto com a composição do extrato em si, foram utilizados para se fechar o balanço do que foi extraído e do que permaneceu nos esporos.

3.3 Analisador CNHS

Os teores de Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio dos esporos foram determinados em um Analisador CNHS Flash 2000 Series, Thermo Scientific. Como o equipamento analisa materiais sólidos, não seria possível injetar uma amostra do extrato, que é líquido; por isso, analisaram-se os esporos antes da extração e depois da extração,

considerando-se assim que a diferença entre os resultados foi o que passou para a fase líquida durante a extração. Os ensaios foram feitos em triplicata.

3.4 Carboidratos

Os carboidratos totais foram determinados pelo método colorimétrico Fenol-sulfúrico. Em 1 ml de amostra ou de padrão adiciona-se 1ml de solução de fenol 5%, e, posteriormente, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Deve-se aguardar o resfriamento à temperatura ambiente antes de se fazer a leitura da absorbância a 490 nm (Dubois et al, 1956). A determinação da composição monomérica foi realizada por meio de HPLC. A coluna utilizada nessa análise foi a Aminex HPX87H com fase móvel de H₂SO₄ 5mM, nas condições de operação a 60°C, 0,6 ml/min e com detector por índice de refração.

3.5 Proteína

As proteínas foram determinadas colorimetricamente por meio da Metodologia de Lowry. A 0,1 ml de padrão ou amostra é adicionado 0,1 ml de NaOH 2N. Hidrolisa-se a mistura durante 10 minutos a 100°C. Após resfriamento, adiciona-se 0,1 ml de reagente de Folin, misturando-se em vórtex, e deixa-se repousar a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos. A leitura é feita em espectrofotômetro a 750 nm (concentração de proteína menor que 500 µg/ml) ou a 550 nm (concentração de proteína entre 100 e 2000 µg/ml) (Lowry et al., 1951).

3.6 Lipídios

Os lipídios foram determinados por meio da extração com metanol-clorofórmio seguida por extração líquido-líquido com hexano (Sydney, 2010). Misturou-se uma alíquota de 1 ml do extrato a mistura de metanol-clorofórmio (1:2). Depois, adicionou-se hexano, fase que é retirada e colocada em um tubo Falcon tarado previamente. O tubo foi colocado em uma estufa com circulação forçada a 60°C até que todo o solvente evaporasse. O peso final obtido correspondeu ao teor total de lipídios extraído pelo método.

3.7 Cinzas

Uma amostra com massa conhecida é colocada em cadinho previamente seco e tarado, e levada a uma mufla aberta para queima e liberação dos fumos. A queima ocorre a 550°C durante 30 minutos. A queima é considerada eficiente se o conteúdo mostra-se esbranquiçado uniformemente. O cadinho é então retirado da mufla e resfriado até temperatura ambiente em um dissecador. Quando chega à temperatura ambiente, a massa é medida para a determinação de cinzas. A metodologia é baseada na AOAC 941.12.

3.8 Potencial Antioxidante

A análise da atividade antioxidante do extrato foi feita por meio da metodologia de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) indicada pela EMBRAPA (Rufino et al, 2007). A uma alíquota de 0,5 ml de extrato são adicionados 4,95 ml do reagente DPPH (DPPH em pó, P.A., diluído em metanol puro a uma proporção de 0,004%). Após leitura espectrofotométrica (a 517 nm) e comparação com um branco (apenas metanol), o

potencial antioxidante de cada extrato foi determinado e expresso em termos de IC₅₀, calculado por meio da equação (1).

$$IC_{50}(\%) = \frac{(Abs_{branco} - Abs_{amostra})}{Abs_{branco}} \times 100 \quad (1)$$

3.9 Teor de Compostos Fenólicos

O teor de compostos fenólicos foi dosado utilizando-se o método de Folin Ciocalteu, obedecendo a metodologia proposta pela EMBRAPA (Vizzotto & Pereira, 2009). A 0,5 ml de extrato adiciona-se 3,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu e homogeneiza-se em vórtex. Essa mistura é deixada em repouso durante 3 minutos à temperatura ambiente para garantir a reação inicial. Depois, 1 ml de uma solução de Na₂CO₃ a 1N é adicionado à mistura inicial que foi incubada, à temperatura ambiente, durante 2 horas. A absorvância é medida a 725 nm e os resultados medidos expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG; mg/100 g esporos), usando para isso uma curva padrão de ácido gálico (0–0,1 mg/ml). Diluições adicionais foram realizadas no caso de o valor de absorvância medido ser maior que a faixa linear de absorvância da curva padrão.

4. Resultados e Discussão

4.1 Parâmetros de Extração dos Compostos Bioativos dos Esporos de *G. lucidum*

Foram realizados dois tipos de extração dos esporos; no primeiro, cada solvente foi testado separadamente para a extração de uma alíquota de esporos que ainda não

havia sofrido nenhum processamento, o que foi chamada de extração única. Já no segundo tipo, uma mesma alíquota de esporos foi extraída sequencialmente utilizando-se os mesmos solventes da extração única; foi chamada então de extração sequencial

Nas tabelas 2 a 7 serão comparados os valores de inibição de radicais livres, indicados pelo IC_{50} , e o teor de compostos fenólicos. IC_{50} trata-se da concentração necessária de determinada substância considerada antioxidante capaz de inibir 50% dos radicais livres gerados na reação do DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazila) com metanol. Quanto menor esse valor, maior é o potencial antioxidante da substância. Já o teor de compostos fenólicos é um indicativo indireto da medida do potencial antioxidante, podendo ser correlacionado ao valor de IC_{50} , por exemplo. Por reconhecidamente combater radicais livres, a quantidade de compostos fenólicos pode ser correlacionada com o poder antioxidante de um material Assim, um alto teor de compostos fenólicos indica um maior potencial antioxidante da substância.

Com esses experimentos, foi possível avaliar qual solvente, em qual proporção em relação aos esporos e em qual concentração (%), gerou o extrato com melhores potenciais antioxidantes.

4.1.1 Extração Única

As tabelas 2 a 6 trazem os resultados das extrações que foram feitas utilizando-se uma massa de esporos que ainda não haviam passado por nenhum processo de extração. Em negrito encontram-se alguns resultados relevantes e em verde, destacado o melhor resultado e a melhor condição de extração.

Pode-se notar na Tabela 2 que na proporção entre esporos e solvente de 1:40 (ou seja, na extração na qual utilizou-se a maior quantidade de solvente em relação á quantidade de esporos), utilizando-se etanol 40%, obteve-se o menor IC_{50} do experimento (54,1mg/ml), ou seja, o extrato assim obtido teve o maior poder antioxidante. Os maiores teores de compostos fenólicos também foram obtidos com

essa proporção entre esporos e solvente (1:40) e pode-se notar que utilizando-se o etanol a 20, 40 e 60%, o teor de fenólicos extraídos foi praticamente o mesmo. Assim, pode-se concluir que dentre os parâmetros testados para esse solvente, o melhor resultado foi obtido utilizando-se a proporção esporos:solvente de 1:40, sendo o melhor solvente o etanol 40%.

TABELA 2: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* COM ETANOL

PROPORÇÃO ESPOROS:SOLVENTE (m/v)								
1:8			1:16			1:40		
[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)	[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)	[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)
20	87,0	749,17	20	86,0	831,68	20	140,9	964,51
40	71,6	915,96	40	67,7	900,02	40	54,1	1179,24
60	79,4	935,90	60	61,0	939,64	60	67,1	1187,73
80	221,3	554,16	80	136,7	637,68	80	65,0	1204,91
100	120,3	292,52	100	238,1	408,61	100	179,0	772,07

Na Tabela 3 pode-se notar que com a proporção entre esporos e solvente de 1:40 (ou seja, na extração na qual utilizou-se a maior quantidade de solvente) e utilizando-se metanol a 20%, obteve-se o menor IC₅₀ (47,1mg/ml); ou seja, o extrato obtido nessas condições teve o maior poder antioxidante. Os maiores teores de compostos fenólicos também foram obtidos com essa proporção entre esporos e solvente (1:40) e pode-se notar que, tanto utilizando-se o metanol a 20 quanto a 40%, o teor de fenólicos extraídos foi praticamente o mesmo.

Assim, pode-se concluir que dentre os parâmetros testados para esse solvente, o melhor foi utilizar a proporção esporos:solvente de 1:40, sendo o melhor solvente o metanol 20%.

TABELA 3: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* COM METANOL

PROPORÇÃO ESPOROS:SOLVENTE (m/v)								
1:8			1:16			1:40		
[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)	[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)	[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)
20	90,2	799,17	20	72,8	868,29	20	47,1	1089,70
40	80,5	770,99	40	66,9	813,96	40	54,1	1058,85
60	83,5	770,99	60	64,5	752,16	60	55,9	897,69
80	120,6	644,33	80	79,1	499,58	80	97,8	591,97
100	186,9	450,01	100	197,3	572,58	100	115,0	591,97

A partir da extração com acetona não foi mais realizada a extração na proporção 1:8, pois não estava gerando bons resultados, provavelmente por não haver solvente suficiente para uma extração eficiente.

Pode-se notar, analisando-se a Tabela 4, que na proporção entre esporos e solvente de 1:40 (ou seja, na extração na qual utilizou-se a maior quantidade de solvente), e empregando-se Acetona a 40%, obteve-se o menor IC₅₀ (42,7 mg/ml), ou seja, o extrato obtido dessa maneira apresentou o maior poder antioxidante. Os maiores teores de compostos fenólicos também foram obtidos com essa proporção entre esporos e solvente (1:40). No entanto, ao contrário das outras extrações, não houve uma correlação entre a condição que apresentou o menor valor de IC₅₀ (a 40%) e o maior teor de compostos fenólicos (a 80%). Porém, o teor de fenólicos obtido com acetona 40% não diferiu muito do obtido com acetona 80%, apesar de este ser maior que aquele.

Assim, pode-se concluir que dentre os parâmetros testados para esse solvente, o melhor foi utilizar a proporção esporos:solvente de 1:40, sendo o melhor solvente a acetona 40%.

TABELA 4 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* COM CLOROFÓRMIO

PROPORÇÃO ESPOROS:SOLVENTE (m/v)					
1:16			1:40		
[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)	[solvente] (%)	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)
20	126,3	1031,55	20	91,7	1380,99
40	79,7	1084,71	40	42,7	1411,05
60	60,8	1279,44	60	54,6	1313,31
80	77,0	1445,51	80	63,2	1617,26
100	158,1	593,51	100	498,0	841,53

Pode-se perceber na Tabela 5 que os resultados obtidos com a extração dos esporos com água em diferentes pHs foram melhores do que com qualquer um dos solventes testados anteriormente. Neste caso foram obtidos os mais baixos valores de IC₅₀, chegando a 26,7 mg/ml, e os mais altos teores de compostos fenólicos (2255,9 µg/ml em EAG) para todos os pontos analisados. Além disso, para as duas proporções testadas, a pH 7,0 foram obtidos os menores valores tanto em relação aos demais pontos avaliados nesse experimento quanto em relação aos outros experimentos.

Portanto, o extrato com maior teor de compostos fenólicos foi obtido com água a pH 7,0, em proporção esporos:solvente de 1:16, enquanto que o menor valor de IC₅₀ foi obtido com água pH 7,0, em proporção esporos:solvente de 1:40.

TABELA 5: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM A EXTRAÇÃO ÚNICA DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* COM ÁGUA

PROPORÇÃO ESPOROS:SOLVENTE (m/v)					
1:16			1:40		
pH	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)	pH	IC ₅₀ (mg/ml)	Compostos Fenólicos (µg/ml em EAG)
3,0	62,4	1216,74	3,0	29,1	1452,16
5,0	54,5	1754,68	5,0	55,7	1549,08
7,0	36,5	2255,89	7,0	26,7	1712,86
9,0	54,2	1541,98	9,0	26,9	1605,69
11,0	71,7	1621,45	11,0	33,4	1628,91

4.1.2 Extração sequencial

Nessa seção serão apresentados os resultados da extração sequencial dos esporos. Uma quantidade de 1 grama de esporos foi extraído com o primeiro solvente e, após a retirada do extrato, a mesma massa foi utilizada para as extrações posteriores, buscando-se exaurir o material e extrair o máximo de componentes possível.

As extrações sequenciais geraram extratos com IC_{50} da magnitude cerca de 10 vezes maiores que as extrações em uma única etapa (Tabela 6). Quanto mais os esporos são submetidos à extração, maior o IC_{50} obtido, o que indica um potencial antioxidante cada vez menor desse extrato. Isso mostra que o primeiro solvente já extrai de forma bastante satisfatória os compostos antioxidantes, sendo desnecessária e pouco significativa qualquer extração posterior.

Além disso, com as quatro extrações realizadas obtiveram-se valores de compostos fenólicos que foram somados na coluna “Compostos Fenólicos Totais”. Comparativamente, na coluna ao lado, tem-se os valores de Compostos Fenólicos obtidos com a extração única utilizando-se água como solvente. Pode-se notar que para todas as condições o teor de fenólicos foi maior na extração única com água do que com as quatro extrações sequenciais somadas.

TABELA 6: POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDOS COM EXTRAÇÃO SEQUENCIAL

		SEQUENCIA DOS SOLVENTES				COMPOSTOS FENÓLICOS		
		1º) METANOL	2º) ETANOL	3º) ACETONA	4º) ÁGUA DIFERENTES PHS	∑ COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (µg/ml EAG)	COMPARATIVO DE COMPOSTOS FENÓLICOS (EXTRAÇÃO APENAS COM ÁGUA EM DIFERENTES pHs)	
[solv.]		IC ₅₀ (mg/ml)						
Proporção esporo:solvente	1:8	20	90,2	310,0	412,0	-	1013,2	-
		40	80,5	345,0	208,2	-	1002,0	-
		60	83,5	305,0	224,7	-	1095,6	-
		80	120,6	270,0	188,3	-	960,6	-
		100	186,9	248,0	3955,0	-	754,0	-
	1:16	20	72,8	250,6	206,0	936,1	1132,3	1216,7
		40	66,9	203,0	201,8	817,1	1477,8	1754,7
		60	64,5	242,0	241,2	697,7	2235,2	2255,9
		80	79,1	240,0	152,1	813,2	1319,6	1541,9
		100	197,3	273,0	494,4	1075,5	1439,5	1621,4
	1:40	20	47,1	311,0	164,8	436,0	1110,3	1452,1
		40	54,1	231,0	197,8	835,4	1114,0	1549,1
		60	55,9	354,0	304,2	400,0	1540,3	1712,8
		80	97,8	359,0	123,6	403,5	1339,2	1605,7
		100	115,0	345,0	164,8	501,2	1543,0	1628,9

4.1.3 Escolha das Melhores Condições de Extração dos Esporos de *Ganoderma lucidum*

Para a escolha das melhores condições de extração e melhor solvente serão comparados os melhores resultados de cada experimento, sumarizados na Tabela 7. Pode-se perceber que a extração com água originou os extratos com menores valores de IC₅₀ e com maior teor de compostos fenólicos extraídos. Essa constatação é extremamente favorável, já que se excluem os gastos com solventes orgânicos. Não há custos nem mesmo com a alteração do pH da água, já que o melhor resultado foi obtido com pH 7,0. Além disso, excluem-se as etapas de evaporação do solvente para a

incorporação no produto (cremes, pomadas, shampoos, etc), já que não há restrições quanto à utilização de extratos aquosos nesses tipos de produtos.

TABELA 7: ANÁLISE COMPARATIVA DOS MELHORES RESULTADOS DE CADA EXTRAÇÃO PARA A ESCOLHA DO MELHOR SOLVENTE PARA O PREPARO DE EXTRATO DE ESPOROS DE *G. lucidum*.

	SOLVENTE	MELHOR CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE	MELHOR PROPORÇÃO	IC ₅₀ (mg/ml)	COMPOSTOS FENÓLICOS (µg/ml EAG)
Experimento 1	Etanol	40%	1:40	54,1	1179,24
Experimento 2	Metanol	20%	1:40	47,1	1089,70
Experimento 3	Acetona	40%	1:40	42,7	1411,05
Experimento 4	Água diferentes pHs	pH 7,0	1:40	26,7	1712,86
		pH 7,0	1:16	36,5	2255,89

Outros estudos já relataram a obtenção de extratos de *Ganoderma lucidum* utilizando diversos solventes, sendo a água ressaltada como excelente solvente em diversos deles (Rofuli et al, 2005, Choong et al, 2011). Muito provavelmente esse é um dos solventes mais utilizados para estudos científicos, já que uma das formas mais comuns de consumo do fungo é por meio de infusões ou chás, o que nada mais é que uma extração aquosa a quente dos seus compostos ativos.

4.2 Caracterização do Extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*

A primeira análise, discutida na seção anterior desse capítulo, sobre potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos, confirmou o potencial dos extratos dos esporos de *Ganoderma lucidum* em relação ao seu potencial antioxidante, e a melhor condição de extração foi estabelecida. A etapa subsequente foi analisar a composição do melhor extrato em termos de teores de carboidrato, proteína, lipídeos e cinzas, pois é essencial determinar ao menos minimamente a sua composição, pensando na sua aplicação posterior em produtos finais comerciais, bem como para tentar prever algumas de suas propriedades ou funções.

A partir desse ponto, para o restante desse capítulo e para os próximos, considera-se “extrato” o sobrenadante da extração de esporos de *Ganoderma lucidum*

com água a pH 7,0 durante 24 horas sob agitação de 120 rpm em uma proporção esporos:solvente de 1:16 (condições determinadas previamente).

A medicina oriental, ao contrário da ocidental, não prioriza a utilização de determinado fármaco ou composto bioativo totalmente purificado. Assim como no caso de plantas e outros organismos, já foi provado que em muitos casos o extrato complexo de *Ganoderma lucidum* não purificado é mais eficaz do que os seus compostos isolados. Isto indica que os componentes do extrato agem de maneira sinérgica, potencializando a sua atividade biológica. Por outro lado, estudos mais aprofundados sobre o potencial tóxico dessas preparações ainda devem ser realizados, já que fungos podem produzir toxinas e outras substâncias maléficas para os seres humanos (Paterson, 2006).

4.3.1 Composição Centesimal

Para determinar a composição do extrato foi realizada uma análise da composição de CNHO (Carbono/Nitrogênio/Hidrogênio/Oxigênio), contida na Tabela 8 (quatro primeiras linhas; as cinzas foram obtidas pela metodologia descrita anteriormente).

TABELA 8: COMPOSIÇÃO DOS ESPOROS DE *G. lucidum* ANTES E DEPOIS DA EXTRAÇÃO AQUOSA

	ANTES DA EXTRAÇÃO(%)	DEPOIS DA EXTRAÇÃO(%)
C	59,40 (±0,01)	58,10(±0,01)
N	5,43(±0,01)	6,26(±0,01)
H	8,24(±0,01)	7,98(±0,01)
O	26,92(±0,01)	27,65(±0,01)
Cinzas	0,0091(±0,0002)	0,0064(±0,0002)

A partir da Tabela 8 pode-se dizer que possivelmente no extrato estariam contidos principalmente compostos à base de carbono e hidrogênio, como carboidratos e lipídios, uma vez que as proporções de C e H diminuíram após a extração em relação

aos valores iniciais. Por outro lado, a proporção de nitrogênio e oxigênio aumentou. Isso pode ser interpretado considerando-se que foram retirados outros materiais dos esporos, e o que se manteve neles passou a estar mais concentrado do que inicialmente. Assim, pode-se imaginar que as proteínas dos esporos tenham ficado retidas na estrutura após a extração.

Esses resultados foram corroborados pela análise do extrato obtido. O teor de proteínas no extrato foi de apenas 0,857 g/l, o que corresponde a 2,53% da proteína existente no esporo (conforme análise pelo analisador CNHO), confirmando que muito pouca proteína foi solubilizada.

Em termos de lipídios, foi obtido um teor de 6,61%, o que corresponde a cerca de metade do que indica a literatura (de 10 a 15% de lipídios). Esse fato é totalmente compreensível, já que a extração foi realizada por solvente polar; certamente o lipídio constante no extrato corresponde ao material que foi arrastado fisicamente durante a extração, e não quimicamente extraído. As gotículas de óleo presente no extrato aquoso podem ser visualizadas na Figura 9.

FIGURA 9: ÓLEO PRESENTE NO EXTRATO AQUOSO DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* (GOTÍCULAS SOBRENADANTES)



Já em termos de carboidratos, a análise de açúcares totais acusou a presença de 3,66g/l. Analisando as frações em HPLC, chegou-se à composição apresentada na Tabela 9, que mostra a predominância de glucose e maltose.

TABELA 9: COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES PRESENTES NO EXTRATO DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidium*

AÇÚCAR	CONCENTRAÇÃO (G/l)	%
Glucose	2,66	73
Maltose	0,52	14
Outros	0,48	13

Por fim, como forma de sintetizar a composição básica do extrato, chegou-se à Tabela 10, que reúne os dados previamente discutidos nessa seção.

TABELA 10: COMPOSIÇÃO GERAL DO EXTRATO DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidium*

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO
Glucose	2,66 g/l
Maltose	0,52 g/l
Proteínas	0,86 g/l
Cinzas	0,0037%
Lipídios	6,61%
Compostos Fenólicos	2,25 mg/ml em eq. de ác. gálico
IC ₅₀	36,5 mg/ml

4.2 Estabilização do Extrato de Esporos de *Ganoderma lucidum*

Em condições não controladas de cultivo e/ou colheita dos esporos, é possível que impurezas e outros microrganismos sejam carregados juntamente com os esporos colhidos de *G. lucidum*. Além disso, condições inadequadas de transporte ou armazenamento podem ainda causar contaminações. Para aplicação em produtos cosméticos, é importante realizar análises de estabilidade física, química e biológica dos extratos, uma vez que por se tratar de um material complexo, a necessidade de manutenção da sua homogeneidade torna-se crucial para a sua utilização.

4.2.1 Análise microbiológica

O extrato foi testado em relação à sua contaminação microbiológica por meio da semeadura em meios de cultivo enriquecidos para detecção de bactérias, fungos e

leveduras (Ágar Nutriente para bactérias, Meio de Cultura Saboraund Dextrose para os demais). Depois de incubados pelo tempo correto (48 horas para bactérias, 7 dias para fungos e leveduras), procedeu-se à contagem dos microrganismos, tendo-se resultado em contagens maiores que 3000 UFC/g para todos os casos. Esse resultado indica um alto nível de contaminação microbiológica.

Para averiguar a origem da contaminação, uma nova extração foi realizada, dessa vez em ambiente estéril e com todos os materiais, inclusive a água da extração, tendo sido previamente esterilizados. Novamente o plaqueamento foi feito e o mesmo nível de contaminação foi verificado.

Diante desse fato, para aplicação em produtos cosméticos, alguma medida deveria ser tomada, uma vez que os microrganismos contaminantes poderiam ser carreados para a formulação final e poderiam causar uma contaminação indesejada. Vários métodos de esterilização são destrutivos e não seriam adequados para o tratamento de um extrato contendo substâncias bioativas (calor úmido, calor seco). Nesses casos, um método físico de esterilização é o mais adequado.

Nesse contexto, utilizou-se o procedimento de microfiltração para esterilizar o extrato. Depois de preparado conforme descrito previamente nesse capítulo, o extrato foi filtrado novamente com o auxílio de uma membrana de filtração de 0,22 μm . Após a filtração, o extrato foi novamente plaqueado e não foi constatado crescimento microbiano de qualquer natureza. Portanto, essa foi considerada a metodologia mais adequada para esterilização do extrato e foi aplicada previamente em todos os preparos em que se envolvia a incorporação de extrato em uma forma cosmética (relatados nos próximos capítulos).

5. Conclusão

Os estudos retratados nesse capítulo permitem concluir que:

- O basidiomiceto *Ganoderma lucidum* apresenta inúmeras propriedades, verificadas há centenas de anos, que vem sendo comprovadas cientificamente nos últimos anos, apresentando também interessantes características para utilização em produtos cosméticos.
- O melhor solvente para a obtenção de um extrato rico em substâncias antioxidantes e compostos fenólicos a partir dos esporos de *G. lucidum* foi água destilada a pH 7,0. Essa constatação é extremamente favorável, já que se excluem os gastos com solventes orgânicos. Excluem-se também as etapas de evaporação do solvente para a incorporação no produto (cremes, pomadas, shampoos, etc), já que não há restrições quanto à utilização de extratos aquosos nesses tipos de produtos, sendo, portanto, um processo mais econômico.
- O extrato bruto, sem purificação de moléculas específicas, será estudado nas etapas sobre sua incorporação em produtos cosméticos. Essa é a forma que vem sendo reportada há centenas de anos pela cultura popular como sendo eficaz contra doenças e atuante na melhora da saúde como um todo, e, provavelmente, os compostos ativos no extrato atuam de maneira sinérgica para a geração desses resultados, não sendo necessária a sua purificação nesse momento.
- Foi possível estabelecer a composição mínima do extrato, de forma que se necessário, em uma posterior fórmula comercial, é possível caracterizá-lo e registrá-lo corretamente nos órgãos específicos (ANVISA por exemplo).
- Os esporos carregam consigo muitos microrganismos, e uma posterior contaminação dos produtos em que se aplique o extrato de esporos pode ser evitada utilizando-se uma microfiltração desse extrato.

Capítulo 2. Potencial Antimicrobiano do Extrato de Esporos de *Ganoderma lucidum*

1. Introdução

Apesar de exercerem papel crucial em inúmeros processos biológicos e industriais que beneficiam o homem, os microrganismos também podem provocar inúmeras doenças. Por isso, desde a descoberta acidental da penicilina, a busca por substâncias capazes de inativar microrganismos, principalmente os causadores de doenças, vem aumentando drasticamente. Atualmente, a maioria das substâncias utilizadas como antimicrobianos são produzidas por via fermentativa, sendo muitas delas quimicamente transformadas, de forma a aumentar o seu potencial

Um grande número de agentes antimicrobianos sintéticos foi descoberto e desenvolvido durante o século passado, mas a resistência microbiana às drogas e a sua toxicidade ainda são os maiores impedimentos para o sucesso terapêutico em muitos casos. Por outro lado, medicamentos fitoterápicos podem representar um suplemento seguro e útil às terapias quimioterápicas atuais para o tratamento de doenças infecciosas. Nesse sentido, *Ganoderma* sp. tem sido tradicionalmente usado para tratar doenças infecciosas crônicas, como hepatite crônica ou bronquite, na Ásia, sendo administrada isolada, ou mais frequentemente em combinação com agentes quimioterápicos. No entanto, torna-se necessária a avaliação do crescimento de alguns microrganismos frente a um extrato ao qual se queira atribuir um potencial antimicrobiano, verificando assim a sensibilidade dos microrganismos testados.

A sensibilidade *in vitro* de microrganismos a agentes antimicrobianos pode ser analisada por meio de diversos métodos laboratoriais. No Brasil, são padronizados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão (Norma M2-A8) e o Teste de Sensibilidade a Agentes

Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico (Norma M7-A6), mas existem ainda o teste de diluição em caldo, diluição em ágar, testes automatizados e *E-tests*. A metodologia da ANVISA para o ensaio de discodifusão, documento elaborado a partir das recomendações do *International Collaborative Study* (ICS) e dos regulamentos propostos pelo *United States Food and Drug Administration* (U.S. FDA) foi usada como referência para a realização do teste neste trabalho.

Este é um método padrão quantitativo que se baseia no método de disco-difusão em ágar, e é utilizado para testar patógenos comuns de crescimento rápido e certas bactérias fastidiosas por permitir a adição de sangue e outros suplementos. Além disso, trata-se de um método de fácil execução, e, portanto, grande reprodutibilidade e padronização dos resultados, além de baixo custo e flexibilidade na escolha dos antibióticos (ANVISA, 2008).

A ANVISA diz que: “Os testes de disco-difusão baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem consideração do tamanho do halo, não são aceitáveis. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco-difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos.” Assim, os métodos descritos pela ANVISA devem ser seguidos exatamente, para que se possa obter resultados reprodutíveis e confiáveis.

Os testes de disco-difusão consistem em se semear o microrganismo em estudo por toda a placa, criando um “tapete” de crescimento microbiano. Esse crescimento deve ser controlado por meio da comparação com a escala de McFarland, evitando-se excesso ou falta de microrganismos para a correta interpretação do teste. Depois de padronizado o inóculo, aplica-se com swab estéril a suspensão de microrganismos em placa de Petri contendo meio de cultivo adequado, dentre os quais destaca-se o Mueller-Hinton. Esse meio permite uma grande reprodutibilidade no teste, além de ter baixos teores de substâncias capazes de inibir os antibióticos, permitindo o crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. Além disso, há um grande número de dados disponíveis baseados em testes utilizando esse meio, o que facilita a discussão dos resultados. Por fim, os discos de papel contendo os antibióticos, e as substâncias a

serem testadas são colocados sobre a superfície do ágar inoculado, e as placas são incubadas durante determinados períodos de tempo, em determinadas temperaturas, de acordo com o exigido pelo microrganismo testado (ANVISA, 2008).

De acordo com os tamanhos dos halos de inibição os organismos testados podem ser classificados como sensíveis, intermediários, ou resistentes aos agentes testados, predizendo a capacidade antimicrobiana do extrato testado, permitindo o cálculo da CIM frente aos diversos microrganismos analisados (ANVISA, 2008).

As categorias de níveis de sensibilidade são desenvolvidas comparando-se os diâmetros dos halos às CIMs de um grande número de isolados, incluindo aqueles com mecanismos de resistência conhecidos e relevantes para a classe específica de droga antimicrobiana (ANVISA, 2008). Estas CIMs obtidas e os diâmetros dos halos são analisados em relação à farmacocinética das drogas, sendo analisados também em relação a estudos de eficácia clínica no tratamento de patógenos específicos, conforme apresentado no documento M23 — *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters* do CLSI. Os grupos são descritos como (ANVISA, 2008):

- Sensível: uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose do agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e patógeno, exceto quando contra-indicado;
- Intermediária: inclui isolados com CIMs do agente antimicrobiano que se aproximam de níveis sanguíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas apresentadas por isolados sensíveis. A categoria “intermediária” implica eficácia clínica nos sítios corpóreos, onde as drogas se concentram fisiologicamente (ex., quinolonas e β -lactâmicos na urina) ou quando for possível utilizar uma dosagem maior da droga que a normal (ex., β -lactâmicos). Essa categoria também inclui uma zona-tampão, a qual deverá impedir que pequenos fatores técnicos não sujeitos a controle causem discrepâncias importantes na interpretação, especialmente no caso de drogas com pequenas margens de farmacotoxicidade;
- Resistente: as cepas “resistentes” não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos geralmente atingíveis nos regimes

terapêuticos habituais, e/ou podem ter os diâmetros do halo de inibição dentro de uma faixa de maior probabilidade de ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (ex., β -lactamases), além de a eficácia clínica não ter sido confiável nos estudos terapêuticos.

2. Objetivos

O objetivo desse capítulo é verificar o potencial antimicrobiano do extrato aquoso dos esporos de *Ganoderma lucidum* frente a diferentes espécies microbianas.

3. Materiais e Métodos

Os materiais e métodos foram baseados em ANVISA (2008), e abrangem todas as etapas, desde o preparo do inóculo, inoculação e leitura e interpretação dos dados.

3.1 Controle de Turbidez para preparação do Inóculo

A padronização da densidade de células do inóculo faz-se necessária para que os diferentes testes de sensibilidade possam ter seus resultados comparados entre si. Para isso vários métodos de padronização são propostos, dentre os quais o padrão de McFarland mostra-se o mais simples e direto.

Nesse método, usa-se um controle de turbidez de BaSO_4 , equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5 ou seu equivalente óptico. Nesse trabalho, a solução padrão de McFarland 0,5 de BaSO_4 foi preparada de acordo com a recomendação da ANVISA, da seguinte maneira:

(1) Acrescentou-se uma alíquota de 0,5 ml de BaCl_2 0.048 mol/l (1,175% w/v BaCl_2 * $2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 mol/l (1% v/v), homogeneizando constantemente para manter a suspensão;

(2) A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz de 1 cm e cubeta apropriada para determinar a absorbância. A absorbância da solução padrão de McFarland a 0,5 deve variar de 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nm.

(3) A suspensão de sulfato de bário foi transferida, em alíquotas de 4 a 6 ml, para tubos com tampas de rosca do mesmo tamanho usados para cultivar e diluir o inóculo bacteriano (esses tubos devem ser selados hermeticamente e armazenados em local escuro, à temperatura ambiente para posterior utilização).

(4) O controle de turbidez de sulfato de bário deve ser agitado vigorosamente num misturador mecânico tipo vórtex antes de cada uso, verificando se está uniformemente turbido. Os controles de sulfato de bário devem ser substituídos, ou suas densidades verificadas, todo mês.

3.2 Preparo do Inóculo

Cada cepa testada foi semeada a partir da sua matriz e pelo menos de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico, foram selecionadas da placa de ágar e transferidas para um tubo contendo de 4 a 5 ml de solução salina estéril a 0,9%, sendo o chamado Método da Suspensão Direta das Colônias (ANVISA, 2008). Ajustou-se então a turbidez da cultura com solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. Esse procedimento resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml de *E. coli* ATCC® 25922. Para realizar esta etapa corretamente, usa-se um espectrofotômetro ajustado para leitura em 625 nm.

3.3 Inoculação nas placas de teste

Em ambiente controlado (fluxo laminar), mergulhou-se um swab de alginato estéril (Laborclin) na suspensão de inóculo ajustada previamente. O swab foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, removendo-se assim o excesso de inóculo.

A superfície seca da placa de ágar Müller-Hinton (Laborclin) foi inoculada esfregando-se o swab em toda a superfície estéril do ágar, três vezes no total, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se um swab na margem da placa de ágar.

3.4 Aplicação dos Discos nas Placas de Ágar Inoculadas

Um conjunto predeterminado de discos antimicrobianos (Laborclin) foi colocado na superfície de cada placa de ágar semeada, considerando as recomendações da ANVISA para o cálculo da quantidade de discos. Em geral, deve-se colocar 12 discos, no máximo, numa placa de 150 mm, ou cinco discos numa placa de 100 mm. Nesse trabalho, utilizaram-se placas de 150 mm, aplicando-se 9 discos (3 controles positivos, 1 negativo e 5 diluições do extrato). Os controles positivos tratavam-se de três antibióticos: Estreptomicina 10 µg, Penicilina G 10U e Tetraciclina 30 µg (Laborclin). As diluições do extrato foram aplicadas sobre os 5 discos de teste brancos autoclavados (Laborclin), aplicados previamente na placa. Água destilada estéril sem extrato de esporos de *G. lucidum* foi utilizado como controle.

Para a aplicação dos discos, os mesmos foram pressionados de encontro à placa, de maneira a assegurar o seu contato por inteiro com a superfície do ágar, distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro não exceda 24mm. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 35° C, 5 minutos após a aplicação dos discos. Cada experimento foi feito em triplicata para garantir a precisão.

3.5 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

As placas foram examinadas após 16-18 horas de incubação. Os halos de inibição resultantes devem ser uniformemente circulares e deve haver um tapete contínuo de crescimento. Isso indica densidade de inóculo e sementeação corretas; caso contrário, aparecerão colônias individuais, e o teste deverá ser repetido.

Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados segundo essas considerações, tendo o diâmetro do halo sido aferido com régua milimétrica na parte de trás da placa de Petri invertida com auxílio de luz refletida. O halo de inibição foi considerado como sendo a área sem crescimento detectável a olho nu. De acordo com a ANVISA, “o crescimento de pequenas colônias, detectável apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento, deve ser ignorado. Entretanto, no caso de crescimento discreto de colônias dentro de um halo de inibição evidente, o teste deverá ser repetido com uma cultura ou subcultura pura de uma única

colônia, isolada da placa de cultura primária. Se pequenas colônias continuarem a crescer no halo de inibição, o halo de inibição livre de colônias deve ser medido”.

4. Resultados e Discussão

Na Tabela 11 é possível visualizar as concentrações testadas em cada placa contra cada microrganismo. Foi necessário fazer a correção das concentrações para poder correlacionar os resultados obtidos com o peso seco de esporos utilizados na confecção do extrato. Assim, obteve-se a coluna da concentração em miligramas por mililitros.

TABELA 11: CONCENTRAÇÕES EQUIVALENTES DE EXTRATO DE ESPOROS DE *G. lucidum*

Extrato inicial: 20%		
Pontos de Teste	Concentração%	Concentração (mg/ml)
0	0	0,0
1	4	40
2	8	80
3	12	120
4	16	160
5	20	200

Na Tabela 12 estão indicados os resultados obtidos de cada concentração de extrato para cada microrganismo separadamente. Nota-se que das concentrações testadas, o microrganismo mais afetado foi o *Aspergillus niger*, sendo o maior nível de inibição obtido com a concentração de 160 mg/ml (ponto 4).

TABELA 12: HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS TESTADOS FRENTE AO EXTRATO DE ESPOROS DE *G. LUCIDUM*.

Cepa	Antibiótico (diâmetro – cm)			Concentrações Diâmetros de Inibição (cm)					
	Tet.	Estrept.	Pen.	0	1	2	3	4	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,50 ±0,08	N.D.	1,41 ±0,10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Aspergillus niger</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,85 ±0,07	0,95 ±0,07	1,03 ±0,11	1,04 ±0,01	1,02 ±0,03
<i>Candida albicans</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,93 ±0,06	3,50 ±0,20	4,63 ±0,15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Escherichia coli</i>	1,87± 0,12	N.D.	3,17 ±0,15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: não determinado

Assim, pode-se notar que o extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*, nas concentrações testadas inicialmente (de 40 a 200 mg/ml), não surtiu efeito sobre as cepas bacterianas e de levedura testadas, não provocando nenhum halo de inibição nas placas inoculadas. No entanto, para o fungo *Aspergillus niger* foi detectado um pequeno halo de inibição de crescimento micelial acompanhado de um halo de inibição de esporulação, permitindo que se conclua que o extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* é capaz de inibir o crescimento e esporulação desse fungo.

Especificamente, alguns trabalhos relatam o potencial antimicrobiano da espécie *Ganoderma lucidum*. Nasim & Ali (2011) testaram o extrato etanólico do micélio da espécie e encontraram máxima inibição para *Xhantomonas sp.*, bem como crescimento reduzido de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* pelo método de discodifusão. Já Kamble et al (2011) analisaram extratos utilizando diversos solventes pelo método de poços em ágar. Foram testadas diversas bactérias; contra todas os extratos do micélio

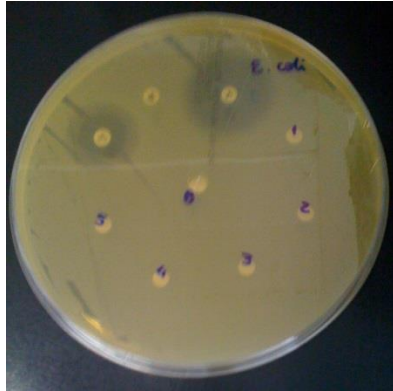
foram eficazes, e foi observado que organismos Gram Positivos foram mais susceptíveis que os Gram Negativos, resultado anteriormente obtido também por Subbraj e colaboradores (2008).

Jonathan & Awatona (2010) encontraram uma zona de inibição de 15,7 mm de extrato aquoso do corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum* contra *S. aureus*. O extrato também inibiu fortemente o crescimento de *C. albicans*, gerando um halo de 18,7 mm. Além disso, o extrato gerou inibição também do crescimento de *A. niger*, chegando a 6,3 mm. Em nenhum trabalho relatou-se o teste do potencial antimicrobiano dos esporos, apenas de outras partes do fungo (micélios, polissacarídeos). Portanto, não há dados com que se possa comparar diretamente os dados obtidos nesse trabalho.

Sridhar e colaboradores (2011) obtiveram resultados que demonstram que extratos aquosos de micélio de *Ganoderma lucidum* foram mais eficazes na inibição do crescimento de *Aspergillus niger* e *Staphylococcus aureus* que os extratos metanólicos, tendo ficado empatado ou levemente abaixo para outros microrganismos testados, o que está de acordo com os resultados obtidos nesse estudo.

Na Figura 10 pode-se verificar a inocuidade do extrato frente a quatro dos microrganismos testados. Também pode-se verificar os halos de inibição de *A. niger*, primeiramente inibindo crescimento (e), e com um zoom (f), ressaltando a inibição inclusive da esporulação do fungo ao redor da região de inibição de crescimento.

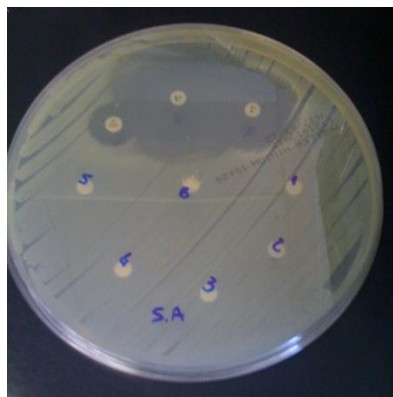
FIGURA 10: PLACAS DE CRESCIMENTO DE *Escherichia coli* (a), *Pseudomonas aeruginosa* (b), *Staphylococcus aureus* (c), *Candida albicans* (d) e *Aspergillus niger* (e) FRENTE AO EXTRATO DE ESPOROS DE *G. lucidum*, COM DESTAQUE AO HALO E INIBIÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE *A. niger* (f).



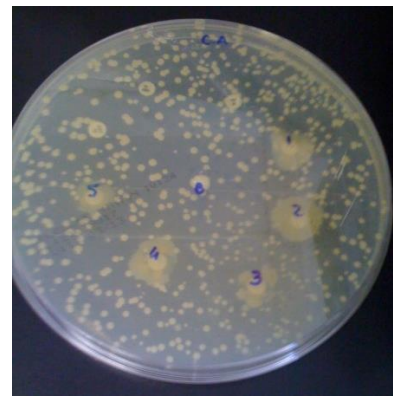
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Papageorgiou e colaboradores (2010) enfatizam o interesse no desenvolvimento de cosméticos livres de conservantes, ou sistemas que se auto preservem. Normalmente, extratos aquosos de espécies de *Ganoderma* apresentam menores

atividades antibacterianas quando comparados com extratos etanólicos ou metanólicos (Jonathan & Awatona, 2010). No entanto, a escolha pelo extrato aquoso deu-se pelo mesmo apresentar o maior nível de substâncias antioxidantes, sendo assim o com o maior potencial efetivo contra o envelhecimento, que foi o quesito decisivo. Este teste trata-se apenas de verificação de outras potenciais funções para o produto contendo o extrato, o que não invalida a escolha do extrato aquoso para a continuidade do trabalho.

De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio, pode-se inferir que a concentração dos extratos de *Ganoderma* tem um papel importante no seu potencial antimicrobiano, conforme também mencionado por Jonathan & Awatona (2010). Danieli (1957) já atentava para o limite entre o potencial antimicrobiano de um extrato e concentrações acima da MIC que podem tornar-se tóxicas ou letais às células hospedeiras.

Os estudos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo* em animais) indicam que *Ganoderma* apresenta um grande espectro de atividades antibacteriana e antiviral; no entanto, dados de estudo em seres humanos são escassos. Polissacarídeos e triterpenóides de *Ganoderma* mostraram atividades contra o vírus Herpes simples, vírus da hepatite B, HIV, vírus de Epstein-Barr em testes *in vitro* ou com modelos animais. *Ganoderma* também pode conter componentes antibacterianos contra bactérias gram-positivas e/ou gram-negativas *in vitro*. No entanto, é difícil extrapolar esses resultados para o ser humano, já que a maior parte destes estudos pré-clínicos foram conduzidos em condições otimizadas com a utilização de doses elevadas de componentes de *Ganoderma* (Gao et al, 2005).

A atividade antimicrobiana do gênero *Ganoderma* sp. já foi relatada por alguns pesquisadores. Ofodile e colaboradores (2012) avaliaram o potencial de extratos de *Ganoderma colossum*, tendo concluído que substâncias isoladas desses extratos exerceram atividade antimicrobiana sobre cepas de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas syringae*.

Li e colaboradores (2012) também relataram o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos de *Ganoderma atrum*. Esses extratos foram capazes de

inibir o crescimento de *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*, atividade que pode estar relacionada com a bioatividade de moléculas como compostos fenólicos e ácidos ganodéricos.

Já Daruliza et al (2012) descreveram a atividade anti-Candida (inibição do crescimento de *Candida albicans*) do extrato metanólico de *Ganoderma* (*G.*) *boninense*, com o teste adicional indicando ausência da toxicidade frente a *Artemia salina* (como também foi feito nesse trabalho, e será relatado no capítulo 5).

Ameri e colaboradores (2011) avaliaram a capacidade antimicrobiana de extratos purificados de três espécies de *Ganoderma*, incluído *Ganoderma lucidum*, contra *Staphylococcus aureus* resistentes isolados pelo método de poços em ágar além de extratos feitos com vários solventes. Sesquiterpenóides de *G. praelongum* provocaram máxima inibição, enquanto di e triterpenóides geraram atividades moderadas.

A observação do potencial antimicrobiano dos extratos de *Ganoderma lucidum* corrobora a sua função como medicamento para diversas doenças, dentre elas algumas de pele; no sudeste da Nigéria médicos tradicionais receitam *G. lucidum* ao povo de Yoruba para o combate de várias doenças (Jonathan & Awatona, 2010). Oei (2003) sugeriu o uso de espécies de *Ganoderma*, especialmente *G. lucidum*, como suplemento alimentar para aumentar a resistência contra infecções microbianas e para fortificar o sistema imune de seres humanos. Os dados atualmente disponíveis não suportam a utilização de *Ganoderma* como antibiótico, mas indicam que podem desempenhar um papel importante como adjuvante para o tratamento de infecções bacteriana e viral

Jonathan & Fasidi (2003) ressaltaram que a bioatividade de metabólitos secundários de cogumelos pode ser diferente de acordo com o solvente utilizado e da parte de onde é extraído, e talvez resultados melhores tivessem sido alcançados testando-se outras extrações, sendo normalmente a água geradora de extratos piores que metanólicos ou etanólicos quando se trata de atividade antimicrobiana (Jonathan & Awatona, 2010).

Nayak e colaboradores (2010) relataram o sucesso da inclusão de extratos de *Ganoderma lucidum* em formulações de pasta de dente, inibindo o crescimento de *C. albicans*. Dessa forma, pacientes imunossuprimidos podem ter uma proteção extra

contra infecções causadas por fungos e leveduras simplesmente por escovar os dentes com o produto certo. Esse produto já está disponível comercialmente desde 1993.

5. Conclusão

- O extrato aquoso dos esporos de *Ganoderma lucidum* mostrou-se inibidor do crescimento de *Aspergillus niger*, bem como inibidor da sua esporulação. Isso é interessante para a aplicação terapêutica do extrato em produtos cosmeceuticos para prevenir ou tratar infecções de pele e anexos causadas por fungos. Esse tipo de aplicação requer, obviamente, estudos mais profundos, mas os resultados preliminares indicam esse importante atributo.
- Nas faixas de concentração de extrato testadas, o extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* não foi eficaz para gerar nenhum tipo de inibição de crescimento de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* nem *Pseudomonas aeruginosa*.

Capítulo 3. Citotoxicidade frente a *Artemia salina*

1. Introdução

Quando se desenvolve um novo produto, inúmeros são os testes que devem ser realizados para assegurar a sua eficácia. No entanto, testes que assegurem também a sua não toxicidade são necessários para que se afunilem ao máximo as possibilidades antes de se trabalhar diretamente com seres humanos ou cobaias para a obtenção dos dados toxicológicos exatos. Isso faz com que os testes posteriores necessitem de um número menor de indivíduos, menos variáveis precisem ser testadas e os testes tornem-se mais rápidos. Assim, a letalidade de organismos simples, com rápido ciclo de vida, tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica frente a determinada substância. Nesse tipo de teste existe apenas um parâmetro envolvido (morte ou vida), o que facilita também o tratamento estatístico dos dados.

Um dos animais que tem sido amplamente utilizado neste tipo de bioensaio é uma espécie de crustáceo marinho, a *Artemia salina* Leach. Da ordem Anostraca (sem carapaça), ela vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo e é adaptada para sobreviver em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70 ‰.

O primeiro trabalho relativo ao uso de camarão marinho em bioensaios foi publicado em 1956 (Cavalcante et al, 2000); os testes utilizando *Artemia salina* como indicadores biológicos tornaram-se mais populares na década de 1980 (Meyer et al, 1982). A partir dessa época, inúmeros artigos tem sido reportados na literatura sobre a análise de produtos e toxinas naturais utilizando-se esse método, além de auxiliar a verificação inicial da toxicidade de extratos de plantas (Meyer et al, 1982; Maciel et al, 2002).

O potencial citotóxico de um extrato vem sendo relacionado com a sua atividade contra neoplasias; portanto, os resultados preliminares obtidos nos testes com *A. salina* podem predizer toxicidade em relação a células saudáveis, negativa, mas também a sua ação contra células cancerosas, positiva. Portanto, é apenas um teste preliminar e o limiar entre a dose segura para um ser humano saudável e a dose eficaz para outro doente deve ser mais profundamente analisado por meio de outros métodos. Algumas vezes, o limiar entre veneno e remédio é muito sutil.

Segundo Ohno et al (1997) o teste utilizando *Artemia salina* é rápido, simples, prático e de baixo custo, pois não requer técnicas assépticas. Além disso, um grande número de amostras pode ser testado e processado adequada e concomitantemente. Complementarmente, Parra et al (2001) mencionam como vantagem a não necessidade de uso de animais, mas contrapondo como desvantagem a falta de uma validação interlaboratorial. Com essa validação, o método se tornaria mais popular; como apresenta uma boa correlação com testes de toxicidade in vitro, tornar-se ia uma referência mais confiável para comparação de resultados (Parra et al, 2001; Siqueira et al, 1998). Por isso, alguns autores como VanHaecke e Persone (1982) o propõe como teste padrão.

2. Objetivos

O objetivo foi avaliar o extrato aquoso dos esporos de *Ganoderma lucidum* em relação ao seu potencial tóxico preliminar. Esse teste é feito analisando-se a taxa de vida x morte do microcrustáceo *Artemia salina*.

3. Materiais e Métodos

A avaliação da toxicidade do extrato aquoso de esporos de *Ganoderma lucidum* frente à *A. salina* foi realizada segundo metodologia descrita por Parra (2001). Foram preparados dois litros de solução de água do mar artificial para incubação dos ovos de

A. salina. A água do mar foi preparada com água destilada com adição de sais conforme a Tabela 13.

TABELA 13: COMPOSIÇÃO DA ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL UTILIZADA NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE ESPOROS DE *G. lucidum* FRENTE A *Artemia salina*

Sal	Concentração (g/l)
NaCl	23,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	11,0
Na ₂ SO ₄	4,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,3
KCl	0,7
pH	9,0

A 300 ml de água do mar foram adicionados, em um frasco de Erlenmeyer, 25 mg de cistos de *A. salina*; o sistema montado possuía aeração e iluminação constantes, conforme a Figura 11. Depois de 24 horas, adicionou-se 15 ml de solução de extrato de levedura a 0,06% para alimentação das larvas. Após 48 horas de incubação, as larvas foram extraídas com uma micropipeta e contadas. Nessa etapa do seu desenvolvimento, as larvas são chamadas de náuplios.

FIGURA 11: APARATO MONTADO PARA A ECLOSÃO DOS CISTOS DE *A. salina*.



Determinou-se a faixa de concentração a ser testada, buscando sempre a maior concentração em que se observasse 0% de mortalidade e a menor concentração em que se deflagrasse 100% de mortalidade. As demais concentrações foram distribuídas dentro desse limite (Veiga et al, 1989), de modo a obter a DL₅₀ (dose letal para 50% da

população) do composto testado. Os dados obtidos que se situaram fora dessa faixa não foram mostrados.

Assim, para efetuar o ensaio, foi utilizada uma placa de 96 poços, conforme mostrado na Figura 12. Foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em poços contendo 200 μ L de solução salina, com frações do extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* a 10%, em concentração tal que gerasse, em cada poço, concentrações finais de 2, 4, 6, 8 e 10 g/l. Um grupo controle também foi preparado nas mesmas condições sem a presença das frações de extrato, tendo apenas água do mar.

FIGURA 12: PLACA DE ELISA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE ESPOROS DE *G. lucidum*, DEPOIS DE INSERIDOS OS NÁUPLIOS.



As diluições do extrato a serem testadas foram preparadas com água do mar, bem como o extrato em si (para evitar falsos positivos ou falsos negativos devido à mudança de pressão osmótica). O controle também foi realizado em triplicata, utilizando-se apenas a solução salina. Os controles foram utilizados também para se ter certeza de que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia salina* fora resultante da toxicidade aos compostos e não por outro fator, como falta de alimentação, por exemplo (Carballo et al, 2002).

Após 48 horas de exposição, foi feita a contagem de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10% da população.

A placa de Elisa foi mantida sob luz artificial e temperatura ambiente por um período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes do grupo controle e dos grupos expostos às frações.

Com os valores obtidos, estimou-se a DL_{50} através do método de Análise de Probitos, também chamados Probits, com 95% de intervalo de confiança. Esse tipo de análise estatística é empregada quando se pode esperar apenas dois tipos de resultados após um ensaio, o que ajustava-se à necessidade para o teste com *A. salina* (os resultados possíveis eram apenas “vivo” ou “morto” após o teste).

4. Resultados e Discussão

A Tabela 14 apresenta as concentrações utilizadas para o cálculo do DL_{50} e o log dos valores respectivamente. Além disso, nela estão computados o número de óbitos de *A. salina* ocorridos na presença das diferentes concentrações das frações testadas e os valores de probits respectivos.

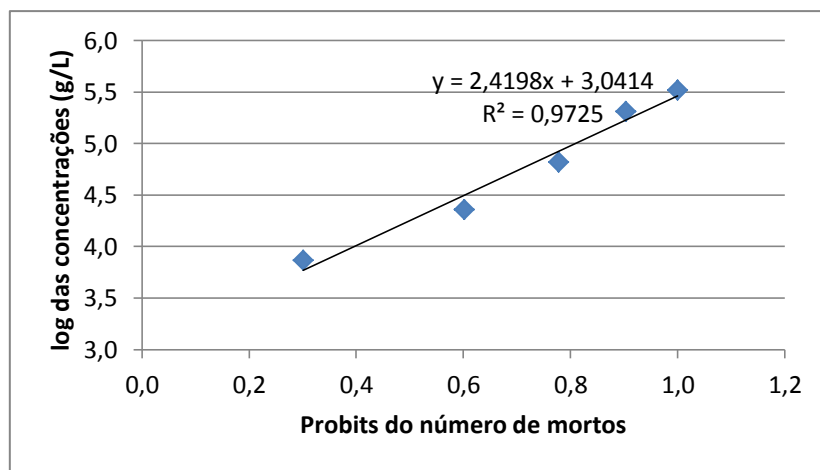
TABELA 14: CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DOS ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* E TAXA DE MORTE DOS NÁUPLIOS, ACOMPANHADO DOS SEUS RESPECTIVOS VALORES EM TERMOS DE LOG E PROBIT.

CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO		NÁUPLIOS	
g/l	Log	% mortos	Probit
2	0,3	13%	3,870
4	0,6	26%	4,360
6	0,8	43%	4,820
8	0,9	62%	5,310
10	1,0	70%	5,520

Com base na Tabela 14 foi possível fazer a regressão linear dos dados, gerando a curva mostrada na Figura 13, conforme estabelecido pelo método de análise de Probits. A partir da regressão gerada, utilizando-se a equação de reta, foi possível iniciar o cálculo do DL_{50} do extrato de esporos de *G. lucidum* para *A. salina*. Inicialmente, substituiu-se a variável “y” (mortalidade) por 5 (valor probit correspondente a 50% de mortalidade e calculou-se o valor da variável “x” correspondente (concentração de

extrato). Como nesse gráfico a variável concentração estava expressa em termos de log, aplicou-se a esse resultado o antilog (obtido em calculadoras online) e obteve-se assim o valor de DL_{50} , que foi de 6,48 g/l. Esse valor é mais de 500 vezes maior que a concentração de extrato adicionado ao creme, indicando que essa concentração é segura, segundo esse teste.

FIGURA 13: REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS DE CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DE ESPOROS DE *G. lucidum* VERSUS PROBITS DO NÚMERO DE INDIVÍDUOS DE *A. salina* MORTOS



Esse resultado mostra, num primeiro momento, a concentração capaz de matar 50% dos indivíduos de *A. salina* testados. Assim, torna-se um dado toxicológico preliminar importante, pois já descarta alguns níveis de concentração a serem testados em um próximo experimento, com outra espécie de animal. No entanto, alguns estudos mostram que os valores de DL_{50} obtidos no ensaio com *Artemia salina* normalmente são muito maiores para roedores, que por sua vez são menores, mas mais próximos aos obtidos para humanos. Isso significa que normalmente a sensibilidade a determinada substância aumenta à medida que diminui a complexidade do ser vivo analisado. Disso, pode-se inferir que utilizar apenas esse dado para assegurar a inocuidade do extrato já é um cuidado muito maior do que o necessário, pois muito provavelmente quando testado em roedores e pequenos mamíferos, esse valor tende a aumentar bastante.

A toxicidade sobre *A. salina*, que é um bioensaio rápido e conveniente como “screening” prévio, pode ser usado como um primeiro passo na análise toxicológica de um extrato. As frações ou substâncias ativas são, posteriormente, testadas em ensaios de citotoxicidade, obtendo-se uma boa correlação. Mc Laughlin et al (1998) obtiveram a correlação de que os valores de ED₅₀ encontrados para testes de citotoxicidade in vitro eram, em geral, 1/10 dos valores encontrados nos testes realizados com *Artemia salina*.

Alguns estudos sobre a toxicidade de componentes de *G. lucidum* (Figlas e Curvetto, 2009) mostram que em humanos, os níveis de toxicidade são muito baixos, normalmente não causando efeitos colaterais como mudanças de peso corporal nem dos órgãos em geral, nem mudanças em parâmetros hematológicos. O extrato do micélio de *G. lucidum* foi testado em roedores e o DL₅₀ encontrado foi de 38 g/kg. Já o DL₅₀ para o polissacarídeo de *G. lucidum* foi de 5 g/kg, e ambos os valores são muito maiores do que as doses recomendadas diariamente pelos médicos ou pelas bulas dos produtos (são da ordem de miligramas por dia, sem considerar que essa dosagem ainda deve ser dividida pelo peso da pessoa que o consome).

Li et al (2012) avaliaram a toxicidade aguda e genética do esporo de *Ganoderma lucidum* em pó encapsulado, e encontraram que doses maiores que 10 g/kg ainda não eram tóxicas para cachorros, ratos e coelhos. Os mesmos autores ministraram uma dose de 4,5 g/kg para ratos durante 30 dias e não verificaram nenhum tipo de reação tóxica nem efeitos colaterais.

Ganoderma lucidum é clinicamente prescrito em várias formas. O esporo pode ser injetado na forma de uma solução, enquanto o micélio pode ser ingerido na forma de sopas, xaropes, chá, tablets, cápsulas, tinturas ou pílulas. A dose em forma de tintura (20%) é de 10 ml três vezes ao dia; de tablets é de 1g três vezes ao dia e xarope, 4-6 ml por dia (Figlas e Curvetto, 2009).

5. Conclusão

- A partir do ensaio com *Artemia salina* foi possível estabelecer o DL₅₀ do extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*, sendo um ponto de partida para outros ensaios toxicológicos mais profundos e exatos.
- O resultado obtido indica que é possível que haja certo grau de ação do extrato contra células cancerígenas, indício esse que deve ser testado com metodologias específicas. Além disso, usos populares indicando ação dos extratos desse cogumelo contra câncer indicam que o indício aqui relatado pode ser verdadeiro.
- Não foram verificados dados toxicológicos a respeito dos extratos de esporos de *Ganoderma lucidum*, tratando-se, portanto, de dados inéditos e de grande importância acadêmica e científica, bem como médica e farmacológica.

Capítulo 4. Formulação cosmética contendo extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* e ensaios de estabilidade

1. Introdução

A estabilidade de um produto está diretamente correlacionada com a manutenção das suas propriedades através do tempo e mediante situações adversas. Muitas variáveis podem estar relacionadas com essas propriedades, como seu processo de fabricação, tipo e material de embalagem, transporte e condições ambientais, e todos esses fatores podem influenciar na sua estabilidade. No desenvolvimento de novos produtos, especialmente quando um novo ativo é adicionado a uma formulação base, como antioxidantes, melhoradores reológicos e sensoriais, extratos vegetais, etc, muitos estudos devem ser realizados com o objetivo de obter um produto estável, seguro e eficaz.

A análise da estabilidade de cosméticos fornece informações que indicam a estabilidade relativa do produto em diferentes condições às quais ele possa estar sujeito, desde sua produção até o final de sua validade. No entanto, as avaliações de estabilidade são sempre relativas, pois as propriedades do produto variam com o tempo e dependem de vários fatores. Assim, algumas modificações nas suas propriedades, desde que dentro dos parâmetros pré-estabelecidos, podem ser aceitas.

Vários métodos analíticos vêm sendo usados como suporte na avaliação de envelhecimento de produtos cosméticos, como microscopia óptica, scanning de calorimetria diferencial e difração por raio-X. Todos esses métodos vêm demonstrando que o envelhecimento de um produto cosmético está associado basicamente ao processo de cristalização lenta das gotículas dispersas (Masalova et al, 2006), o que pode causar diversos tipos de fenômenos na emulsão, e conseqüentemente, causar a sua desestabilização.

1.2 Estabilidade Preliminar

O teste de estabilidade preliminar é uma das primeiras análises a ser realizada e tem por finalidade selecionar a melhor formulação do produto. Consiste em submeter uma amostra da formulação a condições extremas de temperatura e fazer ensaios sobre vários parâmetros, de acordo com o tipo de produtos cosméticos e do objetivo da análise. O teste é feito durante 12 a 15 dias, sendo a primeira análise realizada 24 horas após a manipulação do produto ou da sua preparação, e uma nova análise realizada a cada 24 horas. Os parâmetros que podem ser analisados durante esse teste são: aspecto, cor e odor após o congelamento e descongelamento, e estabilidade da emulsão após centrifugação.

1.2.1 Ciclos de Congelamento-Descongelamento

O teste que envolve ciclos de congelamento e descongelamento permite que seja avaliada a estabilidade de um produto por meio da antecipação do choque de temperatura que o produto poderia sofrer durante o seu armazenamento ou transporte. Emulsões óleo-em-água (O/A) tem a tendência de desestabilizar frente a ciclos de congelamento/descongelamento (C/D), devido ao grande volume de expansão da fase contínua durante o congelamento. Além disso, quando as gotículas de óleo cristalizam antes da fase aquosa contínua, a emulsão desestabiliza devido à formação de uma rede de agregados cristalinos que coalescem, fazendo com que a fase oleosa dispersa funda-se (Gosh & Rousseau, 2009). Os mesmos autores preconizaram que a escolha do surfactante e a composição da fase oleosa impactam fortemente a estabilidade de emulsões O/A a ciclos C/D. Esse tipo de desestabilização pode causar problemas como separação de fases, formação de cristais, compactação, perda de propriedades sensoriais e reológicas e danos aos princípios ativos, o que não é desejável.

Neste teste, as amostras são armazenadas em temperaturas alternadas em intervalos regulares de tempo, e o número de ciclos é variável. Alguns dos limites sugeridos pela Anvisa são:

- Ciclos de 24 horas à temperatura ambiente e 24 horas a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Ciclos de 24 horas a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 24 horas a 4°C .
- Ciclos de 24 horas a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 24 horas a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Ciclos de 24 horas a $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 24 horas a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Quando chegam ao fim os ciclos de temperatura, as características físicas e organolépticas são avaliadas novamente, comparando-se às características originais do produto. Dependendo do resultado dessa análise inicial, uma reformulação ou adequação da fórmula atual pode ser necessária.

1.2.2 Centrifugação

O teste de centrifugação visa determinar o comportamento de uma emulsão simulando condições de transporte e armazenamento ao extremo. A força da gravidade que atua na amostra faz com que as partículas da emulsão se movam, o que gera um stress na amostra e instabilidades possam se formar. Essa atividade pode causar precipitação, separação de fases, coalescência, etc. A amostra é centrifugada durante um determinado período de tempo, com temperatura e velocidade pré-determinados, seguido de avaliação visual (ANVISA, 2004).

1.3 Estabilidade Acelerada

Este teste é realizado para prever a estabilidade do produto por um intervalo de tempo maior que no teste de estabilidade preliminar, o que ajuda a prever o seu tempo de vida e permite verificar a compatibilidade entre a formulação e a sua embalagem, em condições não extremas. Este tipo de estudo preditivo pode ser usado também para avaliar modificações na formulação do produto ou processo de produção. As amostras são acondicionadas em frascos de vidro ou na embalagem do produto final

É importante não completar o volume total do frasco para possíveis trocas gasosas (ANVISA, 2004).

O teste de estabilidade acelerada é realizado durante pelo menos 90 dias, embora possa ser conduzido durante seis meses ou até um ano, dependendo das características do produto e da finalidade do ensaio (ANVISA, 2004). As amostras podem ser submetidas ao aquecimento (em estufa com temperatura controlada), temperaturas reduzidas (em refrigeradores), radiação luminosa, etc. Também é possível simular o transporte de produtos, submetendo as amostras a um movimento real (colocando-os em um caminhão de transporte, por exemplo) ou ao movimento artificial, sendo mantidos em agitadores.

Diversos parâmetros podem ser avaliados durante uma análise de estabilidade acelerada. Eles são definidos pelo pesquisador e dependem das características do produto e os ingredientes usados na fórmula. Durante toda a avaliação, a amostra deve ser comparada a um branco, e em relação a um padrão arbitrado inicialmente como aceitável, a fim de verificar sinais de instabilidade. Esta é uma avaliação importante, já que mudanças são indesejáveis, uma vez que um produto cosmético normalmente é mantido por períodos variáveis em prateleira antes da compra, e depois de abertos, podem ser usados por muitos dias, semanas ou meses, entrando em contato direto com o consumidor e com o ambiente, que são fontes potenciais de contaminação.

Geralmente, em um teste de estabilidade acelerada são avaliadas as seguintes características (ANVISA, 2004):

- Organolépticas: aspecto, cor, odor e sabor, se aplicável;
- Físico-químicas: pH, densidade, viscosidade e, em alguns casos, o acompanhamento das moléculas ativas na formulação;
- Contaminação microbiológica: contagem microbiana e/ou identificação de microrganismos contaminantes.

1.3.1 Aspecto

O aspecto geral dos produtos pode ser avaliado em relação à não ocorrência de precipitação, separação de fases, ou de aparecimento de turbidez no caso de produtos translúcidos. A aparência do produto está relacionada com a sua forma física, e pode ser descrita como pó, granulado seco, pastoso, cristalino, gel, líquido, viscoso, volátil, homogêneo, heterogêneo, transparente, opaco, leitoso e inúmeros outros, e também deve permanecer inalterada. A condição da amostra pode ser descrita como normal, sem qualquer alteração ou levemente alterada, precipitada, turva, sempre dependendo do tipo de produto analisado (ANVISA, 2004).

1.3.2 Cor e Odor

A cor e o odor, em geral, devem permanecer inalterados ao longo do tempo. No entanto, quando há compostos naturais na formulação, ela torna-se passível à ocorrência de modificações leves, que são geralmente aceitas pelos consumidores. A amostra a ser avaliada deve ser sempre comparada com um padrão, acondicionada em frasco do mesmo tipo e submetida às mesmas condições (ANVISA, 2004).

1.3.3 pH

Formulações de cosméticos para a pele podem normalmente ter uma faixa de pH entre 5,5 e 7,5. A variação ao longo do tempo pode indicar algum problema, tal como reações indesejáveis entre os componentes do creme, entre o creme e a embalagem ou pode indicar algum grau de contaminação microbiana. Além disso, a diminuição do pH pode estar relacionada à oxidação de aldeídos voláteis a ácidos carboxílicos ou hidrólise enzimática de lipídios, o que libera ácidos graxos livres (ANVISA, 2004).

1.3.4 Atividade de Água

A água tem um papel crucial em uma formulação cosmética, pois afeta as suas propriedades reológicas, textura, consistência, viscosidade e tempo de prateleira. A presença de água ocorre em termos de atividade de água e água ligada, resultando em teor de água total, expressa como umidade.

A água ligada é aquela que está diretamente ligada às moléculas da formulação, e não pode ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação. Essas moléculas não estão disponíveis para reações físicas (evaporação), químicas (oxidação/escurecimento) ou microbiológicas, e é expressa em termos de atividade de água (A_w), que pode variar de $A_w = 0,000$ (quando não há água disponível) até $A_w = 1,000$ (água pura).

Um líquido puro, quando em contato com o ar, perde moléculas de água por evaporação. Se um líquido é mantido em um recipiente fechado na presença de ar, as moléculas do meio líquido evaporam até um ponto de equilíbrio. A partir deste ponto, um fenômeno de compensação ocorre: para cada molécula evaporada, outra se condensa, exercendo uma pressão de vapor.

Ao adicionar um soluto em um líquido (o que ocorre durante a preparação de uma emulsão, por exemplo) a evaporação de moléculas é menos observada, portanto a pressão de vapor é reduzida. Com base nesses conceitos, a atividade de água (A_w) de uma solução ou produto pode ser definida como a relação entre a pressão de vapor da solução (p) e a pressão de vapor de solvente puro (p_0), normalmente a água pura ($p=1$), a uma mesma temperatura (equação 1).

$$a_w \equiv p/p_0 \quad (2)$$

Para cosméticos e produtos de higiene para uso tópico, é importante medir a atividade de água, pois é sabido que uma maior atividade de água fornece maior sensação de hidratação e "frescor", e a água ligada é responsável pelo transporte dos princípios ativos até o seu local de ação. A atividade de água também se correlaciona à capacidade de hidratação do produto, e juntamente com pH, temperatura

e oxigênio, é um dos fatores que mais influencia na estabilidade de produtos cosméticos e alimentícios.

1.3.5 Espalhabilidade

A espalhabilidade de um produto pode ser definida como a facilidade com que uma substância pode ser expandida em uma superfície, em um tempo determinado, sob uma determinada pressão. A maior parte dos métodos de determinação de espalhabilidade mede a sua resistência à deformação. Ela pode ser avaliada em testes sensoriais, mas esse tipo de teste só é usado para avaliar a aceitação do consumidor, e proporciona resultados muito subjetivos. Assim, existem algumas metodologias mais objetivas para quantificar essa propriedade.

Nestes testes objetivos, a espalhabilidade é calculada como a área total alcançada pela dispersão de uma dada quantidade de creme. É calculada pela equação (2):

$$E_i = (d^2 \cdot \pi)/4 \quad (3)$$

onde:

E_i : espalhabilidade da amostra para uma dada massa (i) (cm^2);

d : diâmetro médio de espalhamento da amostra após o ensaio (cm).

2. Objetivos

Esse capítulo tem como objetivo avaliar a estabilidade preliminar e a estabilidade acelerada de produtos cosméticos contendo extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*, verificando assim a compatibilidade entre formulação e extrato, bem como a evolução das propriedades dos produtos com o passar do tempo sob condições específicas.

3. Material e Métodos

Antes de se iniciar os estudos de estabilidade foi realizada uma triagem das formulações cosméticas mais adequadas para receber o extrato de esporos de *G. lucidum*. Várias formulações prontas foram selecionadas (Creme Aniônico, Creme Catiônico, Creme Não-Iônico, Creme-Gel, Loção Corporal, Gel Petrolato, etc). Buscava-se uma fórmula com fácil espalhabilidade e que incorporasse por completo o extrato, sem separação de fases evidente. Depois de escolhidas as duas melhores formulações é que se deu início de fato à análise de estabilidade das mesmas.

3.1 Estudos de Estabilidade

Para estudar a estabilidade da adição do extrato de esporos de *G. lucidum* em produtos cosméticos foram escolhidas duas formulações para a adição do mesmo. Assim, utilizou-se um creme aniônico e um creme gel, da marca EMFAL, de acordo com a composição no Quadro 2 (nomes no formato INCI Name -). Não possuímos a sua composição centesimal por não ser disponibilizada pela empresa.

QUADRO 2: COMPOSIÇÃO DO CREME E CREME GEL UTILIZADOS NOS TESTES DE ESTABILIDADE.

CREME ANIÔNICO	CREME GEL
Water, Glycerin, Propylene Glycol, Cetearyl Alcohol/Sodium Cetearyl Sulfate, Octyl Stearate, Acetylated Lanolin Alcohol, DC 350, Cyclomethicone, BHT, Mineral Oil, Disodium EDTA, Methylparaben, Propylparaben, Imidazolidinyl Urea.	Water, Hydroxyethylcellulose, Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Cetearyl Alcohol/Dicetyl Phosphate Cetearyl, Cetyl Palmitate, BHT, Propylene Glycol, Disodium EDTA, Methylparaben, Propylparaben, Cyclomethicone, Imidazolidinyl Urea, Styrene/PVP Copolymer, Sodium Hydroxide.

Um quilo de cada formulação base foi dividido em duas partes: a primeira parte de 500 g recebeu 5 ml de um extrato aquoso de esporos de *Ganoderma lucidum* (proporção esporos:solvente de 1:40) e os outros 500 g não receberam nenhum outro aditivo. Cada porção de 500 g de creme assim preparada foi dividida em 5 frascos de plástico, com capacidade para 120 g, cada uma contendo 100 g de creme hidratante. Os frascos foram distribuídos para avaliar a resposta em relação a algumas condições.

Um frasco de creme contendo os extratos de *G. lucidum* (de agora em diante chamado de Creme Ganoderma) e um frasco contendo apenas o creme base (chamado Creme Controle) foram deixados em uma caixa de papelão fechada, à temperatura ambiente. O mesmo foi feito deixando-se um conjunto de cremes na geladeira, outro em estufa, outro em um shaker e outro em uma estante iluminada. O mesmo foi feito para o creme-gel, sendo esses produtos denominados Gel Ganoderma e Gel Controle.

Esses cremes e cremes-géis foram submetidos a diferentes tipos de estresse para verificar a sua estabilidade durante 90 dias (estabilidade acelerada). As condições testadas foram temperatura (temperatura ambiente, estufa a 37°C, geladeira a 5°C), a exposição à luz (3500Lux, 12 h/12 h) e agitação (agitador de 120 rpm, 30°C).

Os parâmetros dos testes de estabilidade foram definidos de acordo com a norma brasileira para a sua realização, que consta no Guia de Avaliação de Estabilidade em Cosméticos, de autoria da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Este documento dá as diretrizes gerais para a realização dos testes, mas não é restritiva, ou seja, de acordo com a sua realidade ou necessidades os avaliadores podem realizar alterações nas metodologias lá descritas.

3.1.1 Estabilidade Preliminar

A estabilidade preliminar dos produtos formulados foi testada por meio de ciclos de congelamento-descongelamento e centrifugação.

3.1.1.1 Ciclos de Congelamento-Descongelamento

Em embalagens de plástico adequado cerca de 50 g de amostra foi submetida a seis ciclos de temperatura. Os ciclos de congelamento e descongelamento alternados foram realizados alternando-se a incubação dos produtos durante 24 horas em estufa ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) e 24 horas em freezer ($-4 \pm 2^\circ\text{C}$). Assim, cada ciclo estava completo depois de 48 horas, resultando em 12 dias de experimento.

3.1.1.2 Centrifugação

As amostras para o teste de centrifugação foram tiradas após ciclo completo de congelamento/descongelamento (ou seja, a cada 48 h) após o ciclo em estufa (situação na qual os cremes não estão congelados e são facilmente manipuláveis). Em tubos de centrífuga cônicos foram pesadas em balança analítica 5 g de cada amostra e centrifugadas a 10000 rpm (16800 g) por 30 minutos em temperatura ambiente. A não ocorrência de separação de fases não garante sua estabilidade, mas permite que a formulação possa ser submetida a um teste de estabilidade acelerada sem reformulação. A ausência do fenômeno de *creaming* ou do aparecimento de fase oleosa indica que essa emulsão, em condições de gravidade normal, pode ser fisicamente estável.

3.1.2 Estabilidade Acelerada

Para o teste de estabilidade acelerada, foram realizadas análises de amostras retiradas nos dias 0, 14, 28, 42, 56, 70 e 90 dias após a produção dos cremes. Os recipientes contendo as amostras foram coletados em cada local (temperatura ambiente, geladeira, estufa, agitador e sob a luz) e 5 g foram coletados para análise visual de odor, aparência e cor. Depois disso, a atividade de água foi medida, e em seguida foi realizada medição de pH e espalhabilidade. Para facilitar a manipulação, os cremes foram numerados de 1 a 5 (como Brancos) para os cremes sem extrato de esporos de *G. lucidum*, de 6 a 10 (como Amostra) para os cremes com o extrato, como Pomadas (Brancos) de 1 a 5 os creme-géis sem o extrato e Pomadas (Amostra) de 6 a 10 os creme-géis com o extrato, conforme pode ser visto na Figura 14. Como se pode notar, as amostras 5 e 10 tanto de creme como de creme gel foram acondicionadas em potes de vidro para analisar a influência da luz na estabilidade das emulsões.

FIGURA 14: CREMES NUMERADOS DE 1 A 5 SEM EXTRATO, NOMEADOS BRANCOS (A); CREMES NUMERADOS DE 6 A 10 COM EXTRATO, NOMEADOS AMOSTRA (B); CREMES-GEL NUMERADOS DE 1 A 5 SEM EXTRATO, NOMEADOS BRANCOS (C); CREMES-GEL NUMERADOS DE 6 A 10 COM EXTRATO, NOMEADOS AMOSTRA (D).



(a)



(b)



(c)



(d)

3.1.2.1 Aspecto, Cor e Odor

As análises foram realizadas por comparação visual, em condições de luz branca, conforme indicado pelos métodos convencionais. O odor foi avaliado por medidas diretas (método padrão) de cheiro. A aparência, odor e cor foram avaliados por comparação entre os aspectos iniciais e finais amostras de Creme Ganoderma e Gel Ganoderma e os controles (Creme Controle e Gel Controle).

3.1.2.2 pH

A determinação do pH foi realizada em uma dispersão aquosa de 10% (m/v), obtida com uma dispersão de 0,5 g da amostra dos cremes e géis em água destilada, homogeneizada com um agitador do tipo vórtex, e a leitura foi feita posteriormente por meio de pHmetro digital, em triplicata. O eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa. Os valores de pH entre 5,5 e 7,5 são compatíveis com o pH cutâneo e, portanto, foram usados como critério de estabilidade. Além disso, a oscilação desses valores ao longo do tempo também foi verificada.

3.1.2.3 Atividade de Água

A medida da atividade de água das amostras foi realizada no equipamento Aqua-Lab X. O equipamento foi calibrado periodicamente com os padrões adequados.

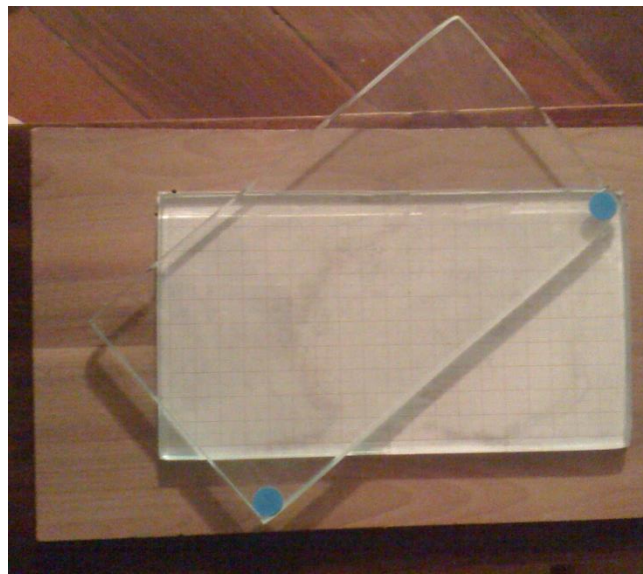
3.1.2.4 Espalhabilidade

Para determinar a espalhabilidade foi empregado um dispositivo especialmente construído para essa análise (Figura 15). Em uma placa retangular de madeira, uma folha de papel milimetrado foi fixada, e uma placa de vidro retangular (10 cm x 20 cm)

foi afixada sobre ele. A amostra (0,1 g) foi colocada na placa de vidro e outra placa de vidro móvel, de peso conhecido, (325 g) foi colocada em cima. Após três minutos, um peso de 250 g foi reiteradamente adicionado até atingir um quilo (quatro pesos, 250 g cada um).

Para medir a área sobre a qual o creme foi capaz de se espalhar, o papel milimetrado do dispositivo foi utilizado. As medições foram feitas em duplicatas.

FIGURA 15: DISPOSITIVO PARA DETERMINAÇÃO DA ESPALHABILIDADE DOS CREMES E GÉIS



4. Resultados e Discussão

4.1 Escolha de Formulação

Diversas bases foram testadas para verificar a estabilidade da incorporação do extrato de esporos de *G. lucidum*, dentre elas cremes não-iônicos, cremes catiônicos, géis e pomadas. Devido à natureza antioxidante do extrato que estava sendo testado, preferiu-se escolher bases que apresentaram rápida absorção na pele, tendo-se escolhido o creme aniônico (com possível função posterior cosmética) e o creme-gel (com possível função posterior médica). Outras bases podem também ser utilizadas, mas para o critério aplicado (fácil e rápida absorção) essas foram as bases que melhor atenderam aos critérios. Devido à impossibilidade de se avaliar com maior profundidade

a ação dessas bases no carreamento dos ativos, é impossível afirmar que se tratam das bases que levam o ativo até as camadas da pele que mais necessitam, ou que protejam de alguma forma as moléculas ativas. Esse tipo de análise requereria testes e equipamentos específicos, aos quais não temos acesso e que nesse tipo de estudo preliminar de compatibilidade de formulação não se faz necessária.

Chen & Wang (2012) enfatizam os benefícios do uso de antioxidantes no uso tópico contra os danos causados pela radiação ultravioleta. No entanto, os mesmos autores reforçam que há ainda uma deficiência nos métodos de medida da concentração e dos níveis de atividade dos antioxidantes nesses produtos. Como resultado, é difícil para os consumidores e médicos avaliar e selecionar produtos comerciais baseados em evidências rapidamente comprováveis.

4.2 Teste de Estabilidade Preliminar e Acelerada

Após escolher as duas formulações base, a etapa seguinte foi realizar o teste de estabilidade para verificar se a compatibilidade assumida entre formulação e extrato era mantida mesmo após condições extremas. Verificada essa estabilidade, pôde-se iniciar o teste de estabilidade acelerada.

4.2.1 Estabilidade Preliminar

4.2.1.1 Ciclos de Congelamento-Descongelamento

Após 6 ciclos de congelamento e descongelamento, o aspecto das formulações cosméticas foi avaliado. O creme e o gel, e tanto o Controle quanto o Ganoderma, não apresentaram qualquer alteração em termos de odor e cor, nem em termos de aspecto geral. Não houve separação de fases nem qualquer efeito de desestabilização da emulsão, como cremeação, coalescência, separação de fases, etc.

4.2.1.2 Centrifugação

A centrifugação foi realizada complementarmente aos ciclos de congelamento-descongelamento para verificar sinais de instabilidade indicativa da necessidade de uma reformulação. As duas formulações, tanto Gel quanto Creme, tanto Controle quanto Ganoderma, não apresentaram alterações em relação à sua aparência original

Considerando os resultados desses dois testes, pôde-se concluir que não seria necessária qualquer reformulação, uma vez que não foram observadas modificações estruturais quando as amostras foram expostas a condições críticas. Assim, elas puderam ser analisadas quanto à sua resposta aos testes de estabilidade acelerada.

4.2.2 Estabilidade Acelerada

4.2.2.1 Cor, Aspecto e Odor

As características organolépticas determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor. Acompanhar a evolução dessas características em um teste de estabilidade acelerada visa garantir que as possíveis mudanças que podem ocorrer no produto não serão percebidas pelos sentidos e não trarão qualquer prejuízo ao produto ou à sua segurança.

Os resultados obtidos para os aspectos gerais (cor, odor e aspecto) estão resumidos nas tabelas 15 e 16. As únicas amostras que sofreram alterações leves foram os géis, tanto controle quanto Ganoderma, quando submetidos à luz: no final do experimento (90 dias) apresentavam coloração levemente amarelada. No entanto, isso pode ser facilmente resolvido em termos de produto final, acondicionando o mesmo em embalagem protegida da luz (opaca) e informando no rótulo que o produto deve ser guardado ao abrigo da luz.

TABELA 15: AVALIAÇÃO DE ASPECTO, COR E ODOR DOS CREMES CONTROLE E GANODERMA AO LONGO DO TEMPO DA AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA (90 DIAS).

CONDIÇÃO	TEMPO (DIAS)	CREMES GANODERMA					
		CONTROLE			GANODERMA		
		ASPECTO	COR	ODOR	ASPECTO	COR	ODOR
Temperatura ambiente (escuro)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Estufa (37°C)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Refrigerador (4°C)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Shaker (27°C, 120rpm)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Sob Iluminação	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	L	N	N	L	N
90	N	L	N	N	L	N	

Legenda:

Aspecto	N – normal, sem alteração	Cor	N – normal, sem alteração	Odor	N – normal, sem alteração
	L – levemente modificado		L – levemente modificado		L – levemente modificado
	M – modificado		M – modificado		M – modificado
	I – intensamente modificado		I – intensamente modificado		I – intensamente modificado

TABELA 16: AVALIAÇÃO DE ASPECTO, COR E ODOR DOS GÉIS CONTROLE E GANODERMA AO LONGO DO TEMPO DA AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA (90 DIAS).

CONDIÇÃO	TEMPO (DIAS)	CREMES GANODERMA					
		CONTROLE			GANODERMA		
		ASPECTO	COR	ODOR	ASPECTO	COR	ODOR
Temperatura ambiente (escuro)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Estufa (37°C)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Refrigerador (4°C)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Shaker (27°C, 120rpm)	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	N	N	N	N	N
Sob Iluminação	1	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	25	N	N	N	N	N	N
	40	N	N	N	N	N	N
	55	N	N	N	N	N	N
	70	N	L	N	N	L	N
90	N	L	N	N	L	N	

Legenda:

Aspecto	N – normal, sem alteração	Cor	N – normal, sem alteração	Odor	N – normal, sem alteração
	L – levemente modificado		L – levemente modificado		L – levemente modificado
	M – modificado		M – modificado		M – modificado
	I – intensamente modificado		I – intensamente modificado		I – intensamente modificado

Em termos de cor e odor, em todas as condições testadas não houve modificação das características iniciais, indicando que as formulações mantiveram as suas características iniciais e não se constatou indícios de instabilidade nem contaminação.

4.2.2.2 pH

Os pHs tanto dos cremes quanto dos géis se mantiveram praticamente constantes ao longo do tempo. As médias dos pHs são mostradas nas tabelas 17 e 18 (os dados intermediários não estão mostrados). O pH dos cremes, tanto Ganoderma quanto Controle, manteve-se ao redor de 5,00 durante o experimento. Já os cremes-géis apresentaram pH ao redor de 7,35, durante todo o experimento. A pouca alteração do pH é um indicativo da não ocorrência de reações críticas entre o creme e os aditivos, nem entre o creme e a embalagem, nem contaminação microbiana.

TABELA 17: VALORES DE pH MÉDIO DOS CREMES DURANTE O TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA

	pH MÉDIO
CREME CONTROLE	
Temperatura Ambiente	5,04±0,13
Estufa	5,03±0,19
Refrigerador	5,09±0,13
Shaker	5,02±0,18
Sob Iluminação	5,08±0,20
CREME GANODERMA	
Temperatura Ambiente	5,02±0,14
Estufa	5,02±0,06
Refrigerador	5,01±0,12
Shaker	5,04±0,15
Sob Iluminação	5,02±0,06

TABELA 18: VALORES DE pH MÉDIO DOS GÉIS DURANTE O TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA

	pH MÉDIO
GEL CONTROLE	
Temperatura Ambiente	7,41±0,12
Estufa	7,42±0,08
Refrigerador	7,38±0,06
Shaker	7,38±0,08
Sob Iluminação	7,38±0,07
GEL GANODERMA	
Temperatura Ambiente	7,33±0,06
Estufa	7,34±0,06
Refrigerador	7,36±0,07
Shaker	7,34±0,06
Sob Iluminação	7,30±0,07

4.2.2.3 Atividade de água

A atividade de água dos cremes, tanto Ganoderma quanto Controle, variou pouco, conforme pode ser verificado nas Tabelas 19 e 20. Num contexto geral, pode-se perceber que a atividade de água manteve-se quase que constante (entre 0,983 no mínimo e 0,992 no máximo). Isso mostra que a estabilidade da emulsão não foi afetada com a adição do extrato de Ganoderma, pois caso contrário a água livre evaporaria do produto ao longo do tempo do teste e seria percebida uma diminuição na atividade de água. O mesmo comportamento pode ser verificado para o Gel Controle e Gel Ganoderma.

TABELA 19: ATIVIDADE DE ÁGUA DOS CREMES CONTROLE (a) E GANODERMA (b) AO LONGO DO TEMPO DE ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA

CREME CONTROLE					
DIAS	CONDIÇÕES				
	TEMPERATURA AMBIENTE	Estufa (30°C)	Geladeira (4°C)	Shaker (30°C, 120rpm)	Sob Iluminação (30°C 12h _{claro} /12h _{escuro})
0	0,970	0,975	0,976	0,974	0,974
14	0,983	0,991	0,984	0,980	0,974
28	0,985	0,990	0,985	0,980	0,978
42	0,988	0,986	0,985	0,978	0,978
56	0,985	0,990	0,989	0,987	0,989
70	0,984	0,991	0,984	0,986	0,985
90	0,984	0,990	0,986	0,987	0,970

(a)

CREME GANODERMA					
DIAS	CONDIÇÕES				
	TEMPERATURA AMBIENTE	ESTUFA (30°C)	GELADEIRA (4°C)	SHAKER (30°C, 120rpm)	SOB ILUMINAÇÃO (30°C 12h _{claro} /12h _{escuro})
0	0,990	0,974	0,979	0,980	0,981
14	0,989	0,982	0,980	0,980	0,980
28	0,987	0,980	0,979	0,979	0,980
42	0,991	0,978	0,974	0,978	0,978
56	0,990	0,986	0,980	0,982	0,982
70	0,990	0,982	0,985	0,985	0,983
90	0,989	0,984	0,983	0,981	0,982

(b)

TABELA 20: ATIVIDADE DE ÁGUA DOS CREMES-GÉIS CONTROLE (A) E GANODERMA (B) AO LONGO DO TEMPO DE ENSAIO DE ESTABILIDADE ACELERADA

GEL-CREME CONTROLE					
DIAS	CONDIÇÕES				
	TEMPERATURA AMBIENTE	ESTUFA (30°C)	GELADEIRA (4°C)	SHAKER (30°C, 120rpm)	SOB ILUMINAÇÃO (30°C 12h _{claro} /12h _{escuro})
0	0,990	0,989	0,989	0,990	0,989
14	0,989	0,987	0,988	0,990	0,987
28	0,987	0,986	0,986	0,988	0,988
42	0,991	0,989	0,991	0,991	0,989
56	0,992	0,990	0,992	0,992	0,990
70	0,992	0,987	0,991	0,991	0,991
90	0,990	0,988	0,991	0,991	0,990

(a)

Gel-Creme Controle					
Dias	Condições				
	Temperatura Ambiente	Estufa (30°C)	Geladeira (4°C)	Shaker (30°C, 120rpm)	Sob Iluminação (30°C 12h _{claro} /12h _{escuro})
0	0,990	0,989	0,989	0,986	0,987
14	0,989	0,987	0,988	0,988	0,988
28	0,985	0,985	0,990	0,987	0,990
42	0,991	0,991	0,992	0,990	0,990
56	0,993	0,990	0,992	0,990	0,990
70	0,990	0,992	0,991	0,991	0,989
90	0,989	0,987	0,992	0,992	0,988

(b)

4.2.2.4 Espalhabilidade

Na Tabela 21 estão apresentados os valores médios de espalhabilidade ao longo do tempo do teste de estabilidade acelerada. Em todos os casos a espalhabilidade não apresentou grandes variações, não havendo interferência das diferentes condições testadas. Comparando-se todos as formulações em relação a cada condição separadamente, os valores de espalhabilidade foram parecidos entre si, sugerindo que cada condição altera, mesmo que infimamente, da mesma forma, cada formulação, independente de ela conter ou não o extrato dos esporos. Dessa forma, novamente, fica indicado que a adição do extrato não desestabilizou as emulsões às quais foi adicionado.

TABELA 21: VALORES DE ESPALHABILIDADE PARA CADA CREME EM CADA CONDIÇÃO PARA CREMES E GÉIS, GANODERMA E CONTROLE; VALORES MÉDIOS CONSIDERANDO OS 90 DIAS DE EXPERIMENTO

CONDIÇÃO TESTADA	ESPALHABILIDADE (cm ² /g)
CREME CONTROLE	
Temperatura Ambiente	2611±198
Estufa	2443±196
Refrigerador	2431±155
Shaker	2684±293
Sob Iluminação	2422±163
CREME GANODERMA	
Temperatura Ambiente	2406±136
Estufa	2602±269
Refrigerador	2328±263
Shaker	2451±362
Sob Iluminação	2331±357
GEL CONTROLE	
Temperatura Ambiente	3605±158
Estufa	3461±269
Refrigerador	3336±295
Shaker	3740±263
Sob Iluminação	3545±352
GEL GANODERMA	
Temperatura Ambiente	3553±267
Estufa	3444±226
Refrigerador	3344±172
Shaker	3710±65
Sob Iluminação	3606±211

5. Conclusão

- Foi possível concluir que a adição do extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* não afetou a estabilidade físico-química das formulações iniciais. Nos únicos casos em que se observou uma leve modificação (amarelamento das formulações submetidas à luz) o deterioramento foi percebido de maneira igual em todos os conjuntos analisados (com ou sem o extrato), indicando que a modificação ocorreu intrinsecamente na formulação, independentemente do extrato.
- A adição do extrato não foi responsável por nenhuma reação indesejável nas fórmulas testadas, o que é um bom indício para a segurança da inserção do extrato em outras fórmulas, caso assim seja desejado, o que, no entanto, não elimina novos testes de estabilidade, para cada nova formulação almejada. Por ser um teste longo, é recomendável que seja realizado já com a base final, na sua conformação final, evitando-se assim retrabalho e perda considerável de tempo.

Capítulo 5. *Challenge Test* de Formulação Cosmética contendo Extrato de Esporos de *Ganoderma lucidum*

1. Introdução

A contaminação microbiológica de um produto cosmético pode ocorrer em dois momentos: durante a sua produção ou embalagem, ou no uso cotidiano do consumidor. Assim, existem duas abordagens para o teste da estabilidade microbiológica de produtos cosméticos. A primeira determina por meio de análises microbiológicas clássicas a carga microbiana que o produto contém após o seu preparo e acondicionamento na embalagem final. O segundo tipo de contaminação é avaliado por meio da realização do chamado *Challenge Test*, ou Teste do Desafio do Sistema Conservante, ou simplesmente Teste do Desafio. Ele consiste na contaminação forçada do produto final seguido por uma avaliação da diminuição nos níveis de contaminação, garantindo que atinjam níveis determinados para cada tipo de microrganismo (Pauwels & Rogiers, 2008; ANVISA, 2004). No entanto, dependendo da classificação do produto cosmético (Tipo 1 ou Tipo 2), uma carga microbiana é considerada aceitável até determinados limites, sendo que certas cepas patógenas não devem estar presentes, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp. e *Aspergillus* sp. (Fiorentino et al, 2010).

O *Challenge Test* é considerado o teste mais adequado para analisar a efetividade de um preservativo em uma formulação cosmética, apesar de não ser utilizado rotineiramente nos laboratórios de controle de qualidade por ser laborioso e dispendioso (Fiorentino et al, 2010). Este teste permite também verificar se a escolha do sistema conservante é adequada, ou se a ocorrência de interações entre os componentes da formulação poderá prejudicar a sua eficácia (ANVISA, 2004). A ANVISA regulamenta o uso de conservantes por meio da Resolução 162/01, e o potencial conservante de novos extratos e substâncias também pode ser averiguado

por meio desse teste. O Guia de Microbiologia da ABC (2008) indica o Teste do Desafio durante os processos de desenvolvimento, lotes piloto e também do produto industrial, paralelamente ao teste de estabilidade.

A própria COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) não restringe a metodologia a ser utilizada para a realização do *Challenge Test*. Ela não restringe a gama de microrganismos a serem testados, as inoculações dos microrganismos podem ser testadas ou avaliadas pelo período que se julgar necessário, o tempo do teste é definido conforme a necessidade e os critérios de avaliação não estão especificados no *Guideline*, pois o critério pode variar de acordo com as necessidades de duração do tempo de vida do produto (Guia ABC de Microbiologia, 2008).

Na Tabela 22 é possível verificar as diferenças entre os diversos métodos atualmente em vigor. Para esse trabalho, utilizou-se como padrão a regra da USP (*United States Pharmacopeia*) na qual também se baseia a regra da ABC (Associação Brasileira de Cosmetologia).

MÉTODO	USP 25	CTFA 2001	BP 2000	GUIA ABC	REGRESSÃO LINEAR	OUTRAS
Culturas	<i>Bactérias</i>	<i>Bactérias</i>	<i>Bactérias</i>	<i>Bactérias</i>	<i>Bactérias</i>	<i>Bactérias</i>
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>B. cepacia</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>E. coli</i> ATCC 8739 (preparações orais)	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>E. coli</i> ATCC 8739	Opcional	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028
	<i>Fungos</i>	<i>Fungos</i>	<i>Fungos</i>	<i>Fungos</i>	<i>Fungos</i>	<i>Fungos</i>
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>A. niger</i> ATCC 16404	<i>C. albicans</i> <i>A. niger</i> Esporos <i>Bacillus subtilis</i> (opcional)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>A. niger</i> ATCC 16404 <i>Zygosacharomyces rouxii</i> (preparações orais com alta concentração de açúcar)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>A. niger</i> ATCC 16404 Outros microrganismos isolados da área fabril ou de um produto contaminado	Opcional	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>A. niger</i> ATCC 16404 Outros microrganismos isolados da área fabril ou de um produto contaminado
<i>Inóculo</i>	Cultura pura	Cultura pura ou mista	Cultura pura	Cultura pura	Cultura pura	Cultura pura
<i>Contaminação Inicial</i>	10 ⁵ a 10 ⁶ UFC/ml	Bac.: 10 ⁶ UFC/g Fung.: 10 ⁵ UFC/g Esp.: 10 ⁵ UFC/ml	10 ⁵ a 10 ⁶ UFC/ml ou g	10 ⁵ a 10 ⁶ UFC/g	10 ⁶ UFC/g	10 ⁵ a 10 ⁶ UFC/g

<i>Nº de Inoculações</i>	1	1 (Para produtos para a área dos olhos: 2)	1	1 (sugestão após 7º dia)	1	3
<i>Intervalos de Contagem</i>	7, 14, 21 e 28 dias	0, 1-3, 7, 14, 21, 28 dias em 2 vezes	48 h, 7, 14, 21, 28 dias	0 e 24 horas (48 a 72 opcional)	Bac.: 2, 4 e 24 h Fung.: 4, 8 e 24 h Ambos: 3, 5 e 7 d	0, 24h
<i>Critérios de Aprovação</i>	Bactérias: redução mínima de 2 log no 14º dia. Não aumentar até 28 dias.	Bactérias: redução mínima de 99,9% (3 log) em 7 dias. Não aumentar até o final do teste.	Bactérias: Critério A: redução 2 log com 48h, 3log com 7 dias e não aumentar com 28 dias. Critério B: redução de 3 log no 14º dia e não aumentar com 28 dias.	Bactérias: redução mínima de 99,9% (3 log) em 7 dias, seguida de redução contínua até finalização do ensaio.	Bactérias patogênicas: valor D menor que 4 horas Bactérias não-patogênicas: valor D menor que 28 horas	Bactérias: redução mínima de 2 log no 14º dia. Não aumentar até 28 dias
	Fungos e leveduras: não aumentar a contagem inicial e nos 14º e 28º dias.	Fungos e leveduras: redução mínima de 90% (1log) em 7 dias. Não aumentar a contagem até o final do teste.	Fungos e leveduras: Critério A: redução 2 log com 14 dias e não aumentar com 28 dias. Critério B: redução de 1 log no 14º dia e não aumentar com 28 dias.	Fungos e leveduras: redução mínima de 90% (1log) em 7 dias, seguida de redução contínua até finalização do ensaio.	Bolores e leveduras: valor D menor que 28 horas.	Fungos e leveduras: não aumentar a contagem inicial e nos 14º e 28º dias
<i>Tempo para Resultados</i>	28 dias	De 28 a 56 dias	28 dias	28 dias	7 dias	42 dias

TABELA 22: COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS PARA EXECUÇÃO E INTERPRETAÇÃO DO CHALLENGE TEST POR DIFERENTES ENTIDADES.

FONTE: GUIA ABC DE MICROBIOLOGIA, 2008.

2. Objetivos

Os objetivos foram submeter formulações cosméticas contendo extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* ao *Challenge Test*, verificando se a eficácia do sistema conservante da formulação seria capaz de manter as suas propriedades no combate a microrganismos contaminantes, além de avaliar se essa eficácia poderia ser aumentada ou diminuída por essa adição.

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparo do inóculo

Existem diferentes normas para a realização do *Challenge Test*, de acordo com as normas de cada país ou associação, não sendo ainda uma metodologia globalmente unificada. Apesar de possuírem os mesmos princípios gerais, alguns detalhes diferem entre as diferentes metodologias, o que faz com que se tenha que arbitrar qual metodologia e regra de análise será considerada quando da realização do ensaio.

Nesse ensaio, foi padronizado o preparo de um inóculo contendo de 10^5 - 10^6 cel/ml, utilizando como padrão a escala de McFarland. Os microrganismos testados foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. As cepas foram crescidas em Ágar de caseína de soja (bactérias) durante 6h a 36°C ou Ágar Sabouraud (fungos) a 26°C durante 5-7 dias.

Em um *Challenge Test* usual, industrial ou rotineiro de laboratório, utilizam-se formulações cosméticas prontas, comerciais, cuja fórmula já foi finalizada. Muitas vezes é difícil produzir dois lotes para comparação, um contendo os conservantes usuais do produto e o outro sem conservantes. Por isso, nesses casos, faz-se necessária a chamada inativação do sistema conservante, uma estratégia química de inativação dos compostos que agem protegendo o produto contra contaminações e desestabilizações químicas. No entanto, para esse ensaio, tinha-se a possibilidade de manipular a fórmula, e optou-se por manipular uma quantidade de creme com conservante, e outra sem o conservante. Distribuindo em algumas amostras o extrato dos esporos de *G. lucidum* e em outras não, pode-se explorar todas as possibilidades, podendo se chegar

a conclusões corretas, na ausência de interferentes ou causadores de falsos positivos ou falsos negativos.

A fórmula utilizada foi um creme base aniônico, obtida no Formulário da Farmacopéia Brasileira, com algumas modificações, conforme a Tabela 23. Nas formulações em que não se utilizou conservantes, não foram adicionados Butilhidroxitolueno, Propilparabeno e Metilparabeno, já que são os conservantes da fórmula. Esses conservantes podem ser utilizados em formulações cosméticas, conforme preconiza a Resolução RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001 (ANVISA, 2001)

TABELA 23: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO CREME UTILIZADO PARA O CHALLENGE TEST.

COMPOSTO	%
Alcool Estearílico Etoxilado	3
Álcool Estearílico	6
Fluido de Silicone	1
Palmitato de Cetila	3
Miristato de isopropila	4
Butilhidroxitolueno (BHT)*	0,05
Propilparabeno*	0,02
Metilparabeno*	0,18
Propilenoglicol	3
Lanolina Etoxilada 50%	2
Água Destilada	q.s.p.

* Não foram adicionados nas formulações denominadas “Sem conservante”

3.2 Inoculação nos cremes

Foram preparados quatro conjuntos de cremes, com a seguinte combinação:

- 1) +CONS +GAN: creme preparado **com** conservante e **com** extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*;
- 2) +CONS -GAN: creme preparado **com** conservante e **sem** extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*;
- 3) -CONS +GAN: creme preparado **sem** conservante e **com** extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*;
- 4) -CONS -GAN: creme preparado **sem** conservante e **sem** extrato de esporos de *Ganoderma lucidum*;

Dessa forma foi possível avaliar se a presença do extrato e do conservante, juntos ou separados, era capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados. De cada grupo foram preparados 5 potes, um para cada espécie testada, contendo 50 gramas de creme. A quantidade de extrato adicionada foi calculada em relação ao peso de esporos utilizado para o preparo do extrato, estabelecido em $1 \text{ g}_{\text{esporo}}/50 \text{ g}_{\text{creme}}$, em uma diluição 1:16 (m/v). Portanto, foram adicionados 16 ml de extrato ao preparo dos cremes que o continham.

Os potes eram brancos leitosos e foram mantidos em temperatura ambiente durante todo o experimento, em local fresco e ao abrigo da luz. A quantidade de inóculo adicionada foi calculada de forma a se obter uma concentração final de 10^6 UFC/g de produto.

Imediatamente após a inoculação, 1 g de amostra foi removida de cada formulação contaminada com cada microrganismo (tempo 0), diluída em solução salina estéril (0,9%) em diluições apropriadas para a contagem das colônias e alíquotas de 1ml dessas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar caseína de soja e Ágar Sabouraud. Depois de períodos e condições apropriadas de incubação (36°C durante 24-48 h para bactérias e 25°C durante 5-7 dias para fungos), as colônias foram contadas e os valores expressos em termos de UFC/g. Depois, em intervalos de 24 h, 48 h, 7, 14, 21 e 28 dias o procedimento foi repetido para se realizar a contagem dos microrganismos sobreviventes (Fiorentino et al, 2010, Guia ABC de Microbiologia, 2008).

4. Resultados e Discussão

Papageorgiou et al (2010) enfatizam a importância de se avaliar os produtos em relação à sua estabilidade frente a contaminações tanto intactos quanto durante o uso pelo consumidor, o que é feito de forma extrema no *Challenge Test*.

A Tabela 24 mostra os níveis de contaminação ao longo do tempo nos quatro grupos estudados. O inóculo preparado foi da ordem de 10^6 UFC/g, e ao longo do tempo, o esperado para os grupos contendo extrato de esporos de Ganoderma, preservativos, ou ambos, era uma diminuição nesse nível de contaminação. Pode-se

notar que essa diminuição está presente em três grupos, sendo que apenas o creme que não continha nem os conservantes nem o extrato de esporos não apresentou praticamente nenhuma diminuição. Isso indica que nos três grupos o sistema conservante foi capaz de diminuir o nível inicial de contaminação, enquanto que no outro, apesar de os níveis de contaminação se manterem os mesmos até quase o final do ensaio, ao menos os microrganismos não se desenvolveram ainda mais.

TABELA 24: RESULTADOS DA CONTAGEM MICROBIANA NOS QUATRO CONJUNTOS DE CREMES TESTADOS (COMBINAÇÕES COM E SEM CONSERVANTE E COM E SEM EXTRATO DE ESPOROS DE *G. lucidum*) PARA CADA MICRORGANISMO AVALIADO (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*).

	MICRORGANISMO	INÓCULO (UFC/ml)	0	24H	48H	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
<i>Creme com conservante com extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1,0E+06	9,5E+05	2,0E+05	4,4E+04	1,2E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02
	<i>Candida albicans</i>	1,0E+06	9,1E+05	2,0E+05	3,1E+04	1,1E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02
	<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06	9,8E+05	1,6E+05	5,2E+04	1,6E+02	1,4E+02	1,4E+02	1,3E+02
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06	9,5E+05	1,1E+05	4,2E+04	1,2E+02	1,2E+02	1,1E+02	1,1E+02
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0E+06	9,7E+05	2,3E+05	4,2E+04	1,1E+02	1,1E+02	1,1E+02	1,0E+02
<i>Creme sem conservante sem extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1,0E+06	9,7E+05	9,8E+05	8,9E+05	8,7E+05	8,9E+05	8,6E+05	8,5E+05
	<i>Candida albicans</i>	1,0E+06	9,8E+05	9,7E+05	9,1E+05	9,2E+05	9,0E+05	7,9E+05	8,0E+05
	<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06	9,7E+05	9,7E+05	9,3E+05	9,1E+05	9,1E+05	8,1E+05	8,2E+05
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06	9,6E+05	9,5E+05	8,7E+05	9,0E+05	8,9E+05	7,6E+05	7,8E+05
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0E+06	9,5E+05	9,7E+05	9,2E+05	8,9E+05	8,9E+05	7,9E+05	8,0E+05
<i>Creme com conservante sem extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1,0E+06	9,1E+05	2,5E+04	7,4E+03	9,8E+02	9,0E+02	8,9E+02	8,5E+02
	<i>Candida albicans</i>	1,0E+06	9,0E+05	3,1E+04	8,4E+03	8,7E+02	7,9E+02	7,7E+02	7,5E+02
	<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06	9,2E+05	2,8E+04	9,1E+03	9,2E+02	8,4E+02	8,0E+02	8,2E+02
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06	9,0E+05	3,6E+04	7,6E+03	6,9E+02	6,2E+02	6,1E+02	5,9E+02
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0E+06	9,3E+05	3,4E+04	4,3E+03	8,2E+02	8,0E+02	8,0E+02	7,8E+02
<i>Creme sem conservante com extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	1,0E+06	9,8E+05	7,0E+05	6,9E+05	1,2E+03	1,1E+03	1,0E+03	1,1E+03
	<i>Candida albicans</i>	1,0E+06	9,9E+05	5,3E+05	2,3E+05	1,1E+03	1,1E+03	1,0E+03	1,1E+03
	<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06	9,6E+05	6,4E+06	6,5E+05	1,6E+03	1,6E+03	1,6E+03	1,6E+03
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06	9,7E+05	8,4E+06	7,8E+05	1,2E+03	1,2E+03	1,2E+03	1,2E+03
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0E+06	9,8E+05	7,8E+06	7,1E+05	1,1E+03	1,1E+03	1,0E+03	1,0E+03

Para interpretar melhor os resultados é interessante transformar os dados contidos na Tabela 24 na Tabela 25, representando o “log” da contagem microbiana. Por meio da análise do decaimento do log é que muitas das normas que regem a contaminação em cosméticos avaliam a eficácia do sistema conservante, sendo mais fácil e rápida a sua visualização.

TABELA 25: RESULTADOS DA CONTAGEM MICROBIANA REPRESENTADA EM TERMOS DE “LOG”

	MICROORGANISMO	INÓCULO	0	24H	48H	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
Creme com conservante com extrato	<i>Aspergillus niger</i>	6,0	6,0	5,3	4,6	2,1	2,0	2,0	2,0
	<i>Candida albicans</i>	6,0	6,0	5,3	4,5	2,0	2,0	2,0	2,0
	<i>Escherichia coli</i>	6,0	6,0	5,2	4,7	2,2	2,1	2,1	2,1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0	6,0	5,0	4,6	2,1	2,1	2,0	2,0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,0	6,0	5,4	4,6	2,0	2,0	2,0	2,0
Creme sem conservante sem extrato	<i>Aspergillus niger</i>	6,0	6,0	6,0	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
	<i>Candida albicans</i>	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	5,9	5,9
	<i>Escherichia coli</i>	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	5,9	5,9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0	6,0	6,0	5,9	6,0	5,9	5,9	5,9
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,0	6,0	6,0	6,0	5,9	5,9	5,9	5,9
Creme com conservante sem extrato	<i>Aspergillus niger</i>	6,0	6,0	4,4	3,9	3,0	3,0	2,9	2,9
	<i>Candida albicans</i>	6,0	6,0	4,5	3,9	2,9	2,9	2,9	2,9
	<i>Escherichia coli</i>	6,0	6,0	4,4	4,0	3,0	2,9	2,9	2,9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0	6,0	4,6	3,9	2,8	2,8	2,8	2,8
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,0	6,0	4,5	3,6	2,9	2,9	2,9	2,9
Creme sem conservante com extrato	<i>Aspergillus niger</i>	6,0	6,0	5,8	5,8	3,1	3,0	3,0	3,0
	<i>Candida albicans</i>	6,0	6,0	5,7	5,4	3,0	3,0	3,0	3,0
	<i>Escherichia coli</i>	6,0	6,0	6,8	5,8	3,2	3,2	3,2	3,2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0	6,0	6,9	5,9	3,1	3,1	3,1	3,1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,0	6,0	6,9	5,9	3,0	3,0	3,0	3,0

Da Tabela 25 é possível concluir que o melhor cenário para a diminuição da contaminação proposital foi dos produtos que continham conservantes e o extrato de esporos de *G. lucidum*. O valor de log, que no caso dos produtos com conservante e sem o extrato diminuíram para no máximo 2,8, enquanto que nos produtos que continham conservante e extratos, esse valor diminuiu para 2,0, tendo todos começado em 6,0.

Fiorentino et al (2011) descrevem o *Challenge Test* como sendo um guia utilizado para se avaliar os melhores tipo e quantidade de preservativos que devem ser adicionados ao produto para garantir a sua qualidade, o que se mostrou útil para a avaliação da ação do extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* junto aos demais conservantes da fórmula. Além disso, os autores ressaltam que essa técnica pode ser usada para analisar a eficiência da embalagem do produto frente a contaminações. Apesar de poder ser usado em testes de segurança e estabilidade durante o desenvolvimento do produto, não é rotineiramente utilizado como controle. Embora não haja um consenso em relação ao seu uso, os autores enfatizam o mesmo como sendo o mais adequado para analisar a efetividade do sistema preservante.

Lundov et al (2011) demonstram que a combinação de diferentes substâncias conservantes pode ser utilizada como estratégia para a diminuição da quantidade de cada uma que se adiciona ao produto final. Assim, já que o extrato de esporos de *Ganoderma* mostrou certo potencial no *Challenge Test*, poder-se-ia estudar a possibilidade de se diminuir a quantidade de outros conservantes na fórmula mediante adição do mesmo.

Os diversos métodos existentes para o *Challenge Test* (vide tabela 22) avaliam cada um da sua maneira, a eficiência do sistema conservante testado. Como arbitrou-se utilizar como padrão a metodologia descrita pelo Guia ABC, a redução mínima esperada para bactérias era de 3 logs em 7 dias e para fungos, de 1 log em 7 dias.

A tabela 25 retrata quais grupos e quais microrganismos estariam de acordo com essa norma. Apenas no creme sem conservante e sem extrato os microrganismos não foram inativados. Por outro lado, os microrganismos também não se proliferaram ainda

mais. Nos três demais cremes houve redução nos níveis de contaminação suficientes para que as três fossem aprovadas no *Challenge Test*.

Pela Tabela 26 é possível concluir que a adição do extrato ao creme potencializou a ação contra todos os microrganismos, tendo sido nessa situação alcançado o maior nível de redução (da ordem de 4 logs). Por outro lado, o creme sem conservante e com extrato teve reduções ligeiramente menores que o creme com conservante e sem extrato, mostrando que o seu poder conservante é quase equivalente ao poder conservante dos conservantes químicos dessa fórmula. Assim, pode-se dizer que nas proporções apresentadas, os conservantes químicos poderiam ser substituídos pelo extrato de esporos de *G. lucidum* sem perda das suas propriedades de conservação frente a contaminações microbiológicas em geral

TABELA 26: REDUÇÃO DO LOG DA CONTAMINAÇÃO SOFRIDA POR CADA MICRORGANISMO EM CADA CONJUNTO DE CREMES, ANALISANDO SE ESTÁ DE ACORDO COM A NORMA DA ABC (OK) OU NÃO (NÃO).

	MICRORGANISMO	REDUÇÃO CONFORME GUIA ABC
<i>Creme com conservante com extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	OK – 4,0 logs
	<i>Candida albicans</i>	OK – 4,0 logs
	<i>Escherichia coli</i>	OK – 3,9 logs
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OK – 4,0 logs
	<i>Staphylococcus aureus</i>	OK – 4,0 logs
<i>Creme sem conservante sem extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	NÃO – 0,1 logs
	<i>Candida albicans</i>	NÃO – 0,1 logs
	<i>Escherichia coli</i>	NÃO – 0,1 logs
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NÃO – 0,1 logs
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NÃO – 0,1 logs
<i>Creme com conservante sem extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	OK – 3,1 logs
	<i>Candida albicans</i>	OK – 3,1 logs
	<i>Escherichia coli</i>	OK – 3,1 logs
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OK – 3,2 logs
	<i>Staphylococcus aureus</i>	OK – 3,1 logs

<i>Creme sem conservante com extrato</i>	<i>Aspergillus niger</i>	OK – 3,0 logs
	<i>Candida albicans</i>	OK – 3,0 logs
	<i>Escherichia coli</i>	OK – 2,8 logs
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OK – 2,9 logs
	<i>Staphylococcus aureus</i>	OK – 3,0 logs

5. Conclusão

- Por meio do *Challenge Test* foi possível comprovar que as formulações cosméticas contendo conservantes e extrato de esporos de *G. lucidum* mostraram a maior diminuição da contaminação proposital. Isso indica que o extrato foi capaz de potencializar a ação dos conservantes testados, atuando de maneira sinérgica.
- Esse resultado pode indicar ser possível a diminuição da quantidade de conservantes utilizados, resultando em um produto contendo um extrato multipropósito: antioxidante, com ação antifúngica e capaz de controlar contaminações. Além disso, o produto seria mais ambientalmente amigável, já que permitiria a diminuição de conservantes químicos, e assim também mais aceitável e com maior apelo para os consumidores.

Trabalhos Futuros

- Realizar o cultivo de *Ganoderma lucidum* e otimizar a sua produção de esporos, visando aumentar a produção e diminuir o tempo de cultivo até a obtenção dos mesmos.
- Verificar o impacto de diferentes condições de cultivo ou mesmo de substrato na qualidade ou atividade dos compostos presentes nos esporos.
- Caracterizar mais profundamente o esporo e seus extratos, confrontando a composição com a literatura existente em relação aos compostos mais bioativos e assim otimizando a extração desses compostos. Pode-se ainda buscar isolar novos compostos ainda não descritos na literatura.
- Outros processos de extração podem ser testados, bem como outros solventes ou sistemas de solventes. Uma lise prévia do esporo pode ser testada, sempre analisando-se a sua viabilidade, já que uma lise, dependendo das condições empregadas, poderia causar perda de atividade biológica de algumas moléculas.
- Os extratos obtidos podem ser purificados em frações ou moléculas puras podem ser separadas, e o potencial dessas frações ou moléculas pode ser testado separadamente para uma infinidade de aplicações médicas e cosméticas.
- Analisar a possibilidade de utilizar o extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* também como adjuvante, para potencializar a resposta imune.
- O potencial antimicrobiano do extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* pode ser explorado em outras concentrações, ou extratos utilizando-se outros solventes também podem ser avaliados quanto a esse potencial
- O extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* pode ser avaliado em relação a outros potenciais específicos de aplicação cosmética, como para diminuição de rugas, de manchas, de linhas de expressão, melhora de hidratação, do tônus da pele, prevenção da perda de água transepidermal, etc. Todos esses testes requerem equipamentos específicos, ainda não disponíveis nos nossos laboratórios.

Referências

- ANVISA, (2004). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Volume 1.
- ANVISA, (2008). Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. 2ª Edição.
- Ameri A, Vaidya JG, Deokule SS. (2011) *In vitro* evaluation of anti-staphylococcal activity of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma praelongum* and *Ganoderma resinaceum* from Pune, India. **African Journal of Microbiology Research**. 5(3):328-333
- Asgher M, Noreen S, Bhatti HN. (2010) Decolorization of Dye-Containing Textile Industry Effluents Using *Ganoderma Lucidum* IBL-05 in Still Cultures. **Water Environment Research**. 82(4):357-361.
- Bao XF, Wang XS, Dong Q, Fang JN, Li XY. (2002) Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**. 59:175–181.
- Borchers A, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ e Gershwin EM. (2008) The Immunobiology of Mushrooms. **Experimental Biology and Medicine**. 233:259-276.
- Carballo, D, Mala, S, Bardenheuer, W, Freistuehler, M, Reush, H.P. (2008) Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. **J Cell Mol Med.**, v. 12, p. 2598-608.
- Cavalcante, M F, Oliveira, MCC & Velandia, JR e Echevarria, A (2000) Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach, **Química nova**, v. 23, p. 20-22.
- Chen SL , Xu J , Liu C, Zhu YJ, Nelson DR, Zhou SG, Li CF, Wang LZ, Guo X, Sun YZ, Luo HM, Li Y, Song JY, Henrissat B, Levasseur A, Qian J, Li JQ, Luo X, Shi LC, He L, Xiang L, Xu XL, Niu YY, Li QS, Han MV, Yan HX, Zhang J, Chen HM, Lv AP, Wang Z, Liu MZ, Schwartz DC, Sun C. (2012) Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Nature Communications**. Vol. 3.
- Chen LL, Wang SQ (2008) From the bottle to the skin: challenges in evaluating antioxidants. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**. 28(5): 228-234.
- Chen Y, Xie M, Zhang H, Wang Y, Nie S, Li C. (2012) Quantification of total polysaccharides and triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma atrum* by near infrared spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**. 135:268–275
- Chiu S. W, Wang Z. M, Leung T. M, Moore D. (2000) Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. **Food Chem Toxicol**. 38:173–8.

Choong YK, Sun SQ, Zhou Q, Ismail Z, Rashid BAA, Tao JX. (2011) Determination of storage stability of the crude extracts of *Ganoderma lucidum* using FTIR and 2D-IR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. 57:87–96

Daruliza KMA, Fernandez L, Jegathambigai R, Sasidharan S. (2012) Anti-Candida activity and brine shrimp toxicity assay of *Ganoderma boninense*. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. 16(1): 43-48

Du M, Wang C, Hu X. C, Zhao G (2008). Positive effect of selenium on the immune regulation activity of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae), proteins in vitro. **Int J Med Mushrooms**. 10:337–44

Dubois M, Gills KK, Hamilton JK, Rebers PA, Smoth F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**. 28:350-356.

Fan L, Li J, Deng K, Ai L. (2012). Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**. 87:1849– 1854

Fang QH, Tang YJ, Zhong JJ. (2002) Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**. 37:1375–1379.

Fiorentino FAM, Chorilli M, Salgado HRN (2011) The use of the challenge test to analyse preservative efficiency in non-sterile cosmetic and health products: applications and critical points. **Analytical Methods**. 3(4): 790-798

Gao YH, Tang WB, Gao H, Chan E, Lan J, Li XT, Zhou SF. (2005) Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. **Food Reviews International**. 21(2):211-229.

Gosh S, Rousseau D. (2009). Freeze–thaw stability of water-in-oil emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**. 339:91-102.

Guia ABC de Microbiologia (2008). Associação Brasileira de Cosmetologia. São Paulo. **Ed. Pharmabooks**, 3^a ed. p.

Hafiz I, Asgher M, Bhatti HN. (2008) Optimization of Cibacron Turquoise P-GR Decolourization by *Ganoderma lucidum* IBL-05. **Fresenius Environmental Bulletin**. 17(12A)1987-2008.

Hirotsu M & Furuya T (1985). Ganoderic Acid Derivatives, Highly Oxygenated lanostane-type Triterpenoids, from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**. 25 (5): 1189-1193.

Hikino H, Konno C, Mirin Y, Hayashi T. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Planata Med.** 1985;4:339–40.

Hsieh C, Yang FC. (2004) Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology.** 91:105–109.

Huie CW, Di X. (2004) Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. **J. Chromatogr. B** 812:241–257.

Hyde KD, Bahkali AH, Moslem MA. (2012) Fungi-an unusual source for cosmetics. **Fungal Diversity.** 43(1):1-9.

Ji Z, Tang Q, Zhang J, Yang Y, Jia W, Pan Y (2007). Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. **J Ethnopharmacol.** 112:445–50.

Jonathan SG and Fasidi IO (2003). Antimicrobial activities of two edible macrofungi - *Lycoperdon pusillum* (*Bat.ex*) and *Lycoperdon giganteum* (*Pers*). **African Journal of Biomedical Reseach.** 6:85-90.

Jonathan SG and Awatona FC (2010). Studies on Antimicrobial Potentials of three *Ganoderma* species. **African Journal of Biomedical Reseach.** 11:197-202.

Jong SC and Birmingham, JM (1991). Medicinal benefit of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in Applied Microbiology.** 37:104-132

Kamble R, Venkata S, Gupte AM. (2011) Antimicrobial Activity of *Ganoderma lucidum* Mycelia. **Journal of Pure and Applied Microbiology.** 5(2):983-986

Kawagishi H, Mitsunaga S. I, Yamawaki M (1997). A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry.** 44:7–10.

Kim HW, Shim MJ, Cho EC, Kim BK (1997) Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus-1 by water-soluble extract of *Ganoderma lucidum*. **Archives of Pharmacal Research.** 20(5): 425-431

Kolesnikova O. P, Tuzova M. N, Kozlov V. A. (1997) Screening of immunoactive properties of alkanecarbonic acid derivatives and germanium-organic compounds in vivo. **Immunologiya.** 10:36–8.

Li WJ, Nie SP, Liu XZ, Zhang H, Yang Y, Yu Q, Xie MY. (2012) Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. **Food and Chemical Toxicology.** 50:689–694.

- Lin JW, Hao LX, Xu GX, Sun F, Gao F, Zhang R, Liu LX. (2009) Molecular cloning and recombinant expression of a gene encoding a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris*. **World J Microbiol Biotechnol.** 25:383–390
- Lin JM, Lin CC, Chen MF, Ujiie T, Takada A (1995) Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. **Journal of Ethnopharmacology.** 47:33-41
- Lin LJ, Shiao MS, Yeh SF. (1988) Triterpenes from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry.** 27(7): 2269-2271.
- Lin ZB. (2005) Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. **J Pharmacol Sci.** 99:144 – 153.
- Liu D, Gong J, Dai W, Kang X, Huang Z, Zhang HM, Liu W, Liu L, Ma J, Xia Z, Chen Y, Chen Y, Wang D, Ni P, Guo AY, Xiong X. (2012) The genome of *Ganoderma lucidum* provides insights into triterpenes biosynthesis and wood degradation. **PLoS ONE.** 7(5): e36146.
- Liu J, Kurashiki K, Shimizu K, Kondo R. (2006) Structure-activity for inhibition of 5 α -reductase by triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 14:8645-8660.
- Liu J, Shimizu K, Konishi F, Noda K, Kumamoto S, Kurashiki K, Kondo R. (2007) Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. **Food Chemistry.** 100(4):1691-1696
- Liu J, Shimizu K, Konishi F, Kumamoto S, Kondo R. (2007) The anti-androgenic effect of ganoderol B isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 15(14):4966-4972.
- Liu X, Xu SP, Wang JH, Yuan JP, Guo LX, Li X, Huang XN. (2007) Characterization of *Ganoderma* spore lipid by stable carbon isotope analysis: implications for authentication. **Anal Bioanal Chem.** 388:723–731
- Liu X, Wang JH, Yuan JP. (2005) Pharmacological and anti-tumor activities of *Ganoderma* spores processed by top-down approaches. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology.** 12(5):2001-2013.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275.
- Lundov MD, Johansen JD, Zachariae C, Moesby L. (2011) Low-level efficacy of cosmetic preservatives. **Int J Cosmet Sci.** 33(2): 190-196

Masalova I, Malkin AY, Ferg E, Kharatiyan E, Taylor M, Haldenwang R. (2006) Evolution of rheological properties of highly concentrated emulsions with aging — Emulsion-to-suspension transition. **J. Rheol.** 50(4): 435-451.

Mau J. L, Lin H. C, Chen C. C. (2001) Non-volatile components of several medicinal mushrooms. **Food Res Int.** 34:521–6

McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal** 32: 513-524.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. (1982) Brine Shrimp - A Convenient General Bioassay for Active-Plant Constituents. **Planta Medica.** 45 (1):31-34

Murugesan K, Nam IH, Kim YU, Chang YS. (2007) Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzyme and Microbial Technology.** 40(7):1662-1672.

Nara K, Torigata S, Osanai H, Kohno B, Kato Y. (2011) Influence of Culture Medium on the Composition of Water-soluble Polysaccharides in *Ganoderma lucidum* Fruit Body. **Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology - Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.** 58(5): 216-221.

Nasim G, Ali M. (2011) Estimation of Antimicrobial Potential of *Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex Fr.) Karst. Extracts. **Pakistan Journal of Botany.** 43(SI):183-189

Nayak A, Nayak RN , Bhat K. (2010) Antifungal activity of a toothpaste containing *Ganoderma lucidum* against *Candida albicans* - an in vitro study. **J. Int Oral Health** 2(2):51-58.

Oei P. (2003). Mushroom cultivation. Pp. 1-7 in **Appropriate Technology for the Mushroom Growers**; CTA, 3rd Ed., Backhuys Publishers.

Ofodile LN, Uma N, Grayer RJ, Ogundipe OT, Simmonds MSJ. (2012) Antibacterial Compounds from the Mushroom *Ganoderma colossus* from Nigeria. **Phytotherapy Research.** 26(5): 748-751

Ohno N, Miura N. N, Sugawara N, Tokunaka K, Kirigaya N, Yadomae T. (1998) Immunomodulation by hot water and ethanol extracts of *Ganoderma lucidum*. **Pharm Pharmacol Lett.** 4:174–7.

Papageorgiou S, Varvaresou A, Tsirivas E, Demetzos C. (2010) New alternatives to cosmetics preservation. **Journal of Cosmetic Science,** 61(2): 107-123.

Paterson RRM. (2006) *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry.** 67:1985–2001.

Pauwels M & Rogiers V. (2008). Safety Assessment of Cosmetics in Europe (**book**). Ed. Karger. p. 119.

Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI. (2001) Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. 8(5): 395–400.

Peksen A, Yakupoglu G. (2009) Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. **World J Microbiol Biotechnol**. 25:611–618

Rofuli NB, Cruz AGV, Medalla AP, Buenavista MTS (2005). Antimicrobial and Antagonistic Properties of *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr.) Lloyd. International Journal of Medicinal Mushrooms. 7(3): 460.

Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto FD (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa. Comunicado Técnico 127**. Fortaleza-CE.

Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad GBKS, Bisen PS. (2009) *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 10(8):717-742.

Falandysz J. Selenium in edible mushrooms. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**. 2008;26(3):256–99

Shi L, Ren A, Mu D, Zhao M. (2010) Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. **Appl Microbiol Biotechnol**. 88:1243–1251.

Shi L, Qin L, Xu YJ, Ren A, Fang X, Mu DS, Tan Q, Zhao MW (2012). Molecular cloning, characterization, and function analysis of a mevalonate pyrophosphate decarboxylase gene from *Ganoderma lucidum*. **Molecular Biology Reports**. 39(5):6149-6159.

Silva D. (2004). Cellular and Physiological Effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 4:873-879.

Skalicka-Woźniak K, Szypowski J, Łoś R, Siwulski M, Sobieralski K, Głowniak K, Malm A. (2012) Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**. 81(1):17-21

Sridhar S, Sivaprakasam E, Balakumar R, Kavitha D (2011) Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of *Ganoderma Lucidum* (Curtis) P. Karst Fruit Bodies Extracts. **World Journal of Science and Technology**. 1(6): 08-11

Stajic M, Glamoclija J, Maksimovic V, Vukojevic J, Simonic J, Zervakis G. (2011). A Comparative Assessment of the Potential of Polysaccharide Production and Intracellular Sugar Composition within Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.)P. Karst. (Aphyllorphoromycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 13(2): 153-158.

Subbraj T, Michael A, Rajeshwari S, Mani K. (2008) Presence of antimicrobial substance in *Ganoderma lucidum*, a wild type mushroom. **Plant Archives**. 8(1): 261-263

Sydney EB, Sturm W, de Carvalho JC, Soccol VT, Larroche C, Pandey A, et al (2010) Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresour Technol**. 101:5892–6.

Sun J, He H, Xie B. J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **J Agric Food Chem**. 2004;52:6646–52.

Thakur A, Rana M, Lakhanpal TN, Ahmad A, Khan MI. (2007) Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Biochim. Biophys. Acta**. 1770:1404-1412.

Tomoda M, Gonda R, Kasahara Y, Hikino H. (1986) Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Phytochemistry**. 25:2817–20

Upton R. (2000) American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium: Reishi Mushroom, *Ganoderma lucidum*. **Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics**. U.S.A. Canada: Santa Cruz

Van Der Hem L, Van Der Vliet A, Bocken C. F. M, Kino K, Hoitsma A. J, Tax W. J. M. (1995) Lingzhi-8: Studies of a new immunomodulating agent. **Transplantation**. 60:438–43.

VanHaeke, P.; Persoone, G.; Colloq. Inst. Natl. Saute Rec. Med. 1982, 106, 359.
Xu JW, Zhao W, Zhong JJ. (2010) Biotechnological production and application of ganoderic acids. **Appl Microbiol Biotechnol**. 87:457–466.

Yang FC, Liao CB. (1998)The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochemist**. Vol. 33, No. 5, pp. 547-553.

Yang FC, Yang MJ, Cheng SH. (2009) A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 40:148–154.

Wachtel-Galor S, Buswell J. A, Tomlinson B, Benzie I. F. F. Lingzhi polyphorous fungus. (2004) In: Herbal and Traditional Medicine: **Molecular Aspects of Health**. New York: Marcel Dekker Inc pp. 179–228.

Wagner R, Mitchell DA, Sasaki GL, Amazonas MAL de A. (2004) Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharides. **Journal of Biotechnology**. 114:153–164

Wang H, Ng TB (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**. 27 (1): 27–30

Wang JH, Zhou YJ, Zhang M, Kan L, He P. (2012) Active lipids of *Ganoderma lucidum* spores-induced apoptosis in human leukemia THP-1 cells via MAPK and PI3K pathways. **Journal of Ethnopharmacology** 139 (2012) 582– 589.

Wasser S. P, Coates P, Blackman M, Cragg G, Levine M, Moss J, White J. (2005) Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*); pp. 680–90. **Encyclopedia of Dietary Supplements**. New York: Marcel Dekker

Weng CJ, Yen GC. (2010) The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**. 27(5):361-369.

Wong KL, Chao HH, Chan P, Chang LP, Liu CF (2004) Antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* in acute ethanol-induced heart toxicity. **Phytotherapy Research**. 18(12):1024-1026

Vizzotto M, Pereira MC (2009). Metodologia Científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). **Embrapa. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 101**. Pelotas-RS.

Xu P, Ding ZY, Qian Z, Zhao CX, Zhang KC. (2008) Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. **Enzyme and Microbial Technology**. 42:325–331.

Zapata P, Rojas D, Atehortua L. (2012) Production of Biomass, Polysaccharides, and Ganoderic Acid using Non-conventional Carbon Sources under Submerged Culture of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.)P. Karst. (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 14(2):197-203.

Zhang L, Zhang M, Zhou Q, Chen J, Zeng F (2000). Solution Properties of Antitumor Sulfated Derivative of α -(1→3)-D-Glucan from *Ganoderma lucidum*. **Biosci**.