

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA RUIVO VALIO BARRETTI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO ANTI-TIROSINASE E ANTIOXIDANTE DA
FRAÇÃO EXTRACELULAR DA *Galdieria sulphuraria* PARA APLICAÇÃO
COSMÉTICA

CURITIBA

2024

BÁRBARA RUIVO VÁLIO BARRETTI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO ANTI-TIROSINASE E ANTIOXIDANTE DA
FRAÇÃO EXTRACELULAR DA *Galdieria sulphuraria* PARA APLICAÇÃO
COSMÉTICA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Barretti, Bárbara Ruivo Válio

Avaliação do potencial de ação anti-tirosinase e antioxidante da fração extracelular da *Galdieria sulphuraria* para aplicação cosmética / Bárbara Ruivo Válio Barretti. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Adenise Lorenci Woiciechowski

Coorientador: Eduardo Bittencourt Sydney

1. Melanogênese. 2. Cosméticos. 3. Microalgas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. III. Woiciechowski, Adenise Lorenci. IV. Sydney, Eduardo Bittencourt. V. Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BÁRBARA RUIVO VÁLIO BARRETTI** intitulada: **Avaliação do potencial de ação anti-tirosinase e antioxidante da fração extracelular da *Galdieria sulphuraria* para aplicação cosmética**, sob orientação da Profa. Dra. ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Fevereiro de 2024.

Assinatura Eletrônica

22/02/2024 18:13:00.0

ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/02/2024 17:39:05.0

MARIA CAROLINA DE OLIVEIRA RIBEIRO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ - UTFPR)

Assinatura Eletrônica

22/02/2024 19:29:47.0

EDUARDO BITTENCOURT SYDNEY
Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

26/02/2024 08:08:06.0

JULIO CESAR DE CARVALHO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/02/2024 20:29:45.0

ALESSANDRA CRISTINE NOVAK SYDNEY
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ - UTFPR)

Universidade Federal do Paraná- Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3695 - E-mail: secretaria.pb@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 337121

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 337121

*Dedico esse trabalho primeiramente a
Deus, que é meu sustento e autor da minha vida,
aos meus pais Olinda e Antonio, meu marido
Marcelo e minha filha Betina.*

É justo que muito custe o que muito vale.

Santa Teresa D'Avila

RESUMO

Nos últimos anos, os cuidados com saúde, bem-estar e beleza tem se intensificado. O mercado *skin care*, atualmente, representa 70% do mercado geral de cuidados com a pele, representando uma parcela significativa dos gastos do consumidor neste setor. De acordo com o relatório de pesquisas de mercado, estima-se que o mercado global de cosméticos gere US\$ 18,48 bilhões até o final de 2028. Motivada pela preocupação dos consumidores com os cuidados com a pele, a indústria cosmética vem desenvolvendo novas fórmulas capazes de diminuir os sinais de envelhecimento, elasticidade da pele, rugas e hiperpigmentação. Nesse cenário, microrganismos vem ganhando espaço, dada a sua capacidade de produzir metabólitos secundários excelentes propriedades anti-envelhecimento. Agentes clareadores sintéticos estão sendo substituídos por bioprodutos naturais que executem tal função no cosmético. Esse estudo pioneiro, tem como propósito demonstrar o potencial cosmético da fração extracelular de *Galdieria sulphuraria* cultivada sob condições heterotróficas. Os resultados demonstraram uma composição centesimal da biomassa com predominância em carboidratos (56,80%) e proteínas (29,88). A fração extracelular concentrada apresentou um potencial antioxidante $391,96 \mu\text{mol TEq.L}^{-1}$, sendo uma parcela de $5,67 \text{ mg QE.L}^{-1}$, representados por flavonoides. Além disso, promoveu uma inibição média de tirosinase de 98,87%, resultado 15% superior ao ácido kójico (85,88%), um agente despigmentante comumente utilizado em cosméticos, porém com baixa eficácia e instabilidade química. Para validar a aplicabilidade desse ativo como um potencial substituto do ácido kójico, foram formulados dois produtos cosméticos - um creme e um sérum facial – contendo esse ativo. Os testes aplicados ao longo do ensaio de estabilidade demonstraram que a adição do ativo não alterou as características visíveis, organolépticas e microbiológicas das formulações. Diante desses resultados, esse trabalho pioneiro abre novas oportunidades de mercado para o uso da fração extracelular do cultivo de *G. sulphuraria*.

Palavras-chave: biocosméticos; microalga; inibidores anti-tirosinase; ácido kójico; melanogênese.

ABSTRACT

In recent years, health, wellness and beauty care has intensified. Facial care products account for 70% of the overall skin care market, representing a significant share of consumer spending in this industry. According to the market research report, the global cosmetics market is estimated to generate USD 18.48 billion by the end of 2028. Motivated by consumers' concern for skin care, the cosmetic industry has been developing new formulas capable of reducing the signs of aging, skin elasticity, wrinkles and hyperpigmentation. In this scenario, microorganisms have been gaining ground, given their ability to produce secondary metabolites with excellent anti-aging properties. Skin whitening agents are being replaced by natural bioproducts that perform such a function in cosmetics. This pioneering study aims to demonstrate the cosmetic potential of obtaining extracellular *Galdieria sulphuraria* cultivated under heterotrophic conditions. The results are a centesimal composition of the biomass with a predominance of carbohydrates (56.80%) and proteins (29.88%). The concentrated extracellular fraction obtained an antioxidant potential of 391.96 $\mu\text{mol TEq.L}^{-1}$, with 5.67 mg EQ.L^{-1} represented by flavonoids. Furthermore, it promoted an average tyrosinase acceleration of 98.87%, a result 15% higher than kojic acid (85.88%), a depigmenting agent commonly used in cosmetics. but with low efficacy and chemical instability. To validate the applicability of this active ingredient as a potential substitute for kojic acid, two cosmetic products were formulated - a cream and a facial serum - containing this active ingredient. The tests applied throughout the stability test demonstrated that the addition of the active ingredient did not alter the visible, organoleptic and microbiological characteristics of the formulations. Given these results, this pioneering work opens up new market opportunities for the use of the extracellular fraction from *G. sulphuraria* cultivation.

Keywords: biocosmetics; microalgae; anti-tyrosinase inhibitors; kojic acid; melanogenesis.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$).....	50
Equação 2 – Produtividade celular (P)	50
Equação 3 – Tempo de geração celular	50
Equação 4 – Teor de lipídeos (%)	52
Equação 5 – Determinação de cinzas (%).....	53
Equação 6 – Cálculo FPS.....	55
Equação 7 – Cálculo inibição relativa.....	57
Equação 8 - Cálculo da espalhabilidade em formulações cosméticas	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática de diferentes metabolismos	20
Figura 2 – Cascata de melanogênese	34
Figura 3 - Inibidores de tirosinase	37
Figura 4 - Estrutura geral de derivados de tiosemicarbazona com todas as posições de substituição possíveis atribuídas.....	39
Figura 5 – Cultivo <i>G. sulphuraria</i> em amido em condições heterotróficas.....	49
Figura 6 – Amostras controle para teste de estabilidade acelerada nas cinco condições propostas	63
Figura 7 – Amostras contendo ativo de <i>G. sulphuraria</i> para teste de estabilidade acelerada nas cinco condições propostas.	63
Figura 8 – Equipamento AquaLab X para análise atividade de água	65
Figura 9 - Sistema para análise de espalhabilidade	66
Figura 10 – Cultivo heterotrófico em amido e cultivo autotrófico de <i>G. sulphuraria</i> ..	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Designação de Categoria de Proteção (DCP) relativa à proteção oferecida pelo produto contra radiação UVB e UVA para a rotulagem dos Protetores Solares.....	31
Quadro 2 - Principais inibidores de tirosinase comercializados indústria cosmética e suas características	36
Quadro 3 – Formulação do creme facial para pele madura com CF de <i>G. sulphuraria</i>	60
Quadro 4 – Formulação do Sérum facial com CF de <i>G. sulphuraria</i>	61
Quadro 5 – Amostragem da formulação creme pele madura para teste de estabilidade	63
Quadro 6 - Amostragem da formulação sérum facial para teste de estabilidade	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação do crescimento celular e produtividade de biomassa em cultivos autotróficos e heterotróficos.	23
Tabela 2 – Macro e micronutrientes de diferentes condições de cultivo da <i>G. sulphuraria</i>	25
Tabela 3 – Meio de cultura Allen.....	49
Tabela 4 - Relação entre efeito eritematogênico e intensidade da radiação UVB nos comprimentos de onda.....	56
Tabela 5 - Cinética de crescimento da <i>G. sulphuraria</i> em diferentes concentrações de amido e glicose	71
Tabela 6 – Capacidade antioxidante e compostos fenólicos da fração extracelular de <i>G. sulphuraria</i>	77
Tabela 7 - Percentual de inibição da CF de <i>G. sulphuraria</i> e do controle ácido kójico	83
Tabela 8 – Estabilidade preliminar creme facial controle e com adição do CF de <i>G. sulphuraria</i>	87
Tabela 9 - Estabilidade preliminar sérum facial controle e com adição do caldo fermentado de <i>G. sulphuraria</i>	88
Tabela 10 – Características organolépticas do creme facial controle e com adição CF de <i>G. sulphuraria</i>	89
Tabela 11 - Características organolépticas do sérum facial controle e com adição CF de <i>G. sulphuraria</i>	90
Tabela 12 – pH médio dos cremes e sérums facial controles e com adição de CF de <i>G. sulphuraria</i>	92
Tabela 13 – Atividade de água dos cremes controle (B) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada	94
Tabela 14 - Atividade de água dos cremes CF de <i>G. sulphuraria</i> (G) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada.....	94
Tabela 15 - Atividade de água dos sérums facial controle (B) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada.....	95
Tabela 16 - Atividade de água dos sérums facial de CF de <i>G. sulphuraria</i> (G) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada	95

Tabela 17 – Média das atividades de água do creme e sérum facial ao longo da estabilidade acelerada	96
Tabela 18 – Espalhabilidade dos cremes controle e CF de <i>G. sulphuraria</i> ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada	96
Tabela 19 - Espalhabilidade dos sérums controle e CF de <i>G. sulphuraria</i> ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada	97
Tabela 20 – Análise microbiológica para bactérias a 35°C ao longo da estabilidade acelerada do creme facial	99
Tabela 21 - Análise microbiológica para Fungos e leveduras ao longo da estabilidade acelerada do creme facial	100
Tabela 22 - Análise microbiológica para Bactérias a 35 °C ao longo da estabilidade acelerada do sérum facial	101
Tabela 23 - Análise microbiológica para Fungos e leveduras ao longo da estabilidade acelerada do sérum facial	102

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 MICROALGAS	19
2.2 <i>GALDIERIA SULPHURARIA</i> E SUAS CARACTERÍSTICAS	22
2.3 APLICAÇÕES DE <i>G. SULPHURARIA</i> E OPORTUNIDADES	25
2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	28
2.4.1 Potencial Antioxidante	29
2.4.1.1 Agentes fotoprotetores	30
2.4.2 Inibidores de tirosinase.....	32
2.5 COSMÉTICOS: UMA NOVA FRENTE DO USO DE MICROALGAS	39
2.5.1 Formulações cosméticas e ensaios de estabilidade	42
2.5.2 Estabilidade Preliminar.....	44
2.5.2.1 Ciclos de Congelamento-Descongelação.....	44
2.5.2.2 Centrifugação	45
2.5.3 Estabilidade acelerada	45
2.5.3.1 Avaliação organoléptica.....	46
2.5.3.2 Avaliação físico-química	46
2.5.3.3 Espalhabilidade	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	48
3.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO	50
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	51
3.3.1 Extração da biomassa	51
3.3.2 Determinação de proteínas	51
3.3.3 Determinação de açúcares totais	52
3.3.4 Determinação de lipídeos.....	52
3.3.5 Determinação de cinzas	53
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO FERMENTADO.....	53

3.4.1 Determinação do potencial antioxidante.....	53
3.4.2 Determinação de Compostos fenólicos totais (CFT)	54
3.4.3 Fator proteção solar (FPS) na região UVB.....	55
3.4.4 Determinação da ação anti-tirosinase	56
3.4.5 Determinação de Flavonoides	57
3.5 APLICAÇÃO COSMÉTICA.....	58
3.5.1 Estabilidade preliminar	58
3.5.1.1 Ciclos de Congelamento-Descongelamento.....	59
3.5.1.2 Centrifugação	59
3.5.2 Estabilidade Acelerada.....	59
3.5.2.1 Aspecto, Cor e Odor	64
3.5.2.2 Determinação do pH.....	64
3.5.2.3 Atividade de água (A_w)	65
3.5.2.4 Espalhabilidade	65
3.5.2.5 Análise Microbiológica	66
3.5.2.6 Análise estatística dos dados	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO	68
4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BIOMASSA	73
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO FERMENTADO.....	76
4.3.1 Potencial Antioxidante	76
4.3.2 Compostos Fenólicos	79
4.3.3 Flavonoides	81
4.3.4 Fator de proteção solar (FPS).....	81
4.3.5 Inibidores de tirosinase.....	82
4.4 APLICAÇÃO COSMÉTICA.....	87
4.4.1 Estabilidade preliminar	87
4.4.2 Estabilidade acelerada	88
4.4.2.1 Aspecto, cor e odor.....	89
4.4.2.2 Análise de pH	92
4.4.2.3 Atividade de água	93
4.4.2.4 Análise de espalhabilidade	96
4.4.2.5 Análise microbiológica	98

5 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS.....	104

1 INTRODUÇÃO

As novas tendências e novidades no ramo da beleza aquecem o mercado e mudam a todo tempo de acordo ao perfil dos consumidores, que se encontram mais atentos e preocupados às questões sociais e ambientais durante a aquisição de um produto. Os consumidores exigem bons componentes na formulação, embalagens sustentáveis, selos de aprovação e confiabilidade e que atendem as necessidades ambientais, que são incansavelmente impostas (GOYAL; JEROLD, 2023).

As empresas líderes do mercado desviaram sua atenção de ingredientes convencionais a base fóssil para aqueles advindos de tecnologias verdes, como forma de satisfazer a demanda dos clientes por cosméticos sustentáveis e demonstrar ações em prol do meio ambiente. Segundo previsão do relatório de pesquisa de negócio, o mercado global de cosméticos naturais prevê uma receita de US\$ 18,48 bilhões até o final de 2028, projetado para atingir um valor revisado de US\$ 52,2 bilhões até 2030 (MARKET RESEARCH, 2023)

O comércio de cosméticos sustentáveis, naturais e mais ecológicos vem tomando grandes proporções porque esses produtos conquistam confiança e respeito ao tratar a natureza de maneira justa, um dos pilares da economia circular (GOYAL; JEROLD, 2023). Dentre os cosméticos sustentáveis de interesse, destacam-se aquelas formulações multifuncionais, que cuidem da pele e proporcionem benefícios terapêuticos ao consumidor. Eles ainda são categorizado em subsegmentos com base nas necessidades específicas do consumidor; por exemplo: clareamento da pele, protetores solares, redutores de cicatrizes, antioxidantes, antienvhecimento ou até mesmo o conjunto delas (GOYAL; JEROLD, 2023).

Os clareadores ou agentes capazes de controlar os distúrbios da hiperpigmentação cresce em ritmo acelerado, com uma estimativa de US\$ 13,7 bilhões até 2025. A maioria das estratégias exploradas até agora se concentra no controle ou inibição da atividade da tirosinase, que é a principal enzima na biossíntese de melaninas, os pigmentos responsáveis pela pigmentação da pele em mamíferos (LI et al., 2021; PANZELLA; NAPOLITANO, 2019; PENG et al., 2022)

Em cosméticos convencionais, os inibidores sintéticos da tirosinase mais extensamente utilizados são hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico, e arbutina.

No entanto, efeitos colaterais indesejáveis estão presentes na maioria desses agentes. A hidroquinona é potencialmente mutagênica e ligada a uma série de reações adversas, como dermatite de contato, irritação, eritema transitório, queimação e sensação de formigamento. A arbutina, uma pró-droga da hidroquinona, é quimicamente instável e pode liberar hidroquinona com potencial toxicidade para a medula óssea. O ácido ascórbico é sensível ao calor e se degrada facilmente (PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017).

O ácido kójico, o agente anti-tirosinase mais utilizado, dispõe de baixa eficácia, certa citotoxicidade, instabilidade química e lipofilicidade (PENG et al., 2022). Foi relatado como seguro para a pele humana na concentração máxima de 1%, mas o efeito de despigmentação foi observado na concentração de 4% (HAŁDYS; LATAJKA, 2019). Desafios como esses são enfrentados pela indústria cosmética para promover produtos seguros, com ação despigmentante eficiente.

Diante desses desafios, vários microrganismos podem ser explorados na produção de metabólitos secundários como insumos ativos em cosméticos. Seus metabólitos secundários apresentam atividades biológicas e são denominados como “compostos bioativos”, podendo ser ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), pigmentos (clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas), carboidratos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, polifenóis, fitoesteróis (YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

Esses compostos apresentam vários efeitos, como atividades antioxidantes, antibacterianas, antivirais, antifúngicas e anti-tirosinase. Muitas espécies de algas e microalgas já são usadas para produzir cosméticos de alto valor, como agentes espessantes, antioxidantes, agentes aglutinantes e agentes clareadores de pele (ALAM; XU; WANG, 2020; YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

Ainda não explorada para tal função, *Galdieria sulphuraria* pertence a um gênero capaz de crescer heterotroficamente (ausência de luz), usando várias fontes de carbono sob condições extremas de crescimento – altas temperaturas e meios ácidos. Na ausência de luz, é capaz de produzir altos teores de proteínas e demais macronutrientes, bem como produzir pigmentos de alto valor agregado, como a ficocianina (GRAZIANI et al., 2013)

Essas condições peculiares de crescimento, a escassez de estudos voltados à indústria cosmética, despertou interesse em explorar essa tendência no campo das

microalgas em aplicações cosméticas e química fina. A proposta desse estudo visa explorar os metabólitos excretados durante o crescimento de *G. sulphuraria* em condições heterotróficas em uma fonte rica de glicose, o amido. Essa microalga é considerada multiextremófila, razão pela qual vem sendo estudada em outras áreas. No entanto, a aplicação cosmética proposta nesse estudo é inovadora e abre uma nova perspectiva de mercado, cujo foco das pesquisas atuais com *G. sulphuraria* tem sido biorremediação e no tratamento de águas residuais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante e clareador da fração extracelular do cultivo de *G. sulphuraria* em condições heterotróficas, para fins cosméticos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Cultivar *G. sulphuraria* em amido de milho granular e glicose para obter uma comparação na cinética de crescimento;
- Caracterizar as frações extra e intracelular do cultivo de *G. sulphuraria* em amido sob condições heterotróficas;
- Determinar potencial antioxidante, fator de proteção solar (FPS) e anti-tirosinase da fração extracelular do cultivo de *G. sulphuraria* em amido, sob condições heterotróficas;
- Aplicar o ativo biotecnológico extraído do cultivo de *G. sulphuraria* em amido sob condições heterotróficas em formulações cosméticas e avaliar sua estabilidade preliminar.
- Aplicar o ativo biotecnológico nas duas melhores formulações definidas na triagem inicial e testar a estabilidade acelerada e durante 90 dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

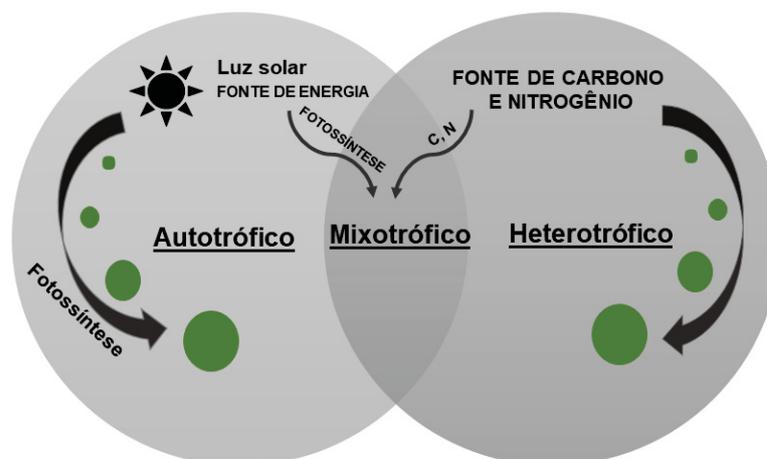
2.1 MICROALGAS

Conhecidas como algas microscópicas, as microalgas são organismos unicelulares ou multicelulares, com grande diversidade morfológica e fisiológica; dependendo da estrutura celular, podem ser divididas em procarióticas e eucarióticas. O tamanho das microalgas está situado entre de 5 a 50 μm e a grande variedade de espécies existentes de composição bioquímica variada, permite encontrá-las em diversos tipos de ambientes, seja eles aquáticos e/ou terrestres incluindo sob condições extremas de temperatura, pH, intensidade de luz e salinidade (RIZWAN et al., 2018).

As microalgas procarióticas podem se dividir em Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta, as quais não possuem as organelas delimitadas por membranas. As eucarióticas, por sua vez, (Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Chlorophyta) possuem organelas, membrana celular composta de polissacarídeos, membrana plasmática responsável pelo fluxo de substâncias no protoplasma e núcleo circundado por dupla membrana porosa (BRASIL et al., 2017; ZIMERMANN, 2019).

Água, fonte de carbono e luz são três componentes principais para seu crescimento; absorvem a luz solar, capturam CO_2 do ar e produzem cerca de 50% do oxigênio atmosférico. Através da fotossíntese, as microalgas utilizam a luz solar para a produção de compostos orgânicos. No entanto, de acordo com suas necessidades nutricionais, elas podem ser classificadas como autotrófica, mixotrófica ou heterótrofa (Figura 1), dependendo se a fonte de carbono utilizada para crescimento são íons minerais inorgânicos ou compostos orgânicos, respectivamente (GEADA et al., 2018; RIZWAN et al., 2018). Além disso, podem crescer sozinhas ou em associação simbiótica com quaisquer outros organismos (BARSANTI et al., 2008).

Figura 1 – Ilustração esquemática de diferentes metabolismos



Fonte: autoria própria

As microalgas têm sido usadas há milhares de anos por populações indígenas. O primeiro relato remonta a 2000 anos para os chineses, que usaram *Nostoc* sp. para sobreviver durante a fome. Estima-se que quantidade de espécies de microalgas esteja na ordem de milhões, porém, aproximadamente, 73000 foram isoladas e publicadas (ABU-GHOSH et al., 2021) e uma parcela ainda menor são usadas na indústria. A *Arthrospira* (Spirulina) e *Chlorella* ainda hoje são as microalgas mais cultivadas comercialmente para fins alimentícios (HAMED, 2016).

No início da década de 50, numerosos sistemas foram projetados para o crescimento de microalgas, atualmente são cultivadas em larga escala, em sistemas abertos (lagoas) ou biorreatores. A escolha de um sistema de cultivo e seus ajustes vai depender da escolha da espécie, finalidade ou produto final desejado (ENDE; NOKE, 2019; GRIVALSKÝ et al., 2019).

Os sistemas abertos são voltados para produção em larga escala de toneladas de biomassa; possíveis contaminações e poucas condições de controle são características desse modelo de cultivo, diferentemente dos sistemas de cultivo realizado em biorreatores, com a finalidade de produção de alto valor agregado e maior refino (ENDE; NOKE, 2019; GRIVALSKÝ et al., 2019).

Ainda que grande parte de suas espécies seja inexplorada, as espécies já estudadas relatam várias características bioquímicas e fisiológicas do ponto de vista de aplicações industriais, seja na indústria alimentícia (GRAZIANI et al., 2013), farmacêutica (HAMED, 2016) e de combustíveis, com forte apelo sustentável (CHEW

et al., 2017; GEADA et al., 2018; RIZWAN et al., 2018; VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011).

As microalgas tem sido uma fonte importante para produção de biocombustíveis, sintetizam e podem acumular rapidamente quantidades substancialmente maiores de lipídios do que as plantas terrestres devido às suas altas taxas de crescimento (RAWAT et al., 2013); além disso contém o dobro da energia armazenada por átomos de carbono do que os carboidratos, o que torna competitivo e supera a eficiência de obtenção convencionais de produção (ASHOKKUMAR; RENGASAMY, 2012; CHEW et al., 2017; VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011).

A preocupação constante e crescente com as questões ambientais foi um dos motivos que intensificaram os estudos com microalgas na possibilidade de atuar como uma frente inovadora nos métodos de tratamento de águas. Atua de forma simultânea na fixação de CO₂ e no tratamento de águas residuais, a qual fornece uma fonte de alimento para crescimento de microalgas e a biomassa resultante pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, junto com a captura de CO₂ proveniente dos processos (HENKANATTE-GEDERA et al., 2017; RAZZAK et al., 2017). Vê-se um exemplo atrativo de economia circular!

Outros compostos bioativos de microalgas, como ácidos graxos (KANDA et al., 2013; KAWASHIMA; UMEZAWA; KIJIMA, 2018), polissacarídeos (MALTSEV et al., 2021; SPOLAORE et al., 2006), proteínas (AMORIM et al., 2021), carotenoides (MALTSEV et al., 2021), pigmentos (MOROCHO-JÁCOME et al., 2020; YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020), antioxidantes (VILLARÓ et al., 2021) e enzimas (BEN HLIMA et al., 2021) estão ganhando visibilidade e possibilitando demais aplicações sustentáveis. Dependendo da espécie, são acumulados sob condições de estresse, incluindo privação de nutrientes, pH, intensidade de luz, temperatura e salinidade (HAMED, 2016).

A astaxantina, um poderoso antioxidante comercializado de alto valor agregado é um exemplo de aplicação da biomassa microalgal. Tem sido amplamente utilizada nos produtos de cuidados com a pele, conhecidos como *skin care*. *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, e *Scenedesmus obliquus* foram identificadas como as cepas de algas mais promissoras na produção desse carotenoide (LU et al., 2021; VILLARÓ et al., 2021).

Metabólitos secundários de microalgas podem ser de alto valor ou como matéria prima verde para obtenção de produtos biotecnológicos inovadores. A flexibilidade no crescimento de microalgas torna-se vantajoso frente a demais microrganismos, pois podem ser cultivadas em fermentadores com açúcares orgânicos ou mixotroficamente combinando luz e açúcares como fonte de energia. Além do mais, algumas espécies toleram ambientes extremos, sendo ainda mais competitivas e interessantes (ABU-GHOSH et al., 2021; SYDNEY et al., 2019).

2.2 *Galdieria sulphuraria* E SUAS CARACTERÍSTICAS

Conhecida pela sua capacidade de crescer em condições extremas, é uma microalga unicelular, acidófila pertencente à família das Cyanidiales. Um subgrupo de ramificação mais profunda do Rhodophyta (algas vermelhas). Sua reprodução é exclusivamente assexuada por divisão binária (EREN et al., 2018). *G. sulphuraria* é capaz de crescer em pH 0,5–4 e temperaturas de até 56 °C, condições essas que dificultam qualquer competição de microrganismos; o que permite seu cultivo em lagoas abertas em grande escala para aplicações biotecnológicas (CURIEN et al., 2021; SLOTH et al., 2017). A estrutura dessa espécie consiste de um plastídio (cloroplasto) contido em células esféricas de paredes espessas, uma a três mitocôndrias, um núcleo, um vacúolo e produtos de armazenamento (CINIGLIA et al., 2004).

Possui uma capacidade única, dentre as demais do gênero, de crescer de forma heterotrófica, assimilando outras formas de carbono disponível que não a proveniente do sol. Para introduzir diferentes açúcares no metabolismo central de carboidratos, as células precisam de uma ampla variedade de açúcar cinases (BARBIER et al., 2005).

Seu genoma codifica gluco-, galacto-, fruto-, glicero-, xilulo- e riboquinases. Todos eles exibem semelhança mais próxima com enzimas procarióticas e não às quinases de açúcar de plantas correspondentes. *G. sulphuraria* também codifica uma série de poliálcool desidrogenases, que são necessárias para a introdução de álcoois de açúcar em seu metabolismo heterotrófico (BARBIER et al., 2005). Além disso, pode crescer utilizando essas duas fontes de carbono, o que se conhece por cultivo mixotrófico (SLOTH et al., 2017; THIELEMANN; SMETANA; PLEISSNER, 2021).

Em muitos casos, quando se utiliza de um cultivo mixotrófico a heterotrofia prevalece; no entanto, recentemente foi revelado que na *G. sulphuraria* que esse efeito sinérgico de fotossíntese e o metabolismo de operam simultaneamente e decorrem de uma estimulação da fotossíntese pelo CO₂ de origem respiratória, que supera a limitação ao ciclo de Calvin-Benson-Bassham, suprimindo a fotorrespiração (CURIEN et al., 2021).

Quando se fala em cultivo heterotrófico, há uma grande variedade de carbono orgânico que a *G. sulphuraria* é capaz de crescer: são 50 substratos diferentes. Glicose, galactose, xilose, hemicelulose, amido hidrolisado, coprodutos da indústria de leite e queijo e resíduos da casca de tangerina já foram relatados na literatura (LIM; MIN; PARK, 2023; OCCHIPINTI et al., 2023; PORTILLO et al., 2022; RAHMAN; SARIAN; VAN DER MAAREL, 2020; ZIMERMANN et al., 2020). Quando o cultivo ocorre na presença de uma fonte de carbono orgânica, a síntese do pigmento é inibida e o cloroplasto das células se desdiferencia em um proplastídeo. Como resultado, as células perdem sua coloração azul-esverdeada e tornam-se amarelo-esverdeado (MARTINEZ-GARCIA, 2017).

No entanto, comparados os cultivos autotróficos com cultivos heterotróficos e/ou mixotróficos, a quantidade de biomassa e células produzidas na ausência de luz é significativamente maior – Tabela 1 (CANELLI et al., 2023; CURIEN et al., 2021).

Tabela 1 – Comparação do crescimento celular e produtividade de biomassa em cultivos autotróficos e heterotróficos.

Cultivo	Fonte de Carbono	Concentração da fonte C	Biomassa	Referência
Heterotrófico	Glicose	35,00 g.L ⁻¹	16,70 g.L ⁻¹	(WAN et al., 2016)
Heterotrófico	Glicose	10,00 g.L ⁻¹	6,40 g.L ⁻¹	(GRAVERHOLT; ERIKSEN, 2007)
Autotrófico	CO ₂	-	0,20 g.L ⁻¹	(GRAZIANI et al., 2013)
Autotrófico	CO ₂	-	4,90.10 ⁶ cél.mL ⁻¹	(ZIMERMANN et
Heterotrófico	Glicose	10,00 g.L ⁻¹	52,0.10 ⁶ cél.mL ⁻¹	al., 2020)

Heterotrófico	Lactose	10,00 g.L ⁻¹	75,0.10 ⁶ cél.mL ⁻¹	
Heterotrófico	Glicose	4,50 g.L ⁻¹	20,0.10 ⁶ cél.mL ⁻¹	(CURIEN et al., 2021)
Autotrófico	CO ₂	-	3,30.10 ⁶ cél.mL ⁻¹	

Fonte: autoria própria

Do ponto de vista fisiológico, sabe-se que o amido e o glicogênio são moléculas de armazenamento de energia, frequentemente encontrados em plantas, espécies de algas verdes e vermelhas, bactérias, leveduras e células animais. Ambos são polímeros de glicose compostos de uma cadeia linear e ramos ligados em certos pontos distribuídos, no qual refletem na estrutura final da molécula, conferindo diferentes propriedades (MARTINEZ-GARCIA; KORMPA; VAN DER MAAREL, 2017).

O glicogênio contém cadeias lineares mais curtas em comparação com a amilopectina, polímero presente no amido junto com amilose, e um número maior de pontos de ramificação aleatórios dispostos. As algas vermelhas, cientificamente chamadas de Rhodophytas, na qual a *G. sulphuraria* está inserida, possuem uma reserva de armazenamento chamada amido florideano, estrutura essa caracterizada pela ausência de amilose. Essa reserva executa funções metabólicas e estruturais semelhantes ao glicogênio e amido vegetal (MARTINEZ-GARCIA; KORMPA; VAN DER MAAREL, 2017; MARTINEZ-GARCIA; STUART; VAN DER MAAREL, 2016).

Sua particularidade está na localização dessa reserva nas células; embora exista presença de cloroplastos, a síntese e armazenamento do amido florideano ocorre em no citosol das células, o que difere do amido vegetal que se encontra acumulado nos plastídios. Dessa forma, a via metabólica desse amido também ocorre de maneira distinta (MARTINEZ-GARCIA; KORMPA; VAN DER MAAREL, 2017).

A flexibilidade metabólica da *G. sulphuraria* torna-se complexo definir sua composição de macronutrientes e micronutrientes, que podem variar a depender da forma de cultivo e da fonte de carbono. Já dito anteriormente, cultivos heterotróficos podem inibir a produção de pigmentos, por exemplo. No entanto, diante da literatura presente, tem-se um grande predomínio de carboidratos, seguido de um bom percentual proteínas e baixo teor de lipídeos (Tabela 2) (GRAZIANI et al., 2013).

Tabela 2 – Macro e micronutrientes de diferentes condições de cultivo da *G. sulphuraria*

	<i>G. sulphuraria</i> em condições heterotróficas	<i>G. sulphuraria</i> em condições autotróficas
		mg.g⁻¹
Carboidratos totais	691 ± 31	629 ± 16
Proteínas	265 ± 25	325 ± 32
Lipídios	11,4 ± 3,0	17,7 ± 3,2
Fibra alimentar	514 ± 38	540 ± 25
		mg.kg⁻¹
Vitamina B (B2 e B3)	62 ± 3	20 ± 2
Vitamina E	9 ± 1	15 ± 3
Astaxantina	n.d.	575 ± 123
Luteína		387 ± 112
Clorofila a	n.d.	12,020 ± 541
		g.kg⁻¹
Ficobiliproteínas (Aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina)	11,5 ± 1,2	82,5 ± 3,1

Fonte: Adaptado de (GRAZIANI et al., 2013)

Assim como demais microalgas, também é fonte valiosa de muitas vitaminas essenciais (por exemplo, A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico), pigmentos e compostos antioxidantes, com destaque para produção de ficocianina – pertencente às ficobiliproteínas complexo proteína-pigmento na cor azul com potencial ação antioxidante – (Tabela 2). É importante ressaltar que a disponibilidade desses macro e micronutrientes vai depender do cultivo a ser utilizado (GRAZIANI et al., 2013).

Diante da flexibilidade metabólica e crescimento em condições extremas de pH e temperatura aumentam-se as possibilidades de aplicações, ainda pouco exploradas, dessa microalga em proporções maiores e de maior valor agregado.

2.3 APLICAÇÕES DE *G. sulphuraria* E OPORTUNIDADES

A economia circular é um dos pilares da sustentabilidade, métodos inovadores com apelo ambiental vem sendo cada mais explorados para frear os prejuízos incalculáveis no meio ambiente. As microalgas, em especial *G. sulphuraria*, atuam

fortemente como uma excelente estratégica para tratamento de águas residuais, tanto em escala industrial como em pequenos negócios, utilizando de resíduos alimentares como fonte de carbono para seu crescimento (WOLLMANN et al., 2019)

Seu crescimento em águas residuais pode diminuir significativamente os nutrientes, como carbono orgânico, diferentes formas de nitrogênio (N) e fósforo (P), o que diminui consideravelmente os custos em estações de tratamento que hoje precisam incluir várias etapas para remoção de tais nutrientes (VAN VOORHIES et al., 2014; WOLLMANN et al., 2019).

As eficiências de remoção ultrapassam de 85% para nitrogênio amoniacal e 95% para fosfatos. Outros trabalhos relatam redução, após 3 dias, dos níveis de N de 23,0 para 2,6 mg L⁻¹, fosfato P₄ de 4,5 para 0,6 mg. L⁻¹. Após 7 dias, pode chegar a uma taxa de remoção de NH₃ 4.85 mg.L⁻¹.d⁻¹ e fosfato (PO₄) 1, 21 mg.L⁻¹.d⁻¹. Em paralelo, uma produção de biomassa na taxa de 2,5 mg.L⁻¹ (VAN VOORHIES et al., 2014; WOLLMANN et al., 2019). A biomassa rica em energia produzida serve como matéria-prima para a produção de biocombustíveis gasosos ou líquidos, ou produtos da química fina, como pigmentos e enzimas, por exemplo.

A remoção de nutrientes de águas residuais, pela *G. sulphuraria*, não se limita a carbono, nitrogênio e fósforo; estudos revelam uma capacidade de recuperação de metais preciosos com alta eficiência por biossorção, cerca de 90% de ouro (Au³⁺) e paládio (Pd²⁺) foram recuperados de efluentes metálicos, demonstram os estudos de Ju e colaboradores (JU et al., 2016). Elementos raros como neodímio (Nd III), disprósio (Dy III), lantânio (La III) e cobre (Cu II) também foram recuperados com uma eficiência de 90%, os estudos demonstram que os metais são acumulados no interior das células (MINODA et al., 2015).

Assim como as demais espécies de microalgas, a *G. sulphuraria* pode acumular lipídeos para produção de biocombustíveis. No entanto, essa microalga em particular, como já dito anteriormente, pode produzir grandes quantidades de glicogênio altamente ramificado, amido florideano, e polissacarídeos extracelulares (MARTINEZ-GARCIA, 2017; SAKURAI et al., 2016). No quesito aplicação, o glicogênio altamente ramificado pode ser comparado com a funcionalidade dos amidos nos alimentos. De forma breve e resumida, o amido pode ser dividido em 3 partes: de rápida digestão, lenta e amido resistente; esse último de grande valia quando o assunto é alimento funcional, pois atua como uma fibra no trato intestinal e pode contribuir para

diminuição de diabetes tipo 2 (MARTINEZ-GARCIA; KORMPA; VAN DER MAAREL, 2017)

Dessa forma, o glicogênio acumulado da *G. sulphuraria*, de acordo com a literatura, pode apresentar cerca de 64% da fração resistente- isto é – que não é digerido pelo organismo - comparado à 44% de outra fonte de amido vegetal comercial (MARTINEZ-GARCIA; KORMPA; VAN DER MAAREL, 2017).

Embora seja promissora como fonte de carboidratos funcionais, muitos estudos relatam que essa espécie pode acumular quantidades significativas de proteínas, especialmente, ficobiliproteínas. Os principais são c-ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina. São pigmentos naturais, agentes fluorescentes, e na indústria farmacêutica atuam com potencial antioxidante, anti-inflamatório, neuroprotetor e agentes hepatoprotetores (CARBONE et al., 2020). Na *G. sulphuraria*, a aloficocianina e ficocianina são as formas dominantes (ABIUSI et al., 2022; LIM; MIN; PARK, 2023; SCHMIDT; WIEBE; ERIKSEN, 2005; SLOTH et al., 2017; WAN et al., 2016, 2021).

A produção de ficocianina pela *G. sulphuraria* a partir de resíduos alimentares de restaurantes e padaria enriquecidos com nutrientes inorgânicos é um grande exemplo de economia circular. Nesse estudo, pode se obter em torno de 21 mg/g desse pigmento natural a partir do cultivo heterotrófico de resíduos hidrolisados, compostos basicamente por glicose. Desafios de produtividade e temperatura alta na obtenção de ficocianina foram relatados nesse estudos, porém ainda pode-se afirmar que essa microalga é uma candidata promissora para valorização de resíduos alimentares para produção de ficocianina (SLOTH et al., 2017).

Em contrapartida, outro estudo apresentou uma melhor estabilidade térmica da ficocianina produzida pela *G. sulphuraria*, quando comparada à produzida pela *Spirulina platensis*, podendo suportar temperaturas mais elevadas e ainda assim manter-se ativa (WAN et al., 2021).

A literatura dos achados acima reforça que diferentes cultivos (autotróficos, mixotróficos e heterotróficos) influenciam fortemente no perfil lipídico, proteico e no acúmulo de reserva energética, como glicogênio altamente ramificado.

2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos são metabólitos secundários que podem ser derivados de plantas, algas, vegetais e em alimentos, em geral. Entende-se por metabólitos primários: carboidratos, lipídeos e proteínas e metabólitos secundários uma série de biomoléculas como, esteróis, cetonas, hidrocarbonetos, vitaminas, carotenoides, entre outros. São considerados extra nutricionais, mas de vital importância para manutenção da saúde humana (VUPPALADADIYAM et al., 2018).

Compostos bioativos de alto valor são descartados diariamente, seja no cotidiano ou da indústria. Casca de alimentos, sementes e bagaço se concentram a maioria dos compostos bioativos dos alimentos. A proposta de economia circular tem como base a riqueza desses nutrientes que são fornecidos pelos resíduos alimentares agroindustriais (MARTINS et al., 2023)

Uma infinidade de compostos bioativos é encontrada nas microalgas, presentes na forma de pigmentos (como carotenoides, clorofilas e ficocianinas), proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, as microalgas possuem uma excelente capacidade em sequestrar dióxido de carbono (CO₂) da atmosfera e utilizar o mesmo como fonte de matéria-prima para produção dessas biomoléculas (MARTINS et al., 2023; SYDNEY et al., 2010).

Dentre os compostos bioativos existentes, destacam-se os compostos antioxidantes, como a classe dos polifenóis, pigmentos e vitaminas e compostos anti-inflamatórios, antimicrobianos e agentes clarificantes, como os inibidores de tirosinase – enzima que catalisa reações de formação de melanina. Dentro de cada subgrupo, existe uma extensa lista de biomoléculas de propriedades nutraceuticas de grande valor agregado.

Quando esse composto bioativo é incorporado à formulação cosmética ou farmacêutica, por exemplo, pode considerar que é um ingrediente ativo que confere uma propriedade específica ao produto adicionado. Os ingredientes ativos são frequentemente embasados em estudos científicos para mostrar a eficácia do alvo e são comumente categorizados em antioxidantes, adstringentes, esfoliantes, umectantes, hidratante e surfactante (GOYAL; JEROLD, 2023).

2.4.1 Potencial Antioxidante

Os radicais livres são moléculas instáveis, reativas resultantes do metabolismo do sistema enzimático, que gera estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo acelera o envelhecimento e aumenta o risco de doenças cardiovasculares, câncer e pode promover alterações no sistema imunológico. Diante disso, a busca por compostos antioxidantes naturais, na intenção de substituir a origem sintética desse ativo, tem se tornado cada vez mais interessante. Os antioxidantes atuam retardando todo esse processo de estresse oxidativo (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2022)

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, contemplam uma lista de compostos com propriedades antioxidantes. Mesmo com uma diversidade estrutural entre os identificados, quimicamente apresentam em sua estrutura um grupo fenol e um anel aromático hidroxilado. São subdivididos em ácidos fenólicos e flavonoides, que também se dividem em outras classes. Sua grande capacidade antioxidante é capaz de inibir ou amenizar a ação de radicais livres e sua intensidade depende do número e da disposição dos grupos hidroxilas (-OH) em sua estrutura. Catequina, quercetina, ácido gálico, rutina são alguns dos compostos fenólicos já relatados na literatura encontrados em microalgas (DE LA ROSA et al., 2019; DEL MONDO et al., 2021).

Os antioxidantes produzidos por microalga estão ganhando destaque, devido sua produção sustentável e a possibilidade de produzir diferentes metabólitos secundários, não somente antioxidantes, em uma única espécie. Além dos flavonoides, polifenóis e a clorofila – pigmento mais conhecido extraído de microalgas, esteróis, carotenoides e demais pigmentos tem sido descritos na literatura com essa propriedade (LU et al., 2021; MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2022; MOROCHO-JÁCOME et al., 2020; WAN et al., 2021).

Assim como a clorofila, a astaxantina, um potente antioxidante natural, pertencente à classe dos carotenoides como um pigmento vermelho também tem sido descrito. *Haematococcus pluvialis* – fonte natural desse composto (CASELLA et al., 2020), *Haematococcus lacustres* (MORIMOTO; YOSHIDA; SAWAYAMA, 2020), *Chlorella sorokiniana* (YADAVALLI et al., 2022) e *Galdieria sulphuraria* (ZIMERMANN et al., 2020) revelaram promissoras na produção desse metabólito muito popular no setor de nutracêuticos.

Um ponto interessante no que diz respeito a bioprodutos de microalga, é a produção de polissacarídeos; macromoléculas naturais com propriedades biológicas, inclusive potenciais antioxidantes. A capacidade antioxidante desses polissacarídeos foi encontrada nos cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Porphyridium* sp. e *Spirulina* sp. Métodos de extração e conteúdo de fenólicos presentes influenciam nessa capacidade (CHAIKLAHAN et al., 2013; TANNIN-SPITZ et al., 2005; YU et al., 2019).

A síntese de antioxidantes por microalgas é comumente uma resposta a estresse sofrido no meio, principalmente para evitar o estresse oxidativo. Essas biomoléculas tem diversas aplicações cosméticas, na formulação de hidratantes e protetores solares, para prevenir e tratar várias condições da pele, desde o fotoenvelhecimento até o câncer (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2022).

2.4.1.1 Agentes fotoprotetores

Dentre os compostos bioativos existentes, um dos mais conhecidos são os agentes fotoprotetores, remediadores de reações químicas na epiderme, que envolve a proteção contra os radicais livres quando gerados pela exposição a raios ultra violeta – UV do espectro eletromagnético, que pode ser dividido em três regiões: UVA, de 320 a 400 nm; UVB, de 290 a 320 nm e UVC, de 200 a 290 nm. A radiação UVC é filtrado pela atmosfera antes de chegar à Terra (CEFALI et al., 2019; SCHALKA; DOS REIS, 2011).

Os raios ultravioleta A - UVA, é caracterizado por uma radiação ultravioleta mais intensa, com raios mais longos. Já os raios UVB são mais brandos que os raios UVA, conseguindo penetrar apenas na camada superficial da pele (a epiderme), porém com uma energia mais alta.

De modo geral, os protetores solares são os fotoprotetores mais conhecidos e utilizados para prevenção dos danos causados pela radiação solar. Os filtros ultravioleta (filtros UV) são os ingredientes presentes nos fotoprotetores que apresentam a capacidade de interagir com a radiação incidente, através de 3 mecanismos básicos: reflexão, dispersão e absorção. A eficácia da proteção é avaliada por meio do fator de proteção solar (FPS) (SCHALKA; DOS REIS, 2011). De acordo com a RDC nº 30 de 1 de junho de 2012, há uma relação entre o FPS, comprimento de ontem e tipos de pele, para então, classificar a categoria na rotulagem (Quadro 1).

Quadro 1 - Designação de Categoria de Proteção (DCP) relativa à proteção oferecida pelo produto contra radiação UVB e UVA para a rotulagem dos Protetores Solares.

Indicações não obrigatórias na rotulagem	Categoria indicada no rotulo (DCP)	Fator de proteção solar medido (FPS)	Fator mínimo de proteção UVA (FPUVA)	Comprimento de onda crítico mínimo
Pele pouco sensível a queimadura solar	Baixa proteção	6,0 – 14,9	1/3 do fator de proteção solar indicado na rotulagem	370 nm
Pele moderadamente sensível a queimadura solar	Média proteção	15,0 – 29,9		
Pele muito sensível a queimadura solar	Alta proteção	30,0 – 50,0		
Pele extremamente sensível a queimadura solar	Proteção muito alta	Maior que 50,0 e menor que 100		

Fonte: adaptado de ANVISA (2012)

O fator de proteção solar (FPS) quantifica a proteção que um determinado produto é capaz de oferecer, em termos de tempo de exposição, contra a queimadura solar se comparado à exposição desprotegida. Em outras palavras, se um determinado protetor apresenta o valor de FPS 30, isso significa, na prática, que é necessária uma exposição solar 30 vezes maior para produzir eritema, se comparada à situação sem o uso do protetor. É o método mais aceito para avaliação da eficácia da ação protetora nos produtos, sendo a principal informação na rotulagem dos fotoprotetores (SCHALKKA; DOS REIS, 2011).

Com a tendência do mercado brasileiro em incentivar o uso de produtos naturais, com apelo na economia circular e preocupação ambiental, os estudos envolvendo compostos bioativos com ação fotoprotetora tem se intensificado (CEFALI et al., 2019). Em relação ao uso de microalgas, pesquisas recentes revelam a capacidade de fotoproteção compostos bioativos do extrato de *Spirulina platensis*, obtendo um valor máximo de FPS de 29,06 com adição de 7% do extrato microalgal na formulação (DIANURSANTI; PRAKASA; NUGROHO, 2020).

2.4.2 Inibidores de tirosinase

A tirosinase é uma enzima multifuncional, glicosilada e oxidase. Conhecida também como metaloenzima, pois apresenta um par de átomos de cobre do tipo 3 que faz parte do sítio ativo da enzima e fundamentais na atividade catalítica; ligados a ele tem-se seis resíduos de histidina. Pode ser encontrada em animais, plantas e fungos. É a enzima chave que desempenha papel fundamental na biossíntese de melanina e no escurecimento de alimentos e está localizada na membrana do melanossoma, uma vesícula minifatorial dentro do melanócito (LEDWÓN et al., 2023; LI et al., 2021).

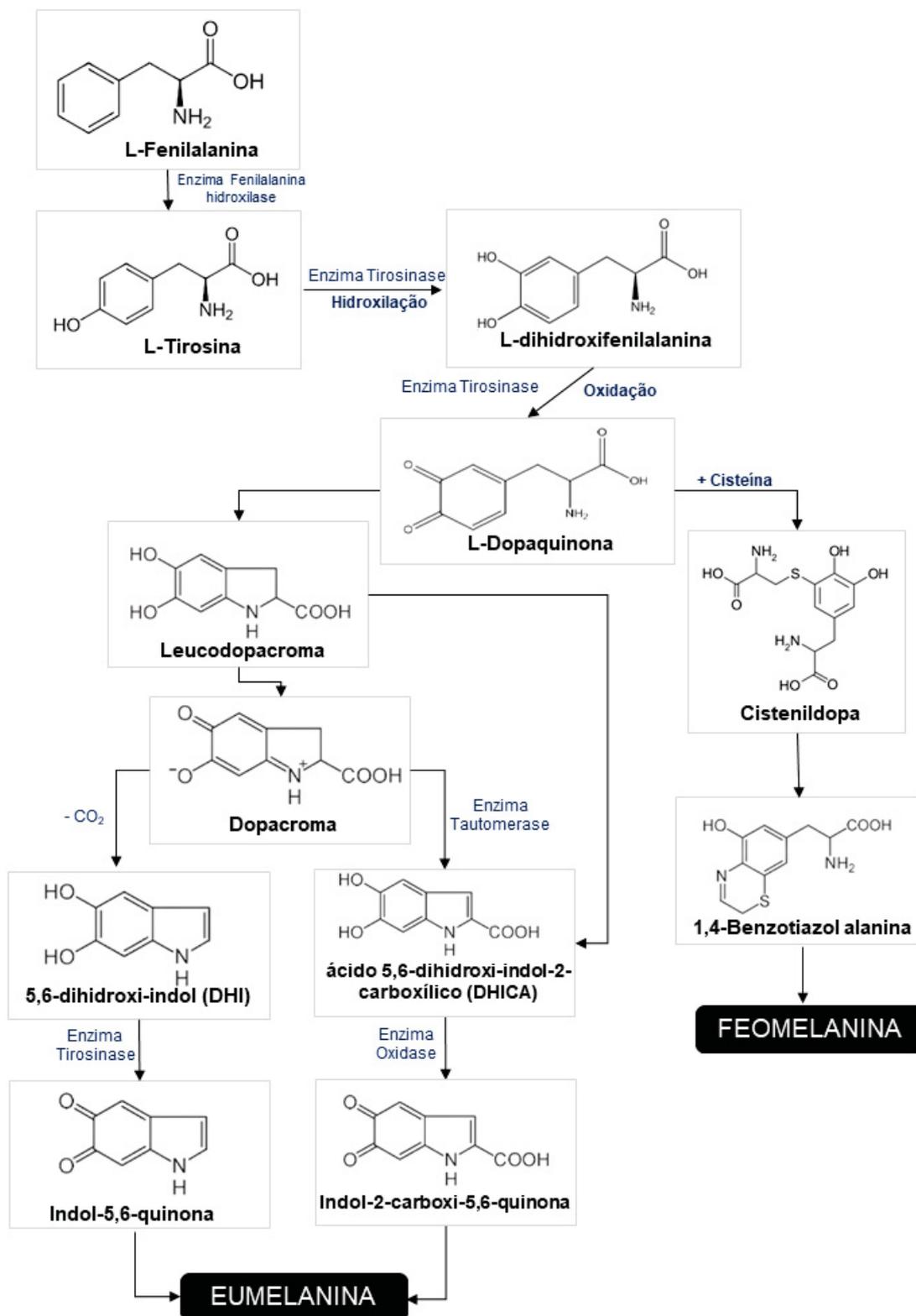
A melanina, proteína produzida a partir da tirosina – um aminoácido essencial, é responsável pela pigmentação da pele, cabelos e olhos do ser humano, através da melanogênese. A melanogênese e a pigmentação da pele são os fatores fotoprotetores mais importantes em resposta aos danos causados pela radiação ultravioleta (UV) do sol e pela fotocarcinogênese da pele. O acúmulo e distribuição desigual de melanina na pele pode levar a formação de sardas, manchas senis, melasma, locais de dano solar ou mesmo maligno melanoma, um tipo de câncer de pele (HAŁDYS; LATAJKA, 2019; LI et al., 2021). Com isso, inibidores de tirosinase tem sido uma forma eficiente no controle da pigmentação da pele (PENG et al., 2022)

A melanogênese é uma via complexa, envolve uma série complexa de reações oxidativas (Figura 2), mediadas pela enzima tirosinase do tipo 1 e 2. A síntese da melanina inicia com o processo de transporte do aminoácido L-fenilalanina para o interior dos melanossomos e sua conversão em L-tirosina pela enzima fenilalanina hidroxilase. Dentro dos melanossomos, a tirosinase catalisa duas reações: a hidroxilação da L-tirosina à L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e a oxidação para L-dopaquinona (GILLBRO; OLSSON, 2011; HAŁDYS; LATAJKA, 2019; KIM; UYAMA, 2005).

Uma vez formada a L-dopaquinona, uma série de reações ocorrem até a formação da melanina. Dois tipos de melanina são sintetizados nos melanossomos: feomelanina vermelho-amarelada e eumelanina preto-acastanhada, onde há uma conversão espontânea da leucodopacroma e dopacromo. A via da feomelanina ramifica-se da via da eumelanina na etapa L-dopaquinona e depende da presença de

cisteína que é ativamente transportada para o interior dos melanossomos(GILLBRO; OLSSON, 2011; KIM; UYAMA, 2005).

Figura 2 – Cascata de melanogênese



Fonte: Adaptado de (GILLBRO; OLSSON, 2011)

A disponibilidade de enzimas e substratos melanogênicos que decidem quais tipos de melanina a serem produzidos. A eumelanina é um polímero insolúvel marrom-escuro-preto, enquanto a feomelanina é um polímero solúvel vermelho-amarelo claro contendo enxofre (DERI et al., 2016; KIM; UYAMA, 2005; LEDWONÍ et al., 2023). Elas não se diferem só na cor, mas também no tamanho, forma e empacotamento dos grânulos.

As condições redox nos melanossomos são determinantes para o equilíbrio entre a produção desses dois tipos de melanina. A formação de eu ou feomelanina é diretamente determinada pela glutathiona reduzida (GSH) (alto GSH para eumelanina e baixo para feomelanina). A ação das enzimas antioxidantes, como a GSH, é a chave para escolha da via da cascata de melanogênese (GILLBRO; OLSSON, 2011).

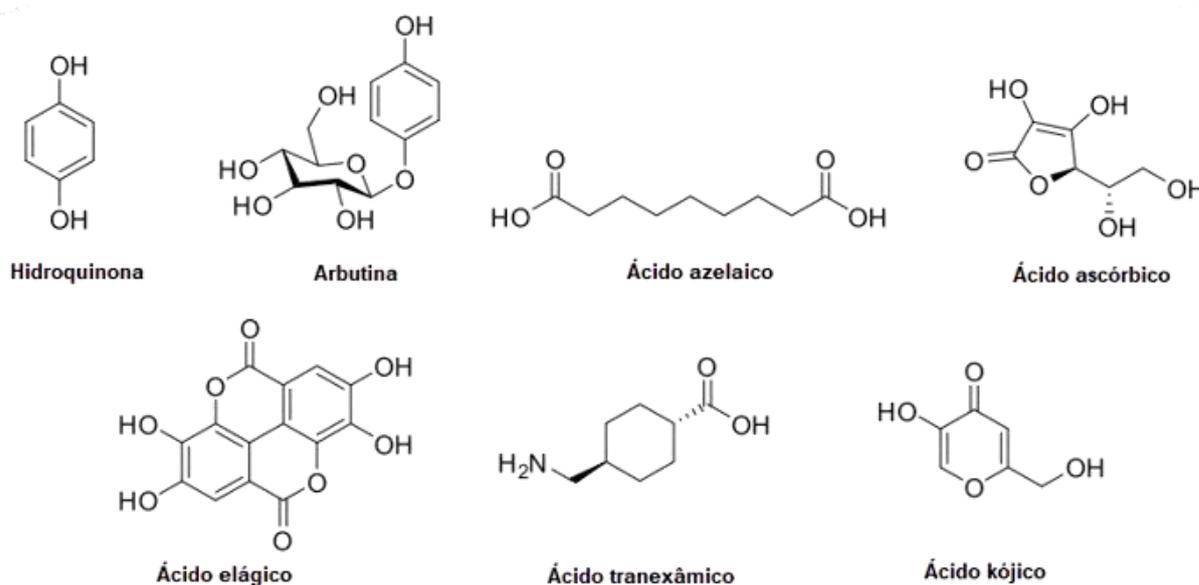
Uma vez que a tirosinase é uma enzima chave para síntese de melanina, o controle de sua atividade se torna um alvo para os inibidores da melanogênese que inibem diretamente a atividade catalítica e, conseqüentemente, os danos relacionados a hiperpigmentação, como já relatado. A descoberta de que certos fenóis substituídos têm ação despigmentante devido à sua capacidade de atuar como substrato para a tirosinase com a formação de quinonas, deu frente a uma possível estratégia de frear o metabolismo enzimático de formação de melanina (KIM; UYAMA, 2005; PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017).

Os inibidores de tirosinase, assim conhecidos, são produzidos de forma natural ou sintéticos. A hidroquinona, arbutina, ácido kójico, ácido azelaico, ácido L-ascórbico, ácido elágico, ácido tranexâmico (Figura 3) são comercialmente usados como agentes de clareamento da pele, porém com algumas desvantagens, listados no Quadro 2 (PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017).

Quadro 2 - Principais inibidores de tirosinase comercializados indústria cosmética e suas características

Agente inibidor	Origem	Mecanismo de ação	Desvantagens	Referência
Hidroquinona	Derivado do benzeno	Inibe a reação de tirosina em DOPA	Alterações mutagênicas, dermatite de contato, irritação e hipocromia	(HU et al., 2009; PILLAIYAR; MANICKAM; JUNG, 2017)
Arbutina	Derivado da hidroquinona	Inibidor competitivo reversível da tirosinase	Quimicamente instáveis e com potencial toxicidade para a medula óssea	(HU et al., 2009; PILLAIYAR; MANICKAM; JUNG, 2017)
Ácido Ascórbico	Vitamina C	Inibidor da formação de melanina	Sensibilidade térmica e se degrada facilmente	(PATIL et al., 2009)
Ácido azelaico	<i>Pityrosporum ovale</i>	Inibidor competitivo da tirosinase	Eritema, queimação e prurido	(SEARLE; AL-NIAIMI; ALI, 2020)
Ácido Kójico	<i>Aspergillus e Penicillium</i>	Agente quelante, inativando a enzima tirosinase	Instabilidade, baixa eficácia e toxicidade	(CABANES; CHAZARRA; GARCIA-CARMONA, 1994; KIM; UYAMA, 2005)
Ácido tranexâmico	derivado sintético do aminoácido lisina	Inibidor competitivo da tirosinase	Irritação na pele, via melanogênica indeterminada	(PILLAIYAR; MANICKAM; JUNG, 2017; TSE, 2010)
Ácido elágico	Composto fenólico natural, derivado dimérico do ácido gálico	Agente quelante, inibe a enzima tirosinase	Insolúvel, pouco disponível	(ORTIZ-RUIZ et al., 2016)
Retinois	Vitamina A	Inibidor da tirosinase	Descamação da pele, maior risco de queimaduras solares	(SEARLE; AL-NIAIMI; ALI, 2020)

Fonte: autoria própria

Figura 3 - Inibidores de tirosinase

Fonte: Adaptado de (PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017)

A hidroquinona (HQ) tem sido um agente clareador padrão usado clinicamente em cosméticos com ação inibitória de tirosinase. Sua ação se dá na interação com a tirosinase ligando-se às histidinas no sítio ativo da enzima, resultando na redução da pigmentação da pele em geral. Há relatos que a hidroquinona inibe a pigmentação ao esgotar a glutatona, reduzindo a síntese de DNA e RNA com degradação concomitante do melanossoma e dano aos melanócitos; no entanto o uso de hidroquinonas levam ao dano oxidativo dos lipídios e proteínas da membrana, como também transporte da epiderme para o sistema vascular. Com isso, a hidroquinona foi proibida pelo Comitê Europeu (24º Dir 2000/6/CE) e pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (DERI et al., 2016; PILLAIYAR; MANICKAM; JUNG, 2017).

A arbutina, por sua vez, ainda que derivado da hidroquinona tem efeito menos nocivos e mais seguro que a própria hidroquinona. Ela inibe a melanogênese por ligação competitiva e reversível da tirosinase sem influenciar a transcrição do mRNA da tirosinase; uma possível razão do efeito mais brando pode ser atribuído à forma em que a ligação glicosídica precisa ser quebrada antes de afetar a tirosinase (GILLBRO; OLSSON, 2011). Hu et. al (2009) revelou uma potente inibição da tirosinase pela arbutina em relação a hidroquinona, além da diminuição da citotoxicidade. Dessa forma, é possível investigar inibidores de tirosinase que reduzam ou evitem efeitos colaterais (HU et al., 2009).

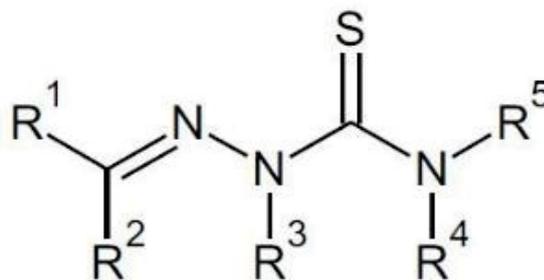
Diferente dos derivados de quinonas o ácido kójico, um dos agentes clareadores hoje em dia mais utilizados em formulações cosméticas, é um metabólito fúngico obtido de espécies de *Acetobacter*, *Aspergillus* e *Penicillium*. No entanto, seu uso pode provocar irritação da pele, efeito mutagênico nas células, baixa eficácia e baixa estabilidade da formulação. Estudos revelam que sua ação inibitória foi observada na concentração de 4% na formulação, porém é considerado seguro em concentrações até 1% (DERI et al., 2016; HAŁDYS; LATAJKA, 2019; PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017).

O mecanismo de inibição do ácido kójico ainda é incerto, porém sugere-se que atua como um inibidor competitivo ou misto para tirosinase, possivelmente por quelação de cobre no sítio ativo (DERI et al., 2016; PILLAIYAR; MANICKAM; NAMASIVAYAM, 2017). Estudos cinéticos revelaram que o ácido kójico inibe a atividade da tirosinase de cogumelo – frequentemente usada em ensaios enzimáticos - de forma competitiva com K_i de 0,03 mM com L-tirosina como substrato e de forma mista com K_i de 0,02 mM com L-dopa como substrato (HAŁDYS; LATAJKA, 2019).

As recentes pesquisas têm buscado inovações nos inibidores de tirosinase; as novas ideias se baseiam na hibridização de diferentes moléculas bioativas em uma única entidade, isto é, dois bioativos distintos são conjugados por um ligante metabolicamente estável, como exemplo fazer uma hibridização com análogos de ácido kójico e compostos naturais, ambos com propriedades inibidoras de tirosinase. Dessa forma, novos bioativos híbridos com perfis melhorados podem aumentar a potência um do outro e trabalhar com menores dosagens, o que diminui efeitos colaterais indesejados (ASHOORIHA et al., 2020).

Os avanços também se intensificam para descoberta de novos inibidores, como derivados sintéticos de tiossemicarbazonas (Figura 4), compostos quelantes de metais conhecidos. Eles têm uma grande variedade de propriedades farmacológicas e biológicas, tanto como complexos metálicos quanto como ligantes livres. Acetofenonas, benzaldeídos e tripeptídeos são exemplos de derivados de tiossemicarbazonas com potencial inibitório para enzima tirosinase, e por consequência, fortes candidatos para uso em formulações cosméticas (HAŁDYS; LATAJKA, 2019; LEDWOŃ et al., 2023).

Figura 4 - Estrutura geral de derivados de tiosemicarbazona com todas as posições de substituição possíveis atribuídas



Fonte: (HAŁDYS; LATAJKA, 2019)

Diante da estrutura e dos estudos relacionados, o átomo de enxofre tem a capacidade de quelar íons de cobre no sítio ativo da tirosinase. Os substituintes mais favoráveis na posição R5 são prótons ou anéis fenil. Cadeias mais longas diminuem as propriedades inibitórias do composto, como exemplo: o alongamento da cadeia R2 ou uma ramificação pode levar à perda de atividade biológica. Testes mais aprofundados são necessários para aplicação em conservantes de alimentos e cosméticos (HAŁDYS; LATAJKA, 2019).

Embora as pesquisas recentes tenham se esforçado em buscar novas alternativas de inibidores de tirosinase, os estudos que exploram ativos biotecnológicos extraídos de fontes sustentáveis, como microrganismos ainda são os mais atraentes para aplicações cosméticas de alto valor agregado.

2.5 COSMÉTICOS: UMA NOVA FRENTE DO USO DE MICROALGAS

Segundo Resolução da Diretoria Colegiada nº 07 de 10/02/2015, entende-se por cosmético como “qualquer substância ou mistura destinada a ser colocada em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as membranas mucosas da boca com vista exclusiva ou principalmente a limpá-los, perfumá-los, modificar lhes o aspecto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais”. Os produtos cosméticos tem como o objetivo fornecer proteção e melhorar a aparência saudável da pele. Além disso, eles podem ser usados para reduzir os sinais de envelhecimento, preservando-os de fatores externos e internos (YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

Hoje em dia, o perfil do consumidor mudou, a preocupação com as questões ambientais impactam na escolha do produto e com isso, fórmulas cosméticas convencionais, que usam ingredientes derivados de petróleo o óleo mineral, vem dividindo espaço com cosméticos verdes e biocosméticos, que conquistam a confiança e respeito do consumidor ao tratar a natureza de maneira justa (GOYAL; JEROLD, 2023).

Biocosméticos são produtos feitos 100% com ingredientes naturais, de base biotecnológica ou que possuem mecanismo de ação baseado em princípios biológicos; seja uma matéria-prima ou até mesmo uma etapa de sua produção. São livres de pesticidas e fertilizantes químicos, e destinados a aplicações tópicas na pele, cabelo, rosto e cuidados bucais. Estima-se que o mercado global de cosméticos orgânicos e naturais para a pele, por exemplo, atinja naturais atinja US\$ 25,11 bilhões até esse ano (GOYAL; JEROLD, 2023; NOVAK; SYDNEY; SOCCOL, 2014).

A obtenção de biomoléculas produzidas a partir de microalgas têm sido amplamente estudadas, e os dados mostram uma dependência dos perfis de metabólitos produzidos com as cepas de microalgas e diferentes condições de estresse (intensidade luminosa, temperatura, pH, concentração de nutrientes e outros). A variedade de metabólitos que podem ser sintetizados por microalgas, abre um leque de abordagens em diversas áreas, ganhando destaque no mercado de cosméticos voltados a tratamento de pele (SPOLAORE et al., 2006; YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

O FDA aprovou o extrato de *Spirulina* como um pigmento “seguro” em alimentos e as pesquisas reforçam cada vez mais que compostos derivados de microalgas podem ser usados como ingrediente ativo principal em cosméticos, bem como atuando como excipientes: estabilizadores, corantes ou agentes espessantes, em razão de suas propriedades (YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

Extratos de *Spirulina* e *Chlorella* foram aplicados em hidratantes de pele com propriedades de reparar os sinais de envelhecimento prematuro, estimulando a síntese de colágeno, bem como na prevenção de estrias e redução de rugas (GOMES et al., 2020). Algumas das principais espécies de microalgas utilizadas na a produção de produtos cosméticos já relatados incluem *Ascophyllum nodosum*, *Chlorella vulgaris*, *Alaria esculenta*, *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis oculata* (RIZWAN et al., 2018).

Em geral, os campos de aplicação de extratos de microalgas ou compostos bioativos derivados de microalgas em cosméticos podem ser na prevenção manchas, reparo da pele danificada, controle de seborreia e inibição do processo de inflamatório. Além disso, os extratos possuem várias substâncias bioativas que aceleram o processo de cicatrização e mantêm a umidade da pele (MOURELLE; GÓMEZ; LEGIDO, 2017).

O potencial antioxidante dos pigmentos sintetizados por microalgas pode atuar nas formulações cosméticas tanto como o ativo de combater os radicais livres, bem como conferir uma coloração interessante ao produto. Por exemplo, os β -carotenos de *Dunaliella salina*; a astaxantina (cor vermelha) de *Haematococcus pluvialis* e *G. sulphuraria*, as ficoeritobilinas de *Spirulina* e *Porphyridium*, que podem ser utilizadas na indústria de cosméticos decorativos (delineador e batom) e as ficobiliproteínas obtidas de *Porphyridium aerogineum* também são utilizadas como corantes em alimentos e cosméticos; esse pigmento não muda com o pH (4 a 5) e a cor se mantém constante sob a luz (MOROCHO-JÁCOME et al., 2020; MOURELLE; GÓMEZ; LEGIDO, 2017; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; ZIMERMANN et al., 2020).

Metabólitos extracelulares também são interessantes, como exemplo os exopolissacarídeos (EPS), que compreendem um grupo de importantes biopolímeros de alto peso molecular que são secretados por microalgas no ambiente circundante durante seu crescimento ou propagação. Esses biopolímeros podem ser considerados como um importante produto hidratante e propriedades antibacterianas, antioxidantes e anticancerígenas (LIU; POHNERT; WEI, 2016; YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

Como os EPS são liberados no meio de cultura, eles podem ser facilmente recuperados e purificados. EPS excretados por *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorococcum sp.*, *Porphyridium cruentum*, *S. platensis* e *Scenedesmus sp.* possuem alto teor de ácido glucurônico, precursor do ácido hialurônico (YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

As microalgas também são promissoras na síntese de mecanismos fotoprotetores e inibidores de tirosinase, inúmeros compostos fenólicos e vitaminas como A, C e E são descritos na literatura. Estudos *in vivo* em camundongos revelaram que a densidade populacional de melanócitos reduziu em 35% com uso concomitante de vitamina C e E. Tais propriedades foram encontrados nos metabólitos sintetizados

por *Oscillatoria agardhii*, *Haematococcus pluvialis* *Nannochloropsis oculata* e *Pediastrum cruentum* (YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

Com o interesse da indústria cosmética nas biomoléculas de microalgas, mais de 120 exemplares de substâncias ou ingredientes cosméticos podem ser encontrados no Banco de Dados de Ingredientes Cosméticos (CosIng), disponível em https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing_es, com sua nomenclatura Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI) e número CAS (Chemical Abstracts Service) respectivos (MOURELLE; GÓMEZ; LEGIDO, 2017)

2.5.1 Formulações cosméticas e ensaios de estabilidade

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, que traz informações desde fatores que influenciam na estabilidade, acondicionamento de amostras, testes e critérios para aprovação dos produtos. A estabilidade de um produto está relacionada com sua capacidade de manter suas propriedades físico-químicas e microbiológicas dentro dos limites definidos durante um certo período de tempo; denominado prazo de validade (ANVISA, 2004).

Muitas variáveis refletem na estabilidade de um produto, como processo de fabricação, tipo e material da embalagem, transporte e condições no ambiente de armazenamento. Durante o desenvolvimento de novos produtos, a adição de qualquer nova matéria-prima faz-se necessário realizar novos testes de estabilidade a fim de garantir um produto estável, seguro e eficaz ao consumidor final. De acordo com a origem, as alterações no produto podem ser extrínsecas, quando determinadas por fatores externos; ou intrínsecas, quando determinadas por fatores inerentes à formulação.

No que diz respeito a fatores externos, é possível traçar alguns:

- Tempo – o envelhecimento do produto pode provocar alterações organolépticas, sensoriais, físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas;
- Temperatura – temperaturas muito altas podem acelerar reações de degradação do produto, perda de viscosidade, alterações de cor e

aspecto. Por sua vez, baixas temperaturas podem ocasionar cristalização, precipitação e/ou turvação;

- Luz e Oxigênio - A luz ultravioleta, juntamente com a exposição ao ar pode desencadear reações de óxido-redução e formação de radicais livres. Geralmente, produtos sensíveis à ação da luz são acondicionados em embalagens opacas ou escuras e a formulação conta com ativos antioxidantes para retardar o processo oxidativo.
- Umidade – esse fator tem maior impacto em formulações sólidas ou em barra; a umidade do ambiente pode provocar alterações no aspecto físico da formulação, modificando peso ou volume, como também contaminação microbiológica;
- Acondicionamento – o material escolhido para acondicionar a formulação podem influenciar na manutenção da estabilidade durante o período estabelecido;
- Microrganismos – Formulações em que a água é um ingrediente em maior quantidade ou de quantidade considerável, como géis e emulsões são mais suscetíveis à contaminação microbiológica. A adição de conservantes, testes preliminares – *Challenge Test* e cumprimento das Boas Práticas de Fabricação durante processo podem retardar ou assegurar a não contaminação do produto.
- Vibração – O transporte, pode afetar a estabilidade das formulações, acarretando separação de fases de emulsões, compactação de suspensões e alteração da viscosidade. Além disso, o transporte conta também com a vibração e as oscilações de temperatura, de forma concomitante;

Já os fatores intrínsecos, como propriamente dito, estão relacionados à própria natureza das formulações e à interação de seus ingredientes entre si e ou com a embalagem. Dentre eles, tem-se: incompatibilidade física, como separação de fases, cristalização e incompatibilidade química, como mudanças de pH, reações de óxido-redução, hidrólise e interações dos ingredientes entre si.

Com base nos fatores externos e internos que podem afetar a estabilidade do produto, foram estabelecidos os critérios e condições para os testes de estabilidade.

Inicialmente, realiza-se a estabilidade preliminar que consiste em duas etapas: Ciclos de Congelamento-Descongelação e Centrifugação. Em seguida, depois das formulações se manterem conformes por esse teste preliminar, dá-se início a estabilidade acelerada.

2.5.2 Estabilidade Preliminar

Conhecido também como teste de triagem, tem por finalidade auxiliar na melhor formulação do produto na fase inicial do processo de desenvolvimento de um cosmético, por exemplo. No teste, emprega-se condições extremas de temperatura e em seguida avalia o comportamento físico-químico da amostra a cada ciclo de temperatura. O teste consiste em submeter a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade.

Em geral, esse teste dura em torno de 12 a 15 dias e a cada 24h são realizadas as análises para avaliar a estabilidade da formulação. Os parâmetros que podem ser avaliados são: aspecto, cor e odor e estabilidade da emulsão.

2.5.2.1 Ciclos de Congelamento-Descongelação

Nesse teste, as formulações são submetidas a temperaturas alternadas em intervalos regulares de tempo; são realizados ciclos de congelamento e descongelamento com a finalidade de avaliar a estabilidade do produto na ocorrência de choque de temperatura, simulando uma condição real de movimentação, armazenamento e transporte.

A Anvisa, em seu guia de estabilidade de cosméticos, sugere alguns limites de temperatura:

- a) Ciclos de 24 horas à temperatura ambiente, e 24 horas a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$;
- b) Ciclos de 24 horas a $40 \pm 2^\circ \text{C}$, e 24 horas a $4 \pm 2^\circ \text{C}$;
- c) Ciclos de 24 horas a $45 \pm 2^\circ \text{C}$, e 24 horas a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$;
- d) Ciclos de 24 horas a $50 \pm 2^\circ \text{C}$, e 24 horas a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$.

Definidos quais limites de temperatura serão utilizados, ao final de cada ciclo são avaliadas características físicas e organolépticas da formulação, tendo como amostra controle às características originais do produto, verificadas no início do teste. Esse

resultado irá definir as próximas etapas; o produto estando conforme as próximas etapas seguem normalmente, caso contrário, uma reformulação ou adequação da fórmula pode ser necessária.

2.5.2.2 Centrifugação

O teste de centrifugação, assim como os ciclos de congelamento e descongelamento, visa avaliar o comportamento da formulação a movimentações bruscas, submetendo o produto a condições extremas, de temperatura e rotação. Devido ao movimento de rotação, as partículas de maior densidade migram para longe do eixo de rotação e são sedimentadas ao fundo do tubo; essa força realizada pelo equipamento pode provocar precipitação, separação de fases e coalescência.

A formulação deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. A separação de fases se dá por instabilidade na fórmula, que pode se originar de uma incompatibilidade dos ingredientes entre si e até mesmo devido a uma quantidade insuficiente de emulsionante ou pela evaporação da água da formulação (DA SILVA et al., 2019). A conformidade no teste possibilita dar sequência aos testes de estabilidade. Sugere-se utilizar 3.000 rpm durante 30 minutos (ANVISA, 2004).

2.5.3 Estabilidade acelerada

Também conhecido como estabilidade exploratória, o teste é realizado para prever a estabilidade do produto em um intervalo de tempo maior que no teste de estabilidade preliminar. Dessa forma, é possível estimar o tempo útil de vida e avaliar a compatibilidade dos ingredientes entre si e seu armazenamento, em condições variadas de temperatura e exposição a luz.

O teste é realizado durante um período de, pelo menos, 90 dias; podendo se estender por seis meses ou até um ano, a depender da característica e finalidade do ensaio. As amostras podem ser acondicionadas em vidro neutro ou na embalagem de acondicionamento final, permitindo assim também a avaliação da formulação com a embalagem. É importante não completar o volume total do frasco para possíveis trocas gasosas (ANVISA, 2004). A formulação submetida a condição de exposição a

luz, obrigatoriamente, deve ser acondicionada em embalagem transparente que permita tal passagem de luz pelo produto.

A periodicidade da avaliação das amostras pode variar, no entanto a Anvisa sugere que esse intervalo contemple o tempo zero, as primeiras 24h, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias. Se o estudo se prolongar por mais tempo, recomendam-se avaliações mensais até seu término. Os parâmetros na avaliação periódica têm como base as características organolépticas, como aspecto, cor e odor; características físico-químicas, como valor de pH, viscosidade, densidade; e características microbiológicas como a o estudo pelo *Challenge Test* ou mesmo contagem microbiana com padrões estipulados pela RDC nº 752 de 19 de setembro 2022 da Anvisa, que estabelece parâmetros para controle microbiológico de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Durante o período de avaliações, uma amostra denominada branco, deve ser utilizada como referência, também denominada padrão, que em geral seguirá as mesmas condições que as formulações propostas.

2.5.3.1 Avaliação organoléptica

As características organolépticas consistem em avaliar aspecto, cor e odor da formulação. O aspecto diz respeito a aparência do produto, podendo ser descrita como pó, granulado seco, pastoso, gel, líquido, transparente, viscoso, volátil, opaco, leitoso, homogêneo ou heterogêneo e dentre outras observações. Em geral, o aspecto deve-se manter íntegro, comparado ao seu aspecto inicial. Na leitura dos dados, pode ser descrita como normal, sem qualquer alteração ou levemente alterada, precipitada, turva, a depender do produto a ser analisado (NOVAK, 2013).

A cor e odor, em sua maioria, devem permanecer inalteradas durante o período de análise. Ainda assim, em condições de temperatura elevadas, pequenas alterações são aceitáveis. É importante ter a referência da amostra controle – branco – submetida às mesmas condições.

2.5.3.2 Avaliação físico-química

As avaliações físico-químicas podem predizer instabilidades futuras que afetem a qualidade e prazo de validade do produto. Nesse estudo, essas avaliações

consistiram em avaliar pH e atividade de água. Formulações cosméticas para a pele podem variar de 5,5 a 7,5. Alterações significativas de pH podem ser indicativas de contaminação microbiana ou reações indesejáveis da formulação durante o período estipulado.

Para verificação do pH, pode-se utilizar de métodos colorimétricos, por meio de indicadores universais, porém com baixa sensibilidade ou método potenciométrico com uso de pHmetro, previamente calibrado com soluções padrão.

A atividade de água (A_w), diferente de teor de umidade da amostra, é uma medida que permite avaliar a quantidade de água ligada, estrutural ou quimicamente, aos ingredientes da formulação. É um conceito termodinâmico e influencia na forma direta de conservação/tempo de prateleira do produto, pois está relacionada a velocidade de reações.

É uma relação entre pressão de vapor da solução (p) e pressão de vapor do solvente puro (p_0), considera-se o valor de $A_w = 1,000$ para água pura. Pode variar de 0,000 a 1,000. Para compreender essa relação, é importante definir que pressão de vapor é a pressão exercida por um vapor na condição de equilíbrio termodinâmico com o líquido que lhe deu origem, isto é, em um sistema fechado, a quantidade de líquido que evapora é a mesma que se condensa (NOVAK, 2013).

Para cosméticos, uma maior atividade de água é indicativo de um produto que confere uma sensação de hidratação e “frescor”, além de ser um fator que influencia fortemente na estabilidade do produto, quando avaliado junto com pH e temperatura (NOVAK, 2013).

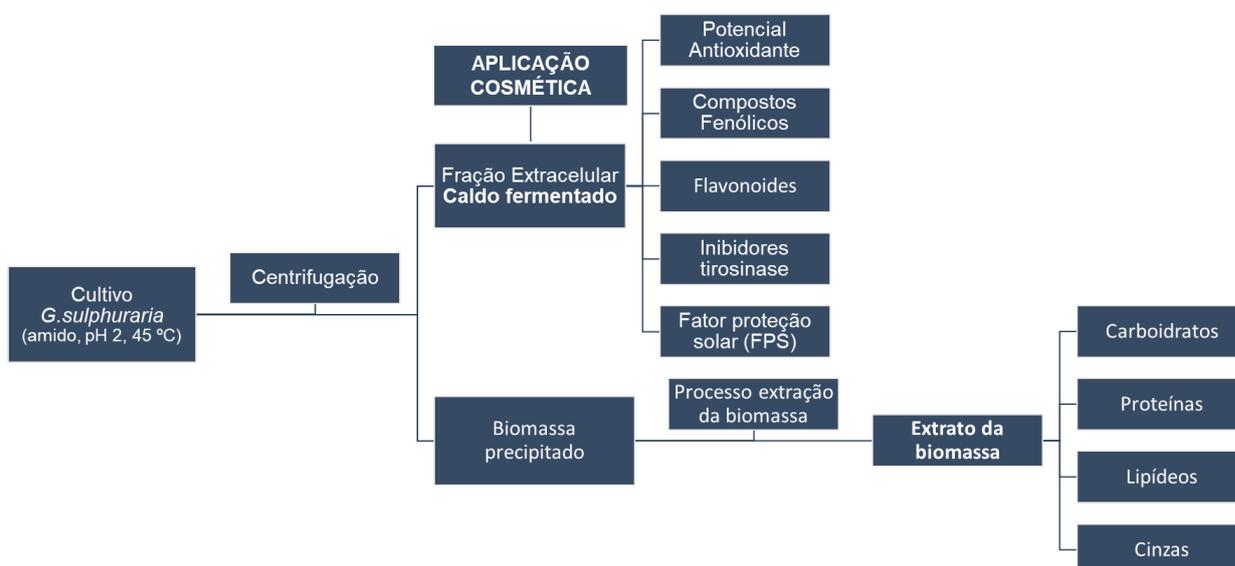
2.5.3.3 Espalhabilidade

Outro parâmetro possível de ser avaliado durante os 90 dias de estabilidade do produto, quando se fala em cosmético, é a espalhabilidade, que consiste na capacidade do produto em expandir em uma determinada superfície, em um tempo determinado, sob determinada pressão. Um produto com boa espalhabilidade facilita a aplicação do produto e produz uma sensação agradável na pele, além de gerar uma impressão de maior rendimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta sessão, são descritos os materiais e métodos utilizados na execução das análises do projeto. Os tópicos a seguir estão separados em metodologia de cultivo da microalga, caracterização da biomassa, caracterização do caldo fermentado e análises de estabilidade do produto formulado. A microalga utilizada neste estudo, *Galdieria sulphuraria* (SAG107.79), foi adquirida da Coleção de Culturas de Algas da Universidade de Göttingen (SAG). O Fluxograma 1 fornece o esquema de análises e amostragens do projeto.

Fluxograma 1 – Amostras do cultivo de *G. sulphuraria* e esquema de análises



Fonte: autoria própria

3.1 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A manutenção da microalga foi realizada em meio Allen (Tabela 3) (RAHMAN; SARIAN; VAN DER MAAREL, 2020). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e em seguida foi ajustado o pH para 2,0 com adição H₂SO₄ 1M, previamente esterilizado, em capela de fluxo laminar.

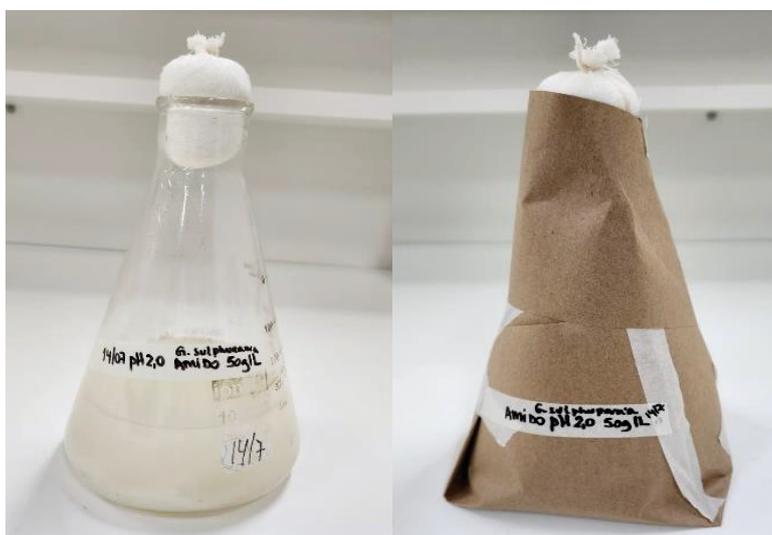
Tabela 3 – Meio de cultura Allen

REAGENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônio	1,32
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio	0,27
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,07
FeCl ₃	Cloreto de Ferro (III)	11,00.10 ⁻³
H ₃ BO ₃	Ácido Bórico	2,80.10 ⁻³
MnCl ₂	Cloreto de Manganês	1,80.10 ⁻³
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Zinco heptahidratado	0,22.10 ⁻³
CuSO ₄	Sulfato de Cobre (II)	0,05.10 ⁻³
NH ₄ VO ₃	Metavanadato de Amônio	0,02.10 ⁻³
NaMoO ₄ .4H ₂ O	Molibdato de Sódio	0,02.10 ⁻³

Fonte: (RAHMAN; SARIAN; VAN DER MAAREL, 2020)

Os cultivos foram feitos em Erlenmeyer envolvidos em papel Kraft para evitar passagem de luminosidade (Figura 5), mantidos durante 20 dias em estufa incubadora, sob a temperatura de 45 °C em condição estática. Para avaliação do crescimento heterotrófico, foram utilizados glicose e amido de milho como fontes de carbono, na concentração de 50g.L⁻¹. Uma solução contendo os micronutrientes da tabela anterior, foi esterilizada e adicionada após essa etapa para evitar a reação do Ferro que provoca uma coloração levemente avermelhada.

Figura 5 – Cultivo *G. sulphuraria* em amido em condições heterotróficas



Fonte: autoria própria

O cultivo com amido foi previamente gelatinizado para evitar esta reação na autoclave e formação de grumos. Outro fator considerado foi a correção do pH após a autoclavar, também para evitar que o amido fosse gelatinizado pelas condições de alta temperatura e baixo pH. Os procedimentos de inoculação e coleta de amostra foram conduzidos em câmara de fluxo laminar.

3.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

Para comparação dos cultivos heterotróficos a base de glicose e amido de milho, foram coletadas alíquotas a cada dois dias para determinação da concentração celular, realizada em câmara de Neubauer, sendo os resultados em células.mL⁻¹. Com os dados de contagem de células e apresentação gráfica, foi possível determinar a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$), produtividade celular (P), tempo de geração celular (G) calculado de acordo com as Equações 1, 2 e 3 (BASTOS, 2010):

Equação 1 – Velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$)

$$\mu_{\text{máx.}} = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{t - t_0}$$

Equação 2 – Produtividade celular (P)

$$P = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i}$$

Equação 3 – Tempo de geração celular

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx.}}}$$

Onde,

$\mu_{\text{máx.}}$ = velocidade máxima de crescimento;

P = Produtividade celular (cél.mL⁻¹.h⁻¹);

G = Tempo de geração (h), tempo que o microrganismo leva para duplicar a sua biomassa;

X_0 = é a concentração celular no início da fase exponencial de crescimento;

X = concentração celular no final da fase exponencial de crescimento;

$t - t_0$ = intervalo de tempo correspondente apenas à fase exponencial de crescimento;

X_i, X_f = concentração celular no início e final do cultivo;

$T_f - t_i$ = intervalo de tempo do início ao fim do cultivo;

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

3.3.1 Extração da biomassa

Após 20 dias de cultivo, cerca de 40mL da cultura de *G. sulphuraria* foi centrifugada por 20 min (10000 rpm, $T = 10^\circ\text{C}$), e o sobrenadante denominado caldo fermentado foi reservado. O *pellet* da microalga foi lavado e ressuspendido em 5 mL de solução tampão fosfato de sódio a 100mM; então foi submetido a ciclos de congelamento/descongelamento, segundo Lauceri e colaboradores (2019) com modificações: congelamento-descongelamento três vezes entre -20°C e a temperatura ambiente ($20-25^\circ\text{C}$). Os ciclos de congelamento duraram 3h, sendo último *overnight*. Após a conclusão dos sucessivos ciclos, a suspensão foi mantida na geladeira (4°C) por 24h e, em seguida, centrifugada por 20 min (10000 rpm, $T = 10^\circ\text{C}$). Essa suspensão foi denominada extrato da biomassa (LAUCERI; CHINI ZITTELLI; TORZILLO, 2019).

3.3.2 Determinação de proteínas

As proteínas presentes na biomassa extraída foram determinadas pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão. A curva de calibração usou uma solução mãe de $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e diluições foram feitas para obter pontos de 0 a $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para tal análise, 0,1mL de amostra foram colocados em tubo de ensaio e em seguida adicionados 5mL do reagente Bradford, o conteúdo foi ajustado no vórtex para completa homogeneização e submetido a leitura em espectrofotômetro a 595 nm de comprimento de onda. O mesmo procedimento foi realizado na curva de calibração. Os resultados são expressos $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e foram convertidos em percentual para melhor interpretação dos dados (BRADFORD, 1976).

3.3.3 Determinação de açúcares totais

O teor de açúcares totais da biomassa extraída foi determinado pela metodologia de fenol sulfúrico descrita por Dubois et al. (1956). Foi utilizada glicose como padrão, para realizar uma curva de calibração e assim prever uma estimativa da quantidade de açúcares totais na amostra.

Diluições seriadas foram realizadas com solução padrão de glicose 1% para um intervalo de 0 a 100 mg.L⁻¹. Para a realização das análises, 1 mL da amostra e 1 mL de solução de fenol 5%, foram transferidos para tubos de ensaio sofrendo uma leve agitação. Em seguida, adicionou-se 5 mL de H₂SO₄ concentrado; o conteúdo foi homogeneizado vagarosamente. Após 10 minutos, a mistura já resfriada, foi submetida a análise. Como branco, foi utilizado água destilada na mesma proporção. Com os padrões e as amostras devidamente preparadas, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (FEMTO 800 XI, Brasil) no comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram convertidos em percentual para melhor interpretação dos dados.

3.3.4 Determinação de lipídeos

Para análise de lipídeos da amostra, a biomassa extraída foi colocada em estufa para obtenção da amostra seca. Pesou-se 1g da amostra em papel filtro na forma de cartucho, que em seguida foi vedado. Este foi colocado no aparelho extrator tipo Soxhlet e adicionado uma solução de clorofórmio:metanol na proporção 2:1. Esse volume de controle do equipamento foi mantido sob aquecimento e a extração de lipídeos ocorreu durante 8 horas (BJORNSSON et al., 2012; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Após esse período, retirou-se o cartucho e o balão contendo a parte extraída que foi levado para uma estufa a 105 °C para completa evaporação do solvente. Por fim, o balão foi resfriado em um dessecador até temperatura ambiente e então pesado em balança analítica. O teor de lipídios foi realizado conforme a Equação 4 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Equação 4 – Teor de lipídeos (%)

$$\text{Teor de lipídeos} = \frac{\text{peso final do balão} - \text{peso inicial do balão}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

O resultado foi expresso em % de lipídios, mas pode ser interpretado em g/g.

3.3.5 Determinação de cinzas

O conteúdo de cinzas foi determinado por meio da incineração da amostra segundo metodologia descrita em Adolfo Lutz (2008). Em uma cápsula previamente aquecida em mufla a 550 °C, resfriada em dessecador e pesada, foram adicionados 5 g biomassa extraída seca. A amostra foi aquecida e incinerada em mufla a 550 °C. O cálculo do teor de cinzas foi realizado conforme equação 5 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Equação 5 – Determinação de cinzas (%)

$$\text{Teor de cinzas} = \frac{\text{peso das cinzas} \times 100}{\text{peso da amostra}}$$

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO FERMENTADO

O caldo fermentado trata-se da fração extracelular do cultivo obtido do sobrenadante da cultura de *G. sulphuraria* após centrifugação e separação da biomassa. Essa fração líquida foi submetida às análises a seguir e será nomeada como CF de *G. sulphuraria*, isto é, caldo fermentado da *Galdieria sulphuraria*.

3.4.1 Determinação do potencial antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante do caldo fermentado, foram utilizados os métodos de redução do ferro, FRAP, segundo Benzie e Strain (1996); o método da captura do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e o método de descoloração do cátion ABTS, descrito por Re et al. (1999). As metodologias aplicadas contaram com a leitura de absorbância em espectrofotômetro EPOCH (FEMTO 800 XI, Brasil) em comprimentos de onda específicos para cada análise (BENZIE; STRAIN, 1996; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Para o método de FRAP, o reagente foi preparado pela mistura do tampão acetato (300 mM, pH 3,6), com uma solução de 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) em 40 mM HCl, e 20 mM FeCl₃ na proporção de 10:1:1 (v/v/v). Uma alíquota de 20 µL de amostra diluída (1:2), foi colocada em microplaca, seguido de 280 µL do reagente FRAP, recém preparado. A microplaca foi mantida no escuro por trinta minutos, seguido de leitura das absorvâncias a 593 nm. A curva padrão FRAP = (absorbância - 0,1231)/ 0,0012 ; R² = 0,9989 foi plotada usando diferentes concentrações de Trolox (100-1000 µmol.L⁻¹). Os resultados foram expressos em µmol de equivalente de Trolox por litro de caldo fermentado (µmol T_{Eq}.L⁻¹).

Para metodologia de ABTS, uma solução contendo ABTS (7 mmol/L) e persulfato de potássio (2,45 mmol/L) foi preparada e mantida por 16 h à temperatura ambiente (25 °C) no escuro. A solução foi então diluída pela mistura de 4 mL da solução de ABTS e completadas até 200 mL de água destilada. Uma alíquota 20 µL de amostra foi adicionada com 280 µL do reagente ABTS e permaneceu em repouso no escuro por trinta minutos. Em seguida, a leitura foi efetuada a 734 nm. A curva padrão ABTS = (absorbância + 12,707)/0,208; R² = 0,9968, foi plotada usando diferentes concentrações de Trolox (100-1000 µmol.L⁻¹). Os resultados foram expressos em µmol de equivalente de Trolox por litro de caldo fermentado (µmol T_{Eq}.L⁻¹).

3.4.2 Determinação de Compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais do caldo fermentado foi obtido a partir do método colorimétrico utilizando reagente *Folin-Ciocalteu*. A análise se dá pela mudança de coloração de amarelo para uma coloração azul, devido a presença de molibdênio no reagente Folin (MARGRAF et al., 2015; SINGLETON; ROSSI, 1965). Inicialmente, foi construída uma curva de calibração tendo como padrão ácido gálico, um excelente antioxidante, em diferentes concentrações a fim de obter um intervalo de 20 a 200 mg.L⁻¹ de ácido gálico. As concentrações foram calculadas a partir de uma curva padrão (CFT = ((absorbância - 0,0188)/0,0077)* fator diluição); R² = 0,9985) Os resultados são expressos em ácido gálico equivalente por volume de amostra (mg AGE.L⁻¹).

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,15mL de amostra, 2,4mL de água destilada e 150 µL do reagente *Folin-Ciocalteu*. Após 3 minutos em repouso, foi adicionado 0,3mL da solução de carbonato de sódio 5% e os tubos foram agitados em vórtex e levados ao escuro. Após 1 hora de reação, foi realizada a leitura dos meios reacionais em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 725 nm. O mesmo procedimento foi feito para a análise do branco, substituindo o conteúdo da amostra por água destilada e para construção da curva de calibração (MARGRAF et al., 2015; SINGLETON; ROSSI, 1965).

3.4.3 Fator proteção solar (FPS) na região UVB

A determinação do fator de proteção solar (FPS) seguiu metodologia proposta por (MANSUR et al., 1986). Após tentativas preliminares, o caldo fermentado puro de *G. sulphuraria* foi diluído 10 vezes, pois previamente foi analisado puro e ultrapassou o limite de detecção da leitura. Os espectros de absorção das amostras em solução foram obtidos na faixa de 290 a 450 nm usando quartzo de 1 cm célula e etanol como branco. Os dados de absorção foram obtidos na faixa de 290 a 320, a cada 5 nm, e 3 foram feitas determinações em cada ponto, seguidas da aplicação da equação proposta pela metodologia (MANSUR et al., 1986).

Equação 6 – Cálculo FPS

$$FPS = FC \times \sum_{290nm}^{320nm} EE_{\lambda} \times I_{\lambda} \times Abs_{\lambda}$$

Onde:

FC – Fator de correção igual a 10;

EE_λ – efeito eritematogênico da radiação em diferentes comprimentos de onda λ;

I_λ – relação à intensidade da radiação solar em um comprimento de onda específico λ;

Abs_λ – leitura espectrofotométrica de absorbância da solução do filtro solar nesse mesmo comprimento de onda λ.

Para cálculo dos dados, seguiu-se a Tabela 4, do padrão da relação do comprimento de onda λ e o efeito eritematogênico EE.

Tabela 4 - Relação entre efeito eritematogênico e intensidade da radiação UVB nos comprimentos de onda

UVB (λ nm)	EE $_{\lambda}$ I $_{\lambda}$ (normalizado)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

Fonte: Adaptado de (SAYRE et al., 1979)

3.4.4 Determinação da ação anti-tirosinase

A análise da ação anti-tirosinase foi feita através de um método colorimétrico *Tyrosinase Inhibitor Screening Kit* (Kit de Triagem do Inibidor de Tirosinase). Trata-se de um teste sensível para a seleção de inibidores da enzima tirosinase. Atua catalisando a oxidação da tirosina, formando uma coloração específica no comprimento de onda 510nm. A leitura foi realizada em microplacas e com leitura de absorbância em espectrofotômetro Epoch.

O kit possui dos seguintes materiais: Tampão de ensaio de tirosinase, Substrato de tirosinase, Tirosinase liofilizada, potencializador de tirosinase e ácido kójico (IC) na concentração de trabalho 0,75mM, como padrão. Os reagentes foram preparados, de acordo com as instruções do teste para posterior reação. Para confiabilidade dos testes, além das amostras, amostra padrão de ácido kójico (IC) e de controle de enzima (EC) também foram realizados.

Todos os materiais e reagentes utilizados foram equilibrados à temperatura ideal de 25°C e as amostras foram analisadas em duplicata. As alíquotas de caldo fermentado foram previamente centrifugadas a 5000rpm por 15 minutos e diluições foram realizadas para ajustar com a sensibilidade do teste. O teste simula uma reação enzimática, para isso fez-se necessário o preparo de uma solução da enzima tirosinase e preparo de um substrato, esse que será convertido em cada reação enzimática. O preparo dos testes seguiu o Fluxograma 2.

Fluxograma 2 – Análise anti tirosinase



Fonte: autoria própria

A leitura, seguindo as instruções do fabricante, foi realizada de modo cinético até realizar-se a leitura entre 30 e 60 minutos. Escolheu-se dois pontos (T_1 e T_2) no intervalo linear dos dados obtidos e suas respectivas absorbâncias (Abs_1 e Abs_2). Calculou-se a inclinação para todas as amostras (S), controle de inibição (IC) e controle da enzima (EC) dividindo a variação da absorbância ($Abs_2 - Abs_1$) pelo delta tempo ($T_2 - T_1$). O cálculo da porcentagem de inibição relativa é representado pela Equação 7.

Equação 7 – Cálculo inibição relativa

$$Inibição\ relativa = \frac{(Slope\ EC - Slope\ S)}{Slope\ EC} \times 100$$

Onde:

$$Slope\ EC = (Abs_{2EC} - Abs_{1EC}) / (T_{2EC} - T_{1EC})$$

$$Slope\ S = (Abs_{2S} - Abs_{1S}) / (T_{2S} - T_{1S})$$

3.4.5 Determinação de Flavonoides

Dentre os agentes antioxidantes, os flavonoides é a designação dada a um grande grupo de compostos fenólicos de interesse. Para determinação de flavonoides,

foi utilizada a metodologia de Zhishen et al. (1999) com modificação para execução em microplacas. O método se baseia na reação de complexação com o metal alumínio de coloração amarela, que foi monitorada pela leitura em espectrofotômetro.

Para tal procedimento, foram adicionados em um tubo 2mL de H₂O, 0,25 mL de caldo fermentado previamente centrifugado (5000 rpm, 20 minutos), 0,12 mL de NaNO₂ a 0,50 mol.L⁻¹. Essa mistura foi deixada agitada em vórtex e mantido repouso por 5 minutos. Em seguida, 0,120mL de AlCl₃ 10% (m/v) foram adicionados e mais 5 minutos de repouso foram necessários. Na sequência foram acrescentados 0,80 mL de NaOH a 1mol.L⁻¹ e toda mistura foi homogeneizada. 0,30 mL foram transferidos para microplaca e efetuada leitura em 510nm (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999). A curva padrão foi realizada com quercetina de 20 a 200 mg.L⁻¹ e para o branco utilizou-se de água no lugar da amostra.

3.5 APLICAÇÃO COSMÉTICA

Diante dos resultados obtidos, o caldo fermentado foi incorporado a uma formulação cosmética. Para isso, fez-se necessário uma triagem das formulações cosméticas mais adequadas para receber o caldo fermentado: foram escolhidas quatro formulações com diferentes propostas, mas que apresentassem fácil espalhabilidade e que incorporassem por completo o caldo fermentado adicionado, sem separação de fase evidente, sendo elas: creme facial noturno, creme facial para pele madura, gel para área dos olhos, sérum facial.

Essas quatro formulações foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar, que consiste, de forma mais rápida, forçar as formulações às condições extremas. Foram escolhidas duas formulações dessa amostragem, com base na proposta de produto formulado com ação clareadora.

3.5.1 Estabilidade preliminar

A estabilidade preliminar tem como objetivo submeter o produto formulado a condições extremas de temperatura e realizar os ensaios em relação aos vários parâmetros de acordo com a formulação cosmética estudada. Essa estabilidade foi testada por meio de ciclos de congelamento-descongelamento e centrifugação.

3.5.1.1 Ciclos de Congelamento-Descongelação

Para executar os ciclos de congelamento e descongelamento, as quatro formulações foram armazenadas em Tubos Falcon, cerca de 30g de amostra foi submetida a seis ciclos de temperatura. Os ciclos alternados ocorreram da seguinte forma: 24h em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e 24h em congelador ($-5 \pm 2^\circ\text{C}$). Dessa forma, cada ciclo estava completo depois de 48h, resultando em 12 dias de experimento.

3.5.1.2 Centrifugação

As amostras submetidas a centrifugação foram as mesmas que estavam no processo de ciclos de congelamento-descongelação. Após cada ciclo completo, ou seja, 48h, as formulações foram submetidas a centrifugação. Esse procedimento foi realizado a 5000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. A não separação de fases, embora ainda não garanta sua estabilidade, possibilita a continuação dos testes de estabilidade acelerada, devido ausência de *creaming*, isto é, diferença de densidade entre as duas fases ou do aparecimento de duas fases, indicando assim uma possível estabilidade física.

3.5.2 Estabilidade Acelerada

O estudo da estabilidade acelerada da formulação frente a adição do caldo fermentado de *G. sulphuraria* em produtos cosméticos foi realizado em duas formulações previamente escolhidas na triagem, a partir da estabilidade preliminar. As formulações escolhidas foram creme para pele madura e um sérum facial. Importante ressaltar que não foram corrigidos os pHs do caldo fermentado previamente, isto é, foi incorporado na formulação nas condições do cultivo e então, corrigida toda formulação, se necessário, ao final.

A porcentagem de ativo adicionada seguiu a recomendação da formulação proposta, substituindo o ativo presente na fórmula pelo ativo de *G. sulphuraria*. Embora os resultados de capacidade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides na condição do caldo fermentado tenham sido numericamente maiores, para aplicação

cosmética a seguir foram incorporados às formulações as amostras puras. Essa decisão foi avaliada em relação a custo-benefício, visto que os processos de concentração de amostras aumentam a receita consideravelmente de qualquer processo de produção. As informações acerca das formulações estão descritas no Quadro 3 e 4.

Quadro 3 – Formulação do creme facial para pele madura com CF de *G. sulphuraria*

INCI Name	Nome Comercial	Função	%
FASE A			
Helianthus Annus (Sunflower) Seed Oil (and) Polyacrylic Acid (and) Xylityl Sesquicaprylate (and) Glyceryl Sterate (and) Euphorbia Cerifera (Candelilla) Wax (and) Sodium Hydroxide	Emulfeel SGP	Emulsionante	4,00
FASE B			
Cyclopentasiloxane	DC 254	Emoliente	2,00
Xylityl Sesquicaprylate (and) Caprylyl Glycol	Hebeatol CG	Antimicrobiano	1,00
FASE C			
Aqua	Água deionizada	Veículo	90,00
-	CF de <i>G. sulphuraria</i>	Ativo	3,00

Nota! Para formulação controle, a quantidade adicionada de ativo foi corrigida com adição de água deionizada na mesma porcentagem.

O preparo do creme facial para pele madura iniciou com a pesagem das matérias-primas. Em seguida, a fase A foi aquecida a 45°C e lentamente foi adicionada a fase B com agitação constante por 30 minutos. Então, a fase C foi adicionada, agitando por 5 minutos para completa homogeneização das fases. O pH foi ajustado entre 6,00 e 7,00, conforme instrução do fabricante com uso de Hidróxido de sódio (NaOH) 1M. A formulação foi deixada em repouso para resfriamento total e, em seguida, foram fracionadas as porções para cada condição de armazenamento pré-definida.

Quadro 4 – Formulação do S rum facial com CF de *G. sulphuraria*

INCI Name	Nome Comercial	Fun�o	%
FASE A			
Aqua	�gua Deionizada	Ve�culo	93,50
Dissodium EDTA	Edta Diss�dico	Sequestrante	0,10
Hydroxyacetophenone	SymSave H	Preservante	0,50
FASE B			
Glycerin	Glicerina 99,50%	Umectante	1,00
Xanthan gum	Keltron CG-SFT	Espessante	0,60
FASE C			
Caprylyl Glycol	Hydrolite CG	Preservante	0,30
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	Cremophor CO 40	Solubilizante	1,00
-	CF de <i>G. sulphuraria</i>	Ativo	3,00

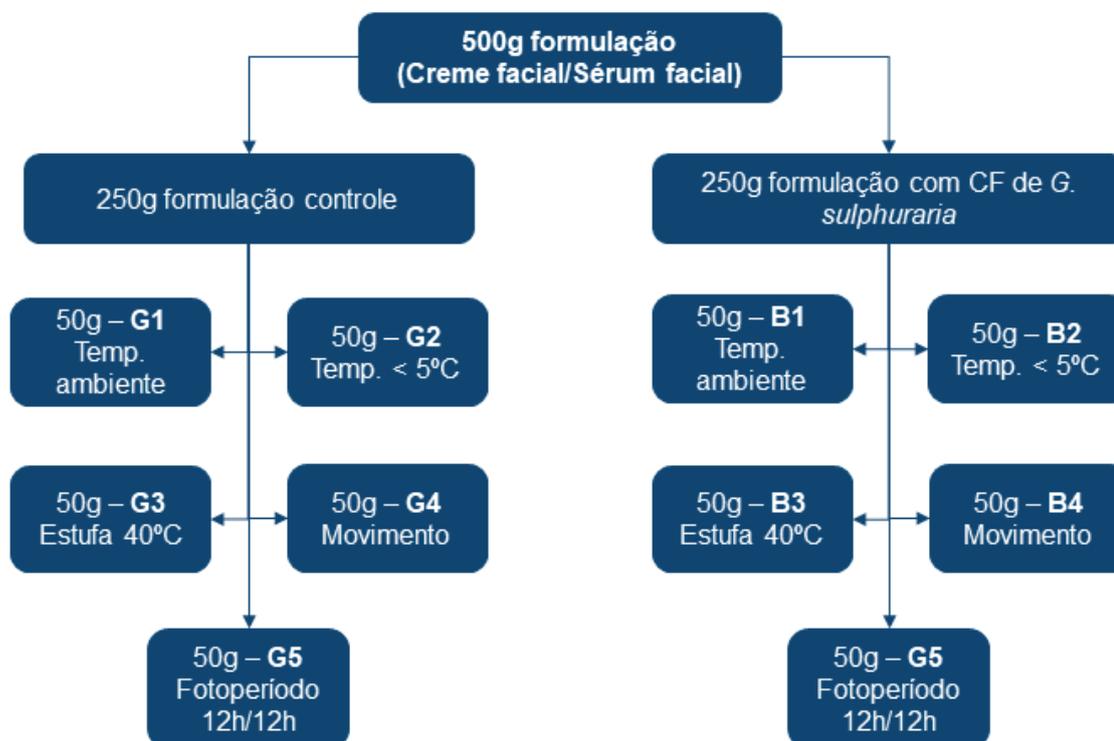
Nota! Para formula o controle, a quantidade adicionada de ativo foi corrigida com adi o de  gua deionizada na mesma porcentagem.

Ap s a pesagem das mat rias primas, em um b quer a fase A foi submetida ao aquecimento e agita o at  atingir a temperatura de 60 C para total solubilidade dos ingredientes. Em seguida, a fase B j  preparada, foi adicionada sob agita o na fase A. Em outro recipiente, inicialmente o Cremophor CO 40 foi submetido ao aquecimento a 40 C para fundir o material e, em seguida, os demais ingredientes da fase foram adicionados.

Depois de preparada a fase C, a mesma foi adicionada sobre a fase principal (A e B) sob agita o constante at  completa homogeneiza o. O pH foi ajustado para manter-se na faixa de 6,00 a 7,00, conforme instru o do fabricante. A formula o foi deixada em repouso para resfriamento total e, em seguida, foram fracionadas as por es para cada condi o de armazenamento pr -definida.

A formula o do creme facial para pele madura e do s rum facial foram preparadas para dividir em duas partes, cada: formula o controle (sem o ativo) e formula o com CF de *G. sulphuraria*. O Fluxograma 3 demonstra como foi realizada essa etapa da formula o.

Fluxograma 3 – Formulação cosmética



Fonte: autoria própria

Os frascos foram distribuídos para avaliar a resposta em relação as cinco condições propostas. A amostragem dessas formulações foi feita nos dias: 0, 1, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a produção das mesmas), cerca de 5g de cada foram coletadas para análise visual de odor, aparência e cor, seguido de análises de pH, atividade de água e espalhabilidade. Uma amostragem nos dias 1, 45 e 90 foi realizada para análises microbiológicas.

As formulações foram submetidas a diferentes tipos de estresse para verificar a sua estabilidade durante 90 dias (estabilidade acelerada). As condições testadas foram temperatura (temperatura ambiente, estufa a 40°C, geladeira a 5°C), a exposição à luz (3500Lux, 12 h/12 h) – estufa contendo fotoperíodo - e agitação (as amostras ficaram na bolsa própria, simulando uma condição real do dia-a-dia, ora movimento, ora parada).

Para facilitar a organização dos testes e manipulação, os produtos foram numerados e nomeados com B de branco e G nas amostras contendo CF de *G. sulphuraria*, como demonstram as Figuras 6 e 7.

Figura 6 – Amostras controle para teste de estabilidade acelerada nas cinco condições propostas



Fonte: autoria própria

Figura 7 – Amostras contendo ativo de *G. sulphuraria* para teste de estabilidade acelerada nas cinco condições propostas.



Fonte: autoria própria

Como se pode notar, as amostras B5 e G5 do creme e do sérum foram acondicionadas em potes transparentes para analisar a influência da luz na estabilidade das emulsões.

Quadro 5 – Amostragem da formulação creme pele madura para teste de estabilidade

CREME FACIAL PELE MADURA										
dias	B1	G1	B2	G2	B3	G3	B4	G4	B5	G5
	T°C ambiente		Estufa 40°C		T°C geladeira		Movimento		Fotoperíodo 3500Lux 12h/12h	
0	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
1	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade, análises microbiológicas: Mesófilos Totais 35°C e Fungos e Leveduras									
15	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
30										
45	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade, análises microbiológicas: Mesófilos Totais 35°C e Fungos e Leveduras									
60	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
75	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
90	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade, análises microbiológicas: Mesófilos Totais 35°C e Fungos e Leveduras									

Fonte: autoria própria

Quadro 6 - Amostragem da formulação sérum facial para teste de estabilidade

SERUM FACIAL										
dias	B1	G1	B2	G2	B3	G3	B4	G4	B5	G5
	T°C ambiente		Estufa 40°C		T°C geladeira		Movimento		Fotoperíodo 3500Lux 12h/12h	
0	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
1	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade, análises microbiológicas: Mesófilos Totais 35°C e Fungos e Leveduras									
15	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
30										
45	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade, análises microbiológicas: Mesófilos Totais 35°C e Fungos e Leveduras									
60	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
75	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade									
90	cor, odor, aspecto, pH, atividade de água, espalhabilidade, análises microbiológicas: Mesófilos Totais 35°C e Fungos e Leveduras									

Fonte: autoria própria

A escolha dos testes e parâmetros seguiram 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. Os parâmetros microbiológicos seguiram a RDC nº 752 de 19 setembro de 2022 (ANVISA, 2022).

3.5.2.1 Aspecto, Cor e Odor

As análises de aspecto, cor e odor foram realizadas por comparação visual, em condições de luz branca, conforme indicado pelos métodos convencionais. O odor foi avaliado por medidas diretas de cheiro. As propriedades sensoriais de aparência, odor e coloração foram avaliados tendo como comparação os aspectos iniciais das formulações preparadas e das amostras controle.

3.5.2.2 Determinação do pH

A análise do pH foi realizada em uma dispersão aquosa de 10% (m/v), 1g de cada formulação foram dispersadas em água destilada, homogeneizada com um agitador do tipo vórtex, e a leitura feita em peagâmetro digital. Os valores de pH entre 5,5 e 7,5 são compatíveis com o pH cutâneo e com o estabelecido pelo fabricante da formulação e, portanto, foram usados como critério de estabilidade.

3.5.2.3 Atividade de água (A_w)

A determinação da atividade de água (A_w) foi verificada no equipamento AquaLab X.

Figura 8 – Equipamento AquaLab X para análise atividade de água



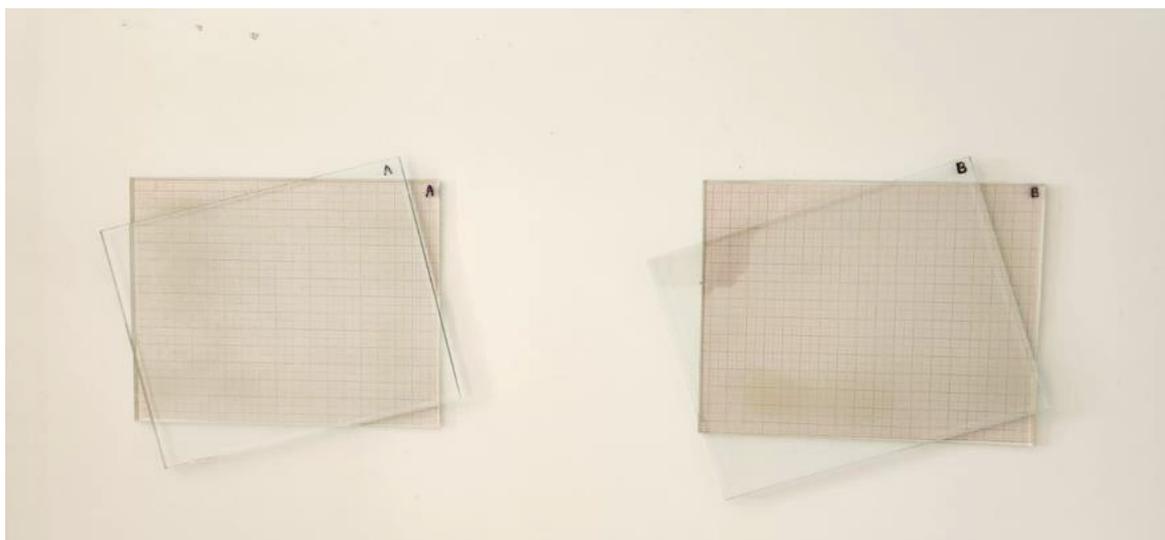
Fonte: autoria própria

O equipamento foi calibrado com os padrões adequados antes de iniciar a amostragem. A amplitude do analisador vai de 0,030 a $1,000 \pm 0,015$.

3.5.2.4 Espalhabilidade

A análise da espalhabilidade foi realizada em um sistema montado especialmente para tal fim, segundo metodologia de Borghetti & Knorst 2006 com modificações de Novak 2013 (BORGHETTI; KNORST, 2006; NOVAK, 2013), conforme apresentado na Figura 9. Em uma placa retangular de madeira, uma folha de papel milimetrado e uma placa de vidro retangular (10 cm x 18 cm) foram fixadas, tornando-se a superfície de trabalho em que foram depositadas as amostras. A quantidade de 0,1 g de cada amostra foi colocada na placa de vidro e, em seguida, depositada a outra placa de vidro móvel, de peso conhecido, (200 g) foi colocada em cima.

Figura 9 - Sistema para análise de espalhabilidade



Fonte: Autoria própria

A cada 3 minutos, um peso de 200g foi adicionado ao sistema até atingir um quilo. Dado o tempo de 3 minutos do último peso colocado, foi calculado o diâmetro com auxílio do papel milimetrado, previamente fixado. Os resultados foram inseridos na Equação 8 e o resultado pode ser expresso em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado por uma determinada massa.

Equação 8 - Cálculo da espalhabilidade em formulações cosméticas

$$Ei = \frac{d^2 \times \pi}{4}$$

Onde d é o diâmetro do círculo formado pelo produto espalhado.

3.5.2.5 Análise Microbiológica

Amostras de início, meio e fim da estabilidade foram testadas em relação à sua contaminação microbiológica por meio da semeadura de superfície em meios de cultivo apropriados para detecção de bactérias, fungos e leveduras, sendo ágar nutriente e ágar batata dextrose, respectivamente. Depois de incubados pelo tempo de 48 horas para bactérias e 96 horas para fungos e leveduras), procedeu-se à contagem dos microrganismos. Além disso, também foi realizada análise microbiológica do caldo fermentado para prever uma possível contaminação

proveniente desse material. Para descartar a presença de contaminantes no caldo fermentado, o mesmo foi submetido as mesmas análises.

Foram utilizadas três diluições em água peptonada para realizar contagem do crescimento microbiano (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). Os parâmetros microbiológicos foram baseados na RDC nº 752 de 19 de setembro 2022 (ANVISA, 2022).

3.5.2.6 Análise estatística dos dados

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os testes de Tukey foram realizados para determinar diferenças entre as médias no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O teste de correlação de Pearson foi aplicado para avaliar o grau de correlação entre análise de compostos fenólicos e análise anti tirosinase. O valor p varia de -1 a +1. Quando $p = -1$, significa uma correlação negativa perfeita entre duas variáveis, isto é, se uma aumenta e outra diminui. Se $p = 0$, as duas variáveis não dependem uma da outra. E quando $p = +1$ significa uma correção positiva perfeita entre duas variáveis.

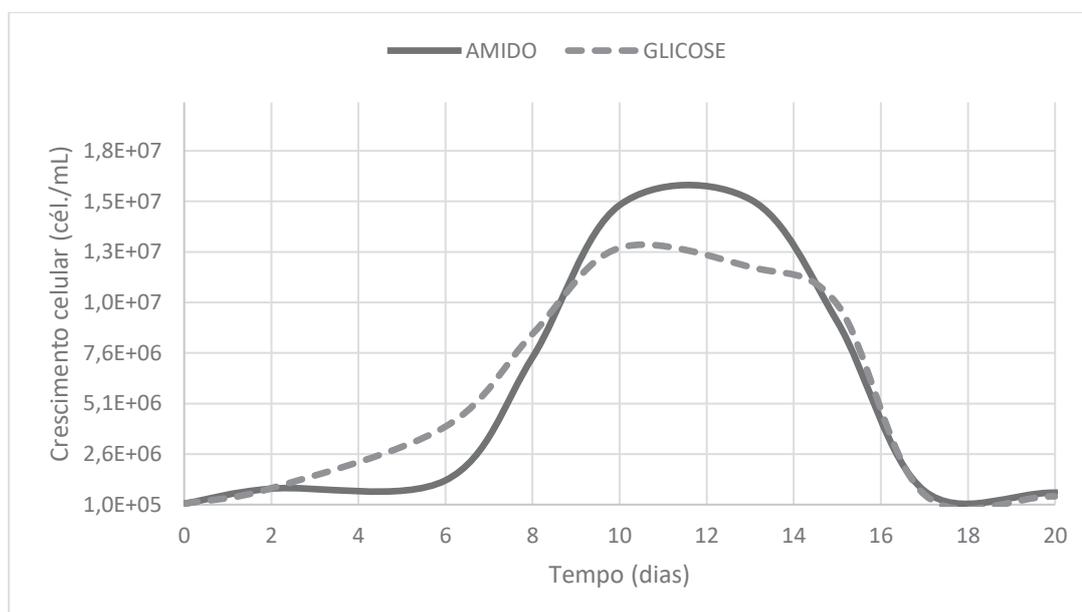
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

De acordo com o meio de cultivo proposto por (RAHMAN; SARIAN; VAN DER MAAREL, 2020) e a flexibilidade da *G. sulphuraria* em crescer em diversas fontes de carbono, foi comparado o cultivo dessa microalga com duas fontes de carbono diferentes: glicose e amido de milho. O amido é um polissacarídeo composto de amilose e amilopectina, com várias glicoses ligadas por ligações glicosídicas; ou seja, para que a glicose esteja disponível para consumo em um crescimento microbiano, faz-se necessário a quebra das ligações glicosídicas. Essa quebra pode ser previamente realizada por uma hidrólise ácida ou enzimática, mas pesquisas sugerem que a *G. sulphuraria* produz uma glicoamilase extracelular, em pH 2,0 em altas temperaturas, convertendo amilose e amilopectina em glicose (RAHMAN; SARIAN; VAN DER MAAREL, 2020).

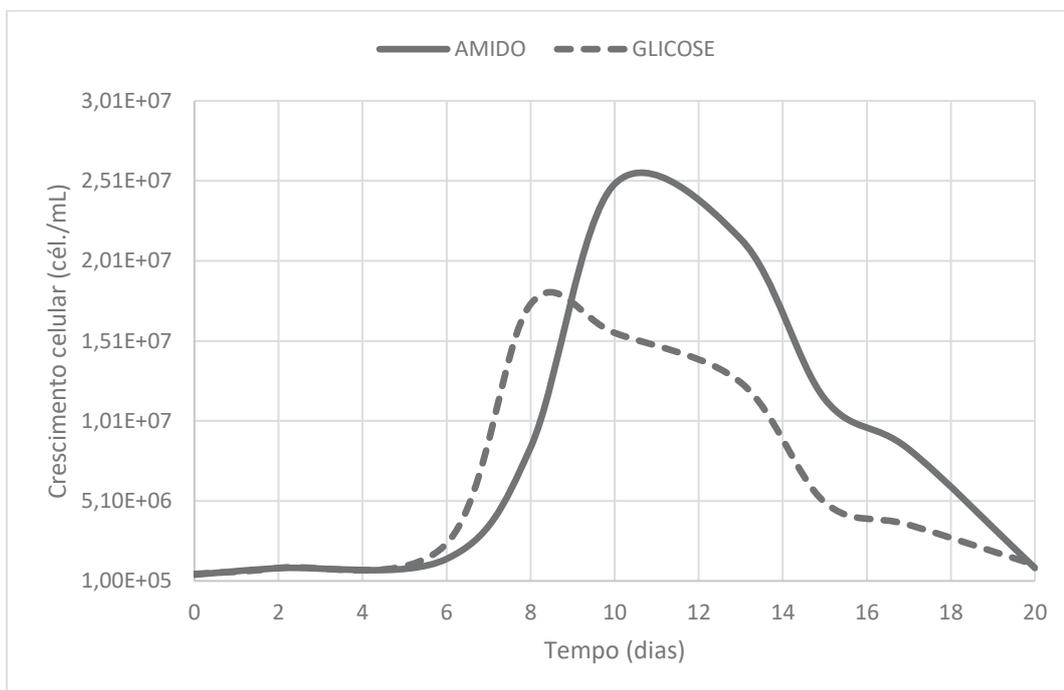
Foram comparadas diferentes concentrações de glicose e amido, 10g/L, 25g/L e 50g/L, com a finalidade de avaliar a influência da disponibilidade de carbono orgânico no crescimento celular e na cinética de crescimento; os dados foram apresentados na Tabela 5 e visualmente nos Gráficos 1, 2 e 3. Os cultivos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura 45°C e pH, 2,0, apenas alterando as concentrações de carbono.

Gráfico 1 – Curva de crescimento celular *G. sulphuraria* em amido e glicose a 10 g.L⁻¹



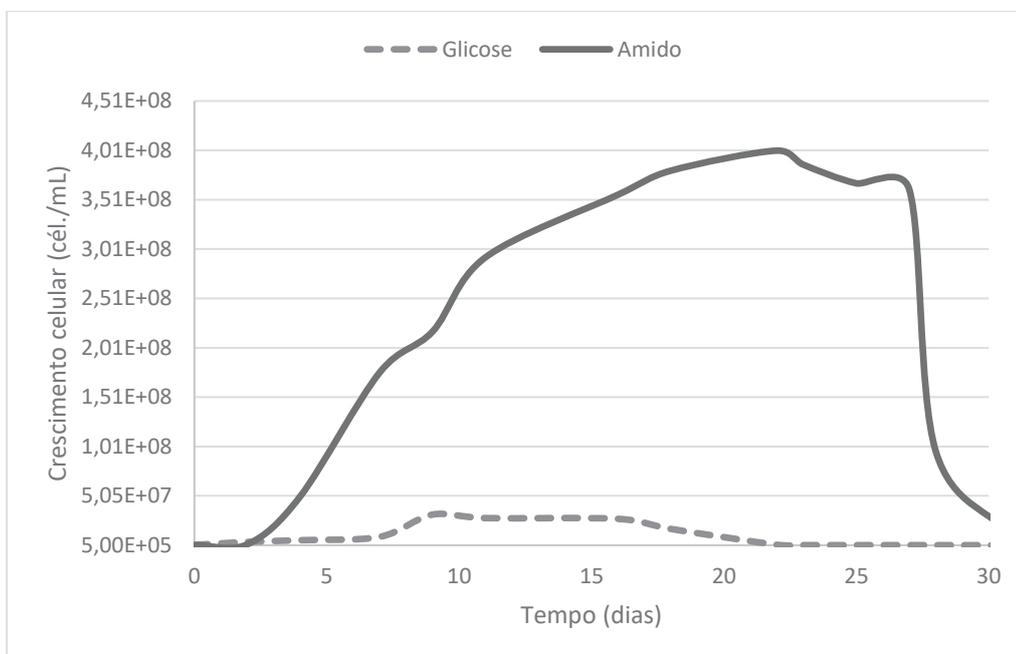
Fonte: autoria própria

Gráfico 2 - Curva de crescimento celular *G. sulphuraria* em amido e glicose a 25 g.L⁻¹



Fonte: autoria própria

Gráfico 3 - Curva de crescimento celular *G. sulphuraria* em amido e glicose a 50g.L⁻¹



Fonte: autoria própria

O inóculo dos cultivos de amido e glicose iniciaram na escala de 1.10^5 células.mL⁻¹. As culturas demonstraram um crescimento acima da escala de 10^7 células. mL⁻¹, isto é, um aumento de 2 log na escala e à medida que a concentração de carbono foi aumentada, seja glicose ou amido, o crescimento celular também aumentou em relação ao número de células. Nas menores concentrações, o número de células aumentou dois log; quando a concentração foi para 50g/L de amido o crescimento celular atingiu um aumento de 3 log.

A quantificação da biomassa produzida nos cultivos de amido não foi realizada, devido a presença de amido residual que é retido junto com a biomassa na etapa de centrifugação do cultivo. Uma hidrólise ácida do amido e sucessivas etapas de separação poderiam ser aplicadas para eliminar esse polímero da biomassa, no entanto, desconhece se esses procedimentos poderiam interferir nos metabólitos excretados ou mesmo na composição da biomassa. Para trabalhos futuros, essa etapa pode ser otimizada.

No entanto, com base em pesquisas anteriores do nosso grupo de pesquisa com cultivos de glicose - nas mesmas condições -, foi possível estabelecer uma relação entre número de células (células. mL⁻¹) e a quantidade de biomassa (g.mL⁻¹). Com isso, tem-se que a cada 1.10^6 células.mL⁻¹ é possível obter 2,10 g.L⁻¹. Tendo essa relação, pode-se estimar nos cultivos desse trabalho uma produção de biomassa, expressos na Tabela 5.

O mesmo perfil foi observado nos estudos de (RAHMAN; SARIAN; VAN DER MAAREL, 2020) nas concentrações de 10g/L e 50g/L para glicose. Porém, numa concentração maior, 100g/L de glicose, esse comportamento foi contrário: observou um menor rendimento na biomassa, tendo efeito negativo sobre a cinética de crescimento. Diferente do observado, outro estudo afirmou que *G. sulphuraria* foi capaz de tolerar concentrações de glicose e frutose de até 166 g/L sem efeitos negativos sobre a taxa de crescimento específico; apenas quando a concentração total de substâncias dissolvidas no meio de crescimento excedeu 1 a 2 mol.L⁻¹, o crescimento foi completamente inibido (SCHMIDT; WIEBE; ERIKSEN, 2005).

Outro quesito a ser avaliado: as concentrações de 50g/L também proporcionaram uma mudança no comportamento de crescimento microbiano, observado nos cultivos anteriores. Um alargamento da fase log que ocorreu do dia 3 ao dia 22.

Tabela 5 - Cinética de crescimento da *G. sulphuraria* em diferentes concentrações de amido e glicose

Fonte de carbono	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Produtividade celular ($10^5 \text{ cél.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Tempo de geração (h)	Produção máxima (10^8 cél.mL^{-1})	Estimativa Biomassa (g.L^{-1})
Glicose 10g.L ⁻¹ 1	0,29	0,18	2,39	0,13	2,48
Amido 10g.L ⁻¹	0,61	0,27	1,13	0,15	2,86
Glicose 25g.L ⁻¹ 1	0,46	0,31	1,51	0,17	3,24
Amido 25g.L ⁻¹	0,54	0,21	1,28	0,24	4,58
Glicose 50g.L ⁻¹ 1	0,20	0,58	3,46	0,27	5,15
Amido 50g.L ⁻¹	0,59	4,00	1,17	1,92	36,65

Fonte: autoria própria

Uma fase lag ligeiramente mais extensa foi observada nos cultivos de amido, possivelmente em razão da maior dificuldade de acesso à glicose, o que acarreta em um tempo maior de adaptação do cultivo para sua multiplicação, mas o maior aumento na fase exponencial pode ser uma justificativa das maiores taxas de crescimento foram observadas (0,61; 0,54 e 0,59) quando comparados os cultivos de glicose (0,29; 0,46; e 0,20) para 10g.L⁻¹, 25g.L⁻¹ e 50g.L⁻¹, respectivamente. De forma relacionada, maiores velocidades de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$), proporcionam valores elevados de tempo de geração, interpretado pelo tempo necessário para sua concentração inicial duplicar.

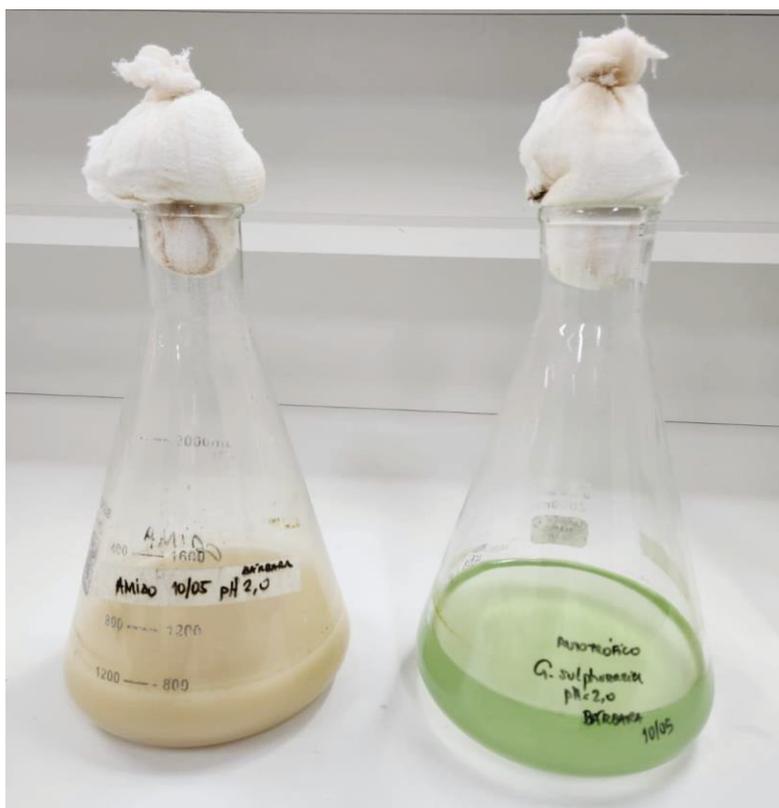
A *G. sulphuraria* quando cultivada com 20% de permeado de soro de leite, em cultivo heterotrófico, apresentou crescimento celular de $4,04.10^7$ células.mL⁻¹. O aumento na proporção de permeado de soro de leite provocou uma drástica diminuição na contagem de células; com 40% de permeado de soro de leite a produção de células foi de $1,5.10^6$ células.mL⁻¹. A lactose, como fonte de carbono, é um dissacarídeo composto por glicose e galactose (ZIMERMANN, 2019).

Meios suplementados com glicose, em condições heterotróficas, apresentaram taxa de crescimento específico e produtividade melhores quando comparados aos meios suplementados com xilose, um monossacarídeo obtido da hidrólise da

hemicelulose, presente em fibras de milho, madeira, bagaço de cana; atuando também como uma fonte de carbono orgânico (CURIEN et al., 2021).

Assim como demonstrado na literatura, cultivos heterotróficos inibem a síntese do pigmento verde e como resultado, as células perdem sua coloração azul-esverdeada e tornam-se amarelos ou amarelo-esverdeado, conforme registrado Figura 10.

Figura 10 – Cultivo heterotrófico em amido e cultivo autotrófico de *G. sulphuraria*



Fonte: autoria própria

Os cultivos nas condições heterotróficas contendo amido 50g.L⁻¹, pH 2,0 e temperatura 45°C apresentaram um crescimento celular elevado, com uma produtividade celular discrepante dos demais testes e atingindo uma produção máxima de células de 1,92.10⁸ células.mL⁻¹. Com isso, essa condição foi utilizada como padrão para o decorrer da pesquisa.

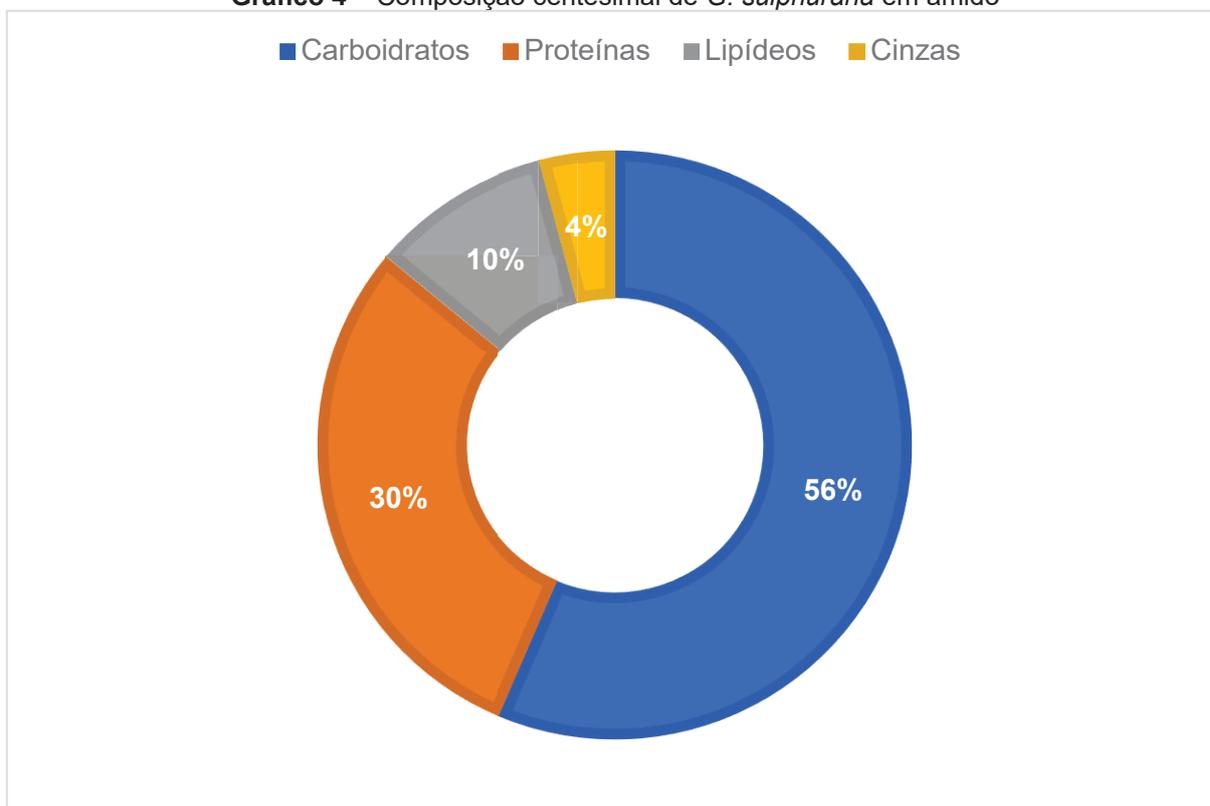
Com isso, devido sua flexibilidade metabólica, a cinética de crescimento apresentou uma produção máxima de 10⁸ células, utilizando amido como única fonte de carbono no seu cultivo. Dessa forma, considerando a forma de preparo do meio, é possível notar a possibilidade dessa microalga em hidrolisar o amido para obtenção

da glicose. Sugere-se que enzimas glicosil hidrolases estejam presentes na membrana celular da *G. sulphuraria*, assim como já relatado na literatura recente.

4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BIOMASSA

Os resultados das análises para avaliar a composição centesimal da biomassa extraída do cultivo de *G. sulphuraria* em amido 50g.L⁻¹, pH 2,0 a 45°C estão ilustrados no Gráfico 4, expressos em porcentagem % (m/m).

Gráfico 4 – Composição centesimal de *G. sulphuraria* em amido



Fonte: autoria própria

Considerando a média dos valores obtidos, nesse estudo, foi possível obter uma composição da biomassa de *G. sulphuraria* em condições heterotróficas, de $56,80 \pm 0,38\%$ de carboidratos, $29,88 \pm 0,031\%$ para proteínas, $9,89 \pm 0,37\%$ para lipídeos e $4,15 \pm 0,29\%$ para cinzas. Vários são os fatores que podem influenciar na composição centesimal; desde forma de cultivo (heterotrófico, mixotrófico ou autotrófico), escolha dos componentes do meio e condições de crescimento, diferentes cepas e até mesmo diferentes metodologias de quantificação de cada fator.

Os cultivos heterotróficos e autotróficos da cepa 074G da *G. sulphuraria* foram comparados em relação ao seu teor de carboidratos, proteínas, lipídeos e também produção de clorofila, pigmento quase que exclusivamente produzido em condições autotróficas. A ausência de luz provocou um aumento no conteúdo de carboidratos de $22,31 \pm 2,31\%$, em condições autotróficas, para $51,17 \pm 4,46\%$. Em contrapartida, o conteúdo de proteínas foi de $58,33 \pm 6,79\%$ na presença de luz para $24,76 \pm 3,23\%$ em condições heterotróficas (WAN et al., 2016). Esses achados corroboram, em percentuais, com os dados obtidos nesse estudo.

Em geral, os carboidratos são os principais macronutrientes presentes na biomassa de *G. sulphuraria*; outro estudo não relatou um aumento significativo do teor de carboidratos na transição do cultivo autotrófico para heterotrófico, a porcentagem ficou de 62,9% e 69,1%, respectivamente (GRAZIANI et al., 2013). Um perfil similar em relação a fração de cada macronutriente foi observado nas pesquisas de (MASSA et al., 2019), também sob condições heterotróficas.

No entanto, sabe-se que essa microalga acumula grandes quantidades de glicogênio e amido florideano (MARTINEZ-GARCIA, 2017). Pesquisas revelam que a adição de glicose ao meio de cultivo, em condições heterotróficas, pode aumentar o conteúdo de glicogênio armazenado; o que justifica um aumento no teor de carboidratos quando cultivados em meios onde a disponibilidade de açúcar é maior (MASSA et al., 2019).

A transição de cultivo autotrófico para heterotrófico exhibe um comportamento similar no que diz respeito ao teor de proteínas dentre os estudos. Assim como o conteúdo de carboidratos, a composição de proteínas também é variável; sob condições heterotróficas foram achados valores de 24,76% (WAN et al., 2016), 26,50% (GRAZIANI et al., 2013), 29,88% nesse estudo e 40,40% (PLEISSNER; LINDNER; HÄNDEL, 2021).

Em *G. sulphuraria* cerca de 50% das proteínas totais são insolúveis e localizadas na parede celular. Tanto a absorção como a assimilação de nitrogênio inorgânico, na forma de íons amônio ou nitrato, é estritamente dependente da disponibilidade de enxofre (S). Estudos revelam que a produção de glutatona é dependente da oferta de S no cultivo. A glutatona é um antioxidante produzido nas células e composto por três aminoácidos: glicina, cisteína e ácido glutâmico (SALBITANI et al., 2022).

Métodos de extração e metodologias para determinação de proteínas podem justificar uma variação do conteúdo proteico; metodologias que consistem em avaliar o conteúdo de nitrogênio presente, método Kjeldahl por exemplo, em que é necessário multiplicar o valor encontrado por um fator de 6,25% geralmente leva a uma superestimação da quantidade total de proteínas na biomassa, já que uma fração considerável do %N é não proteica. Entre outros fatores, a redução dos níveis de ficocianina nas células heterotróficas junto com o maior teor de carboidratos pode estar relacionada com a redução no teor de proteínas nas condições heterotróficas, explica (ABIUSI et al., 2022).

Ainda nas condições heterotróficas, um perfil de macronutrientes pode ser observado na microalga *Tetraselmis chuii* (LU et al., 2017); em contrapartida, a microalga *Chlorella vulgaris* exibe um perfil diferente quando submetida a ausência de luz: maiores conteúdos de proteína, seguido de carboidratos e lipídeos (LIANG; SARKANY; CUI, 2009).

No entanto, mesmo que em menores quantidades, o teor de lipídeos de *Chlorella vulgaris* (> 20% peso seco) superam os achados de pesquisas e desse estudo do conteúdo lipídico na *G. sulphuraria* (< 15% peso seco), nos cultivos heterotróficos (GRAZIANI et al., 2013; PLEISSNER; LINDNER; HÄNDEL, 2021; WAN et al., 2016).

Os lipídeos em microalgas são extremamente variáveis, atingindo picos produtivos, em geral, de 70 a 80% para aqueles usados na produção de óleo para fins energéticos, sob condições autotróficas. Na ausência de luz, a produção de ácidos graxos insaturados pode chegar a cinco vezes maior que os saturados. (GRAZIANI et al., 2013). Esses dados podem confirmar a flexibilidade metabólica das microalgas e como isso reflete na composição de macronutrientes.

Em geral, a abundância em carboidratos na biomassa da *G. sulphuraria* em condições heterotróficas, não limita a possibilidade de aplicações cosméticas. Carboidratos provenientes de algas, por exemplo, têm sido utilizados em indústrias cosmeceúticas devido às suas propriedades químicas e físicas, como agentes gelificantes, espessantes e estabilizantes. Além disso, os polissacarídeos também podem conferir propriedades antioxidantes, antienvelhecimento e anti-inflamatórias. São exemplos: carragena, ulvanas e fucoidan (KIM et al., 2018) O glicogênio

característico de *G. sulphuraria*, assim como os citados, pode também trazer propriedades similares

As proteínas também podem ocupar um espaço de interesse na formulação cosmética. A ficocianina, um complexo proteína-pigmento propiciam uma coloração azul em cosméticos. Foi relatado a presença de astaxantina, outro pigmento de coloração avermelhada, em cultivos heterotróficos da *G. sulphuraria*. Além da coloração, esses pigmentos são fortes agentes antioxidantes, que são excelentes em formulações para pele, por exemplo (MASSA et al., 2019; ZIMERMANN et al., 2020).

Por fim, é possível notas um perfil de macronutrientes com predominância de carboidratos e proteínas, diferente de outras microalgas que há maior conteúdo lipídico. O alto conteúdo de carboidratos (56%) se deve a presença de glicogênio, altamente ramificado e com propriedades funcionais, de acordo com a literatura (MARTINEZ-GARCIA, 2017)

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO FERMENTADO

Para as análises do caldo fermentado, produto extracelular do cultivo da *G. sulphuraria* sob condições heterotróficas, pH 2,0 e 50g/L de amido, como fonte de carbono, foram utilizadas duas amostras: uma bruta, obtida da separação da biomassa do caldo fermentado e outra concentrada, após processo de rota evaporação em equipamento específico. O caldo fermentado após esse processo, foi concentrado 5x (CF 5).

Portanto, as análises de potencial antioxidante, compostos fenólicos e potencial anti tirosinase foram realizadas nas duas amostras, denominadas: caldo fermentado (CF) e caldo fermentado concentrado (CF 5).

4.3.1 Potencial Antioxidante

A Tabela 6 traz o resultado das análises de antioxidantes e compostos fenólicos em diferentes metodologias nas amostras pura (CF) e concentrada (CFC 5) expressos em $\mu\text{mol TEq/L}$ e mg AGE/L .

Tabela 6 – Capacidade antioxidante e compostos fenólicos da fração extracelular de *G. sulphuraria*

	FRAP ($\mu\text{mol TEq.L}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{mol TEq.L}^{-1}$)	Flavonoides (mg QE.L^{-1})	CFT (mg AGE.L^{-1})	FPS
CF	204,08 ^b \pm 6,94	137,74 ^a \pm 4,94	< 20,00	43,62 ^b \pm 0,42	30,98
CFC 5	391,96 ^a \pm 3,61	191,64 ^b \pm 3,50	5,67 \pm 0,04	119,01 ^a \pm 8,84	--

Fonte: autoria própria

O método FRAP avalia a capacidade antioxidante pelo fenômeno da redução dos íons ferro. Basicamente o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. A amostra concentrada (CFC 5) apresentou um maior poder antioxidante ($391,96 \pm 3,61 \mu\text{mol TEq.L}^{-1}$) em relação a amostra pura ($204,08 \pm 6,94 \mu\text{mol TEq.L}^{-1}$), um aumento de 92%, com diferença significativa entre os dados. Maiores teores de FRAP estão relacionados com a maior capacidade de quelar o Fe^{3+} . Os aminoácidos sulfurados desempenham um papel fundamental no ensaio FRAP, relata (WAN et al., 2021).

Outra metodologia empregada que avalia a capacidade antioxidante, ABTS, também trouxe resultados semelhantes ao método FRAP e na medida que a amostra foi concentrada (Tabela 6), foi possível obter um valor mais alto dos compostos antioxidantes. Essa mesma técnica foi aplicada em 23 diferentes extratos de microalgas e os resultados foram bem variados, de $1,33\text{--}29,56 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, devido a variedade das famílias, espécies e cepas de microalgas, que incluíram *Anabaena flos-aquae*, *Chlamydomonas nivalis*, *Chlorella* sp., cepas de *Cryptocodinium cohnii*, *Nitzschia laevis*, cepas de *Nostoc ellipsosporum*, *Schizochytrium* sp., *Synechococcus* sp. e *Thraustochytrium* sp. O maior valor de $29,56 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ foi encontrado em *Synechococcus* sp. e o menor valor $1,33 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ foi observado em *Schizochytrium mangrovei* (LI et al., 2007).

De acordo com a metodologia aplicada em Li et. al 2007 para obtenção do extrato, foi calculado uma possível conversão de $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ para $\mu\text{mol Trolox.L}^{-1}$ para uma possível comparação com os dados observados nesse experimento. Com isso, tem-se um maior valor de $1478 \mu\text{mol Trolox.L}^{-1}$ ($29,56 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) e um menor valor de $66,5 \mu\text{mol Trolox.L}^{-1}$ ($1,33 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$). No ensaio desse trabalho,

as amostras CF e CF obtiveram valores de 204,08 e 391,96 $\mu\text{mol Trolox.L}^{-1}$, respectivamente. Isso representa, aproximadamente, 3 e 6 vezes maiores que o menor dado encontrado no estudo de Li et. al 2007, estando dentro dos valores obtidos no mesmo.

Em geral, alguns dos antioxidantes que podem ser obtidos a partir de microalgas são clorofila, vitaminas, flavonoides, polifenóis, esteróis e carotenoides. Mesmo que o rendimento de produção de antioxidantes por microalgas seja inferior ao obtido sinteticamente, atualmente, a expectativa é que a produção de biomoléculas a partir de microalgas supere as fontes sintéticas, visto que sua produção é renovável e sustentável (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2022).

Extratos de células heterotróficas de *G. sulphuraria* revelaram poder antioxidante de $2832,8 \pm 72,6 \mu\text{mol Eq AsA.g}^{-1}$, isto é, μmol equivalente de ácido ascórbico, um antioxidante natural conhecido como vitamina C. Mesmo em condições heterotróficas, a *G. sulphuraria* pode produzir altas quantidades de bioativos (BOTTONNE et al., 2019).

A ficocianina, um outro exemplo de excelente antioxidante natural já evidenciado nos cultivos de *G. sulphuraria* foi comparado em relação a sua estabilidade com a ficocianina produzida por *Spirulina platensis*. Os resultados mostraram que a C-ficocianina de *G. sulphuraria* foi mais estável do que a de *S. platensis* em todas as condições, especialmente na faixa de 50–65°C e em ambiente neutro de pH 7 (WAN et al., 2021).

Há uma escassez nos estudos que abordam a fração extracelular de cultivos de microalga. É natural que as pesquisas se voltem para o uso da biomassa e suas potenciais aplicações, tais como: produção de bioativos (CANELLI et al., 2023; CARBONE et al., 2020; WAN et al., 2021; ZIMERMANN, 2019), fertilizantes (CASTRO et al., 2020; DINESHKUMAR et al., 2018), ração animal (DINESHKUMAR et al., 2018; HAMED, 2016; SPOLAORE et al., 2006) e ácidos graxos (BREWER et al., 2017; CHISTI, 2007; FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2019; JACKSON; BAHRI; MOHEIMANI, 2019; SINGH; DHAR, 2019) para produção de biocombustíveis. No entanto, quando o assunto é economia circular, faz-se necessário abordar formas de aplicação e uso dessa fração extracelular.

Embora sejam poucos, alguns estudos trazem aplicações de exopolissacarídeos, conhecidos como EPS, obtidos das frações extracelulares de cultivos

de microalgas ou aderidos na sua parede celular. O potencial antioxidante foi um dos achados nessas biomoléculas.

Polissacarídeos extracelulares de *Porphyridium* sp. revelaram capacidade de prevenir o acúmulo e a atividade de radicais livres e espécies químicas reativas, em outras palavras, capacidade antioxidante. E ainda ressalta que existe uma correlação entre o teor de sulfato e a atividade antioxidante, pois a atividade antioxidante exibida pelo polissacarídeo com alto teor de enxofre (4,5%) excedeu o polissacarídeo contendo 3% de enxofre em cerca de 20%. No entanto, não há um consenso na literatura sobre essa relação enxofre e capacidade antioxidante (TANNIN-SPITZ et al., 2005).

Outros EPS sulfatados de cinco diferentes microalgas: *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella* sp., *Chlorella* sp., *Chlorella* sp. e *Picochlorum* sp. também demonstraram capacidade antioxidante a partir de metodologias, como ABTS. Cepas de *Chlorella* sp. removeram mais de 90% dos radicais ABTS. A atividade antioxidante está relacionada com o peso molecular, teor de sulfato e sua posição, diferentes tipos de açúcares, ramificação glicosídica e resíduos de glicoproteína de polissacarídeos, relata (MOUSAVIAN et al., 2022).

Assim como nesse estudo, diferente das pesquisas de Li et al. (2007), frações extracelulares de 12 cepas isoladas de microalgas foram submetidas a metodologia FRAP. Os resultados, também expressos em $\mu\text{mol Trolox/g}$, estavam dentro dos limites de 1,33 – 74,34 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$. Partindo da mesma conversão realizada anteriormente, tem-se 66,5 – 3717 $\mu\text{mol Trolox.L}^{-1}$ (HAJIMAHMOODI et al., 2010).

O menor valor foi obtido da fração extracelular de *Fischerella musicola* e o maior da *Fischerella ambigua*. Os dados encontrados para *G.sulphuraria* nesse estudo encontram-se dentro do intervalo observado na literatura em questão. Esse dado discrepante entre o mesmo gênero reforçam a particularidade de cada espécie (HAJIMAHMOODI et al., 2010). Dessa forma, é possível observar um importante papel da fração extracelular como fonte de antioxidantes naturais.

4.3.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos contemplam a classe dos antioxidantes, devido à sua capacidade de transferir um átomo de hidrogênio ou um elétron para formar

intermediários radicais estáveis. Os teores fenólicos totais da fração extracelular de *G. sulphuraria* foi determinado e expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) na Tabela 6. Pesquisas anteriores relatam que apenas os ácidos fenólicos eram responsáveis pelos compostos fenólicos presentes em microalga, no entanto estudos mostraram que várias classes de flavonóides, como isoflavonas, flavanonas, flavonóis e dihidrocalconas também podem ser encontradas (SAFAFAR et al., 2015).

A fração extracelular da *G. sulphuraria* no estudo em questão contou com um teor de $43,62^b \pm 0,42$ mg AGE.L⁻¹ e quando a amostra foi concentrada cinco vezes, esse teor aumentou para $119,01^a \pm 8,84$ mg AGE.L⁻¹. Valores mais altos de compostos fenólicos foram encontrados em diferentes espécies de microalgas (*Phaeodactylum* sp., *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp., *Dunaliella* e *Desmodesmus*) cultivadas sob condições autotróficas. Os valores estavam entre 3,16 – 7,72 mg AGE.L⁻¹; sendo que a mais alta e a mais baixa concentrações foram encontradas em *Desmodesmus* e *Phaeodactylum* sp., respectivamente. Os dados de *G. sulphuraria* representam mais de cinco vezes do maior valor obtido no estudo de Safafar et al. 2015. Importante ressaltar, a título de comparação, que as frações analisadas nesse estudo foram dos extratos metanólicos da biomassa das espécies. (SAFAFAR et al., 2015).

Nesse mesmo estudo, os compostos fenólicos identificados foram ácido gálico, ácido 2,5 dihidroxi benzóico, ácido 3,4 dihidroxi benzóico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido salicílico e ácido cinâmico (SAFAFAR et al., 2015).

As frações extracelulares de várias espécies de microalgas também foram testadas para avaliar seus compostos fenólicos e os valores variaram de 0,30 – 19,15 mg AGE.g⁻¹. Na grande maioria dos achados, o teor de fenólicos foi maior nas frações extracelulares do que nos extratos de biomassa. Pouco se sabe sobre como os fenóis são produzidos e se acumulam durante o cultivo de microalgas; o que pode se afirmar é que a produção de fenólicos, assim como demais outros bioativos, dependem das condições de crescimento e estresses como o estresse oxidativo. Por isso, todos esses fatores devem ser considerados na comparação de resultados com outros estudos (HAJIMAHMOODI et al., 2010).

4.3.3 Flavonoides

O conteúdo de flavonoides, descrito na Tabela 6, foi expresso em mg QE.L⁻¹, ou seja, em miligramas de quercetina equivalente por litro. A quercetina é um conhecido flavonoide natural, muito utilizado como padrão para análises de conteúdo de flavonoides, pois reage na estequiometria 1:1 com o sal AlCl₃ formando um complexo amarelo, que é lido e interpretado em resultados equivalentes. Dentro da curva padrão de 20 a 200 mg.L⁻¹ de quercetina, foi possível obter leitura apenas da amostra concentrada ($5,67 \pm 0,04$ mg QE.L⁻¹); estando o conteúdo de flavonoides da amostra pura abaixo da curva de leitura da análise.

Os flavonoides pertencem à classe dos compostos fenólicos, então é de se esperar que o conteúdo dessa classe de antioxidantes será menor do que o conteúdo fenólico total, que englobam demais fenólicos. As pesquisas trazem valores de 0,84 – 8,90 mg QE.g⁻¹ para as divisões das Cianobactérias, Chlorophyta, Eustigmatophyceae, Bacillariophyceae e Euglenoida, que incluem microalgas conhecidas como, por exemplo: *Chlorella*, *Desmodesmus* e *Dunaliella* (DEL MONDO et al., 2021).

Nas pesquisas disponíveis, não foram encontrados relatos de análises de flavonoides da *G. sulphuraria* tanto nos extratos de biomassa, como na fração extracelular, como mencionado nesse estudo. Embora o conteúdo seja inferior, quando comparado com a variedade apresentada no estudo de Del Mondo et. al. (2021), é interessante explorar diferentes condições de cultivo para obtenção de mais dados a respeito do conteúdo de flavonoides sintetizados por essa microalga.

4.3.4 Fator de proteção solar (FPS)

O fator de proteção solar obtido para caldo fermentado puro, inicialmente, ultrapassou o limite de detecção da leitura do espectrofotômetro. Para isso, foi necessária uma diluição de 1:10 para a realização e eficácia do teste. O valor de FPS de 30,98 foi calculado a partir dos dados de absorbância e a leitura da amostra, já corrigido fator de diluição. Os flavonoides, mais especificamente as antocianinas, obtidas de frutas vermelhas exibiram um FPS de in vitro de 54,57 para amora e 37,32 para framboesa (CEFALI et al., 2019)

Ainda que esse resultado tenha sido satisfatório, o que podemos afirmar com esse dado é que o caldo fermentado *G. sulphuraria* é promissor como agente protetor para apenas a radiação UVB, visto que a amostra foi submetida a comprimentos de onda de 290 a 320 nm. Os raios UVA se iniciam em 320nm. Contudo, mesmo não obtendo resultado que abrange os raios UVA, o valor encontrado de 30,98 já se encontra numa condição significativa de proteção, considerando a relação de fator mínimo para UVA sendo 1/3 do FPS total. Dessa forma, mesmo não sendo possível categorizar esse ativo no Quadro 1, pode concluir que há uma potencial ação protetora proporcionada pelo ativo de *G.sulphuraria*.

4.3.5 Inibidores de tirosinase

A porcentagem de inibição da enzima tirosinase foi determinada na amostra pura e concentrada, no extrato da biomassa, bem como no meio de cultura sem o inóculo para avaliar se havia atividade anti tirosinase no meio sem inoculação da *G. sulphuraria*. As absorvâncias foram medidas a cada 5 minutos, totalizando em um tempo de 50 minutos; dessa forma pode-se avaliar o tempo de ação da capacidade de inibição da enzima.

Conforme os resultados obtidos na Tabela 7, a amostra CF 5, caldo fermentado concentrado cinco vezes, obteve melhor resultado quando comparado com a amostra pura CF, exceto para o primeiro tempo de medição (5 a 10 min). De forma geral, entre as médias dos resultados obtidos em todos os intervalos de tempo, as frações extracelulares de *G. sulphuraria* cultivada em amido sob condições heterotróficas apresentaram, aproximadamente 10 e 15% superior à atividade do ácido kójico (85,88%), para a amostra pura - CF (94,75%) e concentrada – CF 5 (98,87%).

Tabela 7 - Percentual de inibição da CF de *G. sulphuraria* e do controle ácido kójico

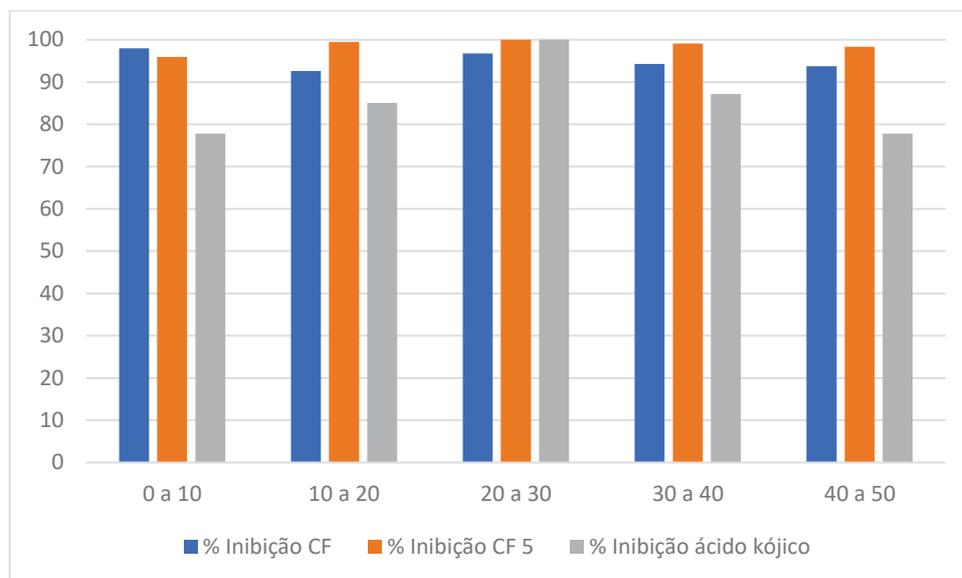
T (min)	% Inibição CF	% Inibição CF 5	% Inibição Cultivo Controle	% Inibição IC (Ácido Kójico)
5 a 10	98,00 ± 0,22	95,92 ± 0,78	0,00 ± 0,00	77,78 ± 0,15
10 a 15	94,44 ± 2,44	99,66 ± 0,45	0,00 ± 0,00	95,00 ± 0,25
15 a 20	90,70 ± 2,32	99,24 ± 0,23	0,00 ± 0,00	70,13 ± 1,21
20 a 25	93,59 ± 1,28	100,00 ± 0,00	3,12 ± 1,21	100,00 ± 0,00
25 a 30	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	6,12 ± 2,01	100,00 ± 0,00
30 a 35	94,05 ± 3,57	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	86,90 ± 2,32
35 a 40	94,44 ± 4,17	98,24 ± 0,56	0,00 ± 0,00	87,50 ± 1,77
40 a 45	91,93 ± 0,83	96,74 ± 0,44	0,00 ± 0,00	80,64 ± 1,51
45 a 50	95,62 ± 1,25	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	75,00 ± 1,77

Fonte: autoria própria

Dados sobre a ação anti-tirosinase provenientes dos cultivos de *G. sulphuraria* não foram encontrados na literatura. No entanto, a metodologia fornece um padrão – ácido kójico – um excelente agente despigmentante natural comumente usado em formulações cosméticas e provenientes de processos fermentativos de produção. Quando comparados as amostras de *G. sulphuraria* com o ácido kójico em questão, as amostras apresentaram um resultado melhor na maior parte dos intervalos.

Além disso, pode-se perceber que logo nos primeiros 10 minutos de contato da reação, as amostras de *G. sulphuraria* (98,00 % em CF e 95,92% em CF 5) demonstraram maior inibição da enzima tirosina em relação ao padrão (77,78%). Ainda nessa comparação, o ácido kójico obteve sua máxima ativação no tempo de 20 a 25 minutos, semelhante ao comportamento da amostra concentrada CF 5, ao passo que para amostra pura CF a otimização ocorreu no tempo de 25 a 30 minutos.

Gráfico 5 - Comparação gráfica do percentual de inibição das amostras *G. sulphuraria* e o ácido kójico versus tempo



Fonte: Autoria própria

Em relação aos tempos de ativação, como exibido graficamente, as amostras de *G. sulphuraria* demonstraram um padrão de inibição mais estável, com leituras superiores a 90% enquanto que o ácido kójico obteve resultados mais baixos, chegando a 70,13% de inibição no tempo de 15 a 20 minutos. Com foco em aplicações cosméticas, os maiores resultados de inibição em tempos variados pelas frações extracelulares da microalga podem trazer uma variedade de aplicações de forma mais eficaz e em menos tempo de contato. Isso é, o ativo, com pouco tempo de contato, pode trazer resultados mais satisfatórios do ponto de vista de ação clareadora quando comparados ao ácido kójico.

Outro ponto avaliado, foi a possibilidade de o cultivo em si exibir uma inibição de tirosinase, porém com os resultados apresentados pode-se concluir que o potencial inibitório da enzima tirosinase é fornecido pelo crescimento da *G. sulphuraria* em condições heterotróficas e não apenas do meio em que ela está submetida. Os metabolitos secundários excretados pela microalga durante seu crescimento possivelmente conferiram essa propriedade às amostras.

É interessante ressaltar que os inibidores de tirosinase conferem às formulações cosméticas a propriedade de clareadores de pele. Com isso, a importância de proteção solar faz-se necessário, pois, geralmente, produtos dessa categoria exigem esse cuidado para não obter um efeito reverso. Diante desse

exposto, é possível observar essa capacidade dupla do ativo de *G.sulphuraria* nesse estudo, pois o caldo fermentado demonstrou resultados significativos no fator de proteção solar, numericamente esse fator foi de 31 e dados satisfatórios, mais de 90% de inibição tirosinase logo nos primeiros vinte minutos de análise. Essa multifuncionalidade valoriza ainda mais os resultados achados e abre oportunidades reais para indústria cosmética.

Embora não há dados na literatura com uso de *G. sulphuraria*, outras microalgas foram avaliadas sobre a capacidade de inibição da tirosinase também com foco em aplicações cosméticas. Extratos aquoso e etanólico de *Arthrospira platensis* exibiram inibições semelhantes ou maiores que o ácido kójico ($IC_{50} = 2,8 \cdot 10^{-4} \text{ g/mL}^{-1}$), com valores de IC_{50} de $1,4 \cdot 10^{-3}$ e $7,2 \cdot 10^{-3} \text{ g/mL}^{-1}$, respectivamente. Os dados foram expressos em IC_{50} que representa a concentração necessária do ativo para reduzir 50% do radical L-DOPA, um dos precursores para formação da melanina na cascata de melanogênese. Dessa forma, quanto menor a concentração necessária, maior é a capacidade de inibição do ativo analisado (SAHIN, 2018).

É possível estabelecer uma correlação positiva com a presença de compostos fenólicos no ativo com a capacidade de inibição da tirosinase, uma vez que o substrato da tirosinase possui uma estrutura fenólica. A presença de grupos hidroxilas (-OH), bem como sua localização na estrutura, pode também estabelecer uma relação com ação anti tirosinase (SAHIN, 2018). A ação anti-tirosinase da *G. sulphuraria* pode estar relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides e a presença de antioxidantes, que potencializam o efeito despigmentante.

Com base nessa discussão e com os dados obtidos na presente pesquisa foi realizado o teste estatístico de correlação positiva entre os resultados de compostos fenólicos totais e a ação anti tirosinase e o mesmo resultou em um valor de 0,40 e 0,22 para as amostras pura CF e concentrada cinco vezes CF 5, respectivamente. Valores próximos de zero indicam uma correlação fraca.

No entanto, sugere-se que metabolitos secundários excretados por essa microalga exercem mecanismos de inibição semelhantes ao ácido kójico, podendo ser ácidos aromáticos ou fenóis que em sua estrutura apresentam grupos (-OH). Alguns flavonoides contendo um grupo aceto apresentam potente atividade inibitória da tirosinase, possivelmente em razão da semelhança entre o grupo di-hidroxifenil na L-DOPA e o grupo aceto nos flavonoides. Com capacidade de quelar o cobre (Cu^+) no

sítio ativo, levando à inativação irreversível da tirosinase (KIM; UYAMA, 2005; PANZELLA; NAPOLITANO, 2019).

Dessa forma, os compostos fenólicos que possuem essa ação quelante do cobre, similar a estrutura do substrato da enzima, atuam como um inibidor competitivo da reação enzimática, impedindo a sequência da cascata de melanogênese e, conseqüentemente, a formação de melanina (KAZI et al., 2022; PANZELLA; NAPOLITANO, 2019).

Essa ação anti tirosinase já foi descrita em outros extratos microalgais, em diversos tipos de solventes. *Tetraselmis tetrathele*, *Dunaliella tertiolecta*, *Platymonas* sp. e *Chaetoceros simplex* são excelentes candidatas a aplicações cosméticas com propriedades clareadoras. A extração com acetato de etila da *Platymonas* sp. foi o que apresentou maior atividade inibitória (124%), seguido de *D. tertiolecta* com 107% de inibição. Em contrapartida, extratos aquosos e metanólicos, não apresentaram agentes que inibem a enzima tirosina. Dessa forma, é possível que nessas microalgas o responsável por tal ação tenha uma polaridade intermediária, em razão da sua afinidade com o solvente acetato de etila, que é apolar (JI; KIM; KIM, 2021). No entanto, extrações com solventes orgânicos afastam-se um pouco da proposta de economia verde e biocosméticos.

A zeaxantina, pertencente a classe dos pigmentos carotenoides, demonstrou ser responsável pela ação inibitória da tirosinase nos extratos de *Nannochloropsis oculata*. A presença de grupos (-OH) em sua estrutura pode ser uma justificativa desse comportamento (SHEN et al., 2011). Microalgas com potencial produção de vitamina E e C, como *Pediastrum cruentum*, podem ser boas candidatas na aplicação cosmética, potencializando a ação despigmentante (YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020).

Ainda que na literatura não tenham sido encontrados dados sobre ação anti tirosinase das frações extracelulares, bem como de extratos da biomassa da *G. sulphuraria*, já existem poucos dados sobre o uso dessa microalga em aplicações cosméticas, como a luteína com função de proteção UV (YARKENT; GÜRLEK; ONCEL, 2020) e água micelar com extrato da biomassa (MUNHOZ et al., 2021).

4.4 APLICAÇÃO COSMÉTICA

A fração extracelular do cultivo de *G.sulphuraria*, ou seja, o caldo fermentado na condição pura foi incorporado à formulações cosméticas de diferentes funções na pele para sua avaliação preliminar e estabilidade ao longo de 90 dias. Embora a amostra concentrada do caldo fermentado tenha demonstrado melhores resultados, utilizou-se da condição pura da fração, devido a predição de custos operacionais na etapa de concentração da amostra para posterior aplicação cosmética.

4.4.1 Estabilidade preliminar

Os testes foram conduzidos com o caldo fermentado incorporado às formulações cosméticas: creme e sérum facial sob condições extremas de temperatura (congelamento e descongelamento). A seguir, nas Tabelas 8 e 9, tem-se os primeiros dados organolépticos do creme facial e do sérum facial, respectivamente, tais como cor, odor e aspectos.

Tabela 8 – Estabilidade preliminar creme facial controle e com adição do CF de *G. sulphuraria*

Ciclos	Tempo (dias)	Aspecto		Cor		Odor	
		Controle	CF	Controle	CF	Controle	CF
1	2	N	N	N	N	N	N
2	4	N	N	N	N	N	N
3	6	N	N	N	N	N	N
4	8	L	L	N	L	N	N
5	10	L	L	N	L	N	N
6	12	L	L	N	L	N	N

Legenda	CF – caldo fermentado <i>G. sulphuraria</i> , N – normal, sem alteração. L – Levemente modificado
----------------	---

Tabela 9 - Estabilidade preliminar sérum facial controle e com adição do caldo fermentado de *G. sulphuraria*

Ciclos	Tempo (dias)	Aspecto		Cor		Odor	
		Controle	CF	Controle	CF	Controle	CF
1	2	N	N	N	N	N	N
2	4	N	N	N	N	N	N
3	6	L	L	L	L	N	N
4	8	L	L	L	L	N	N
5	10	L	L	L	L	N	N
6	12	L	L	L	L	N	N

Legenda	CF – caldo fermentado <i>G. sulphuraria</i> , N – normal, sem alteração. L – Levemente modificado
----------------	---

Cada ciclo contém 48h, e engloba desde a centrifugação, congelamento e temperatura ambiente. Como o experimento teve durabilidade de 12 dias, ao final de cada ciclo, eram realizadas as análises. Alterações no aspecto e na cor foram observados nas duas formulações, tanto para as amostras controle quanto para adicionado extrato de *G. sulphuraria*. Após 6 dias e 8 dias, para creme e sérum facial, respectivamente.

No entanto, ainda pode considerar que são formulações são estáveis visto que não houve separação de fases. Com isso, as formulações cosméticas foram definidas e uma nova batelada de cada foi preparada para iniciar os testes de estabilidade acelerada.

4.4.2 Estabilidade acelerada

A estabilidade acelerada foi realizada nas formulações creme e sérum facial e sob diferentes condições, foram realizadas as análises organolépticas, pH, atividade de água, espalhabilidade e análise microbiológica. A escolha das duas formulações seguiu o critério de dois produtos de características distintas, do ponto de vista de textura e de sua funcionalidade.

4.4.2.1 Aspecto, cor e odor

Os resultados são capazes de prever as alterações nas formulações frente as diferentes condições de temperatura e armazenamento usual do dia a dia.

Tabela 10 – Características organolépticas do creme facial controle e com adição CF de *G. sulphuraria*

Condição	Tempo (dias)	Controle (B)			CF (G)		
		Aspecto	Cor	Odor	Aspecto	Cor	Odor
1 Temperatura ambiente	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	N	N	N	L	N	N
	43	N	N	N	N	N	N
	57	N	N	N	N	N	N
	71	N	N	N	N	N	N
	85	N	N	N	N	N	N
	91	N	N	N	N	N	N
2 Estufa 40°C	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	L	N	N	L	N	N
	29	L	N	N	L	N	N
	43	L	N	N	L	N	N
	57	L	N	N	L	N	N
	71	L	N	N	L	N	N
	85	L	N	N	L	N	N
	91	L	N	N	L	N	N
3 T °C geladeira	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	N	N	N	N	N	N
	43	N	N	N	N	N	N
	57	N	N	N	N	N	N
	71	N	N	N	N	N	N
	85	N	N	N	N	N	N
	91	N	N	N	N	N	N
4 Movimento	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	N	N	N	N	N	N
	43	N	N	N	N	N	N
	57	N	N	N	N	N	N
	71	N	N	N	N	N	N
	85	N	N	N	N	N	N
	91	N	N	N	N	N	N
5 Fotoperíodo	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	N	N	N	N	N	N

43	N	N	N	N	N	N
57	N	N	N	N	N	N
71	N	N	N	N	N	N
85	N	N	N	N	N	N
91	N	N	N	N	N	N

Fonte: autoria própria

Legenda	CF – formulação contendo caldo fermentado <i>G. sulphuraria</i>
	N – Normal, sem alteração
	L – Levemente modificado
	M – Modificado
	I – Intensamente modificado

As características organolépticas observadas de forma direta do creme facial, expressas acima, demonstraram que as formulações, tanto controle quanto à adicionada com *G. sulphuraria* podem ser consideradas estáveis no decorrer do período teste de 91 dias para as condições simuladas. Foi observada uma leve alteração no aspecto em ambas amostras na condição número 2 (estufa 40 °C) a partir de 15 dias de experimento; alteração essa responsável por tornar o produto menos viscoso que o observado na data da formulação.

Dessa forma, extrapolando para condições do dia a dia, tais formulações podem sofrer leves alterações quando armazenados em locais quentes, como dentro de um veículo. Com isso, a recomendação de orientações na rotulagem como forma de armazenamento e cuidado é uma boa prática a ser adotada para uma futura aplicação comercial. Ainda assim, é possível observar que as formulações possuem estabilidade considerável e apta para venda, visto que não houve alterações significativas, como uma separação de fases.

O mesmo cenário foi aplicado para o sérum facial e os resultados foram expressos na Tabela 11.

Tabela 11 - Características organolépticas do sérum facial controle e com adição CF de *G. sulphuraria*

Condição	Tempo (dias)	CONTROLE (B)			CF (G)		
		Aspecto	Cor	Odor	Aspecto	Cor	Odor
1 Temperatura ambiente	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	N	N	N	N	N	N

	43	N	N	N	N	N	N
	57	N	N	N	N	N	N
	71	N	N	N	N	N	N
	85	N	N	N	N	N	N
	91	N	N	N	N	N	N
<hr/>							
2 Estufa 40°C	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	L	N	N	L	N
	29	L	L	N	L	L	N
	43	N	L	N	N	L	N
	57	N	L	N	N	L	N
	71	N	N	N	N	L	N
	85	L	N	N	N	M	N
	91	L	N	N	N	M	N
<hr/>							
3 T °C geladeira	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	N	N	N	N	N	N
	43	N	N	N	N	N	N
	57	N	N	N	N	N	N
	71	N	N	N	N	N	N
	85	N	N	N	N	N	N
	91	N	N	N	N	N	N
<hr/>							
4 Movimento	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	N	N	N	N	N	N
	43	N	N	N	N	N	N
	57	N	N	N	N	N	N
	71	N	N	N	N	N	N
	85	N	N	N	N	N	N
	91	N	N	N	N	N	N
<hr/>							
5 Fotoperíodo	0	N	N	N	N	N	N
	1	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N
	29	L	N	N	L	N	N
	43	N	N	N	N	N	N
	57	N	N	N	N	N	N
	71	N	N	N	N	N	N
	85	N	N	N	N	N	N
	91	N	N	N	N	N	N

Fonte: autoria própria

Legenda	<p>CF – formulação contendo caldo fermentado <i>G. sulphuraria</i></p> <p>N – Normal, sem alteração</p> <p>L – Levemente modificado</p> <p>M – Modificado</p> <p>I – Intensamente modificado</p>
----------------	--

Assim como no creme facial, na condição de número 2, o comportamento do sérum facial – controle e CF – também foi caracterizado por alterações leves no aspecto e na cor do produto. De coloração translúcida, com o passar dos dias, o sérum em temperatura elevada ganhou uma coloração ligeiramente amarelada. Processo similar ocorre com produtos à base de vitamina C, que com o passar do tempo tendem a escurecer devido a oxidação.

Do ponto de vista comercial, o aspecto menos viscoso também pode provocar descontentamento aos olhos do consumidor, por isso é de grande importância a rotulagem adequada do produto, para que seja armazenado em local arejado, fechado e fresco. Com essas informações asseguradas, pode-se concluir, que em geral, trata-se de uma formulação estável e de qualidade.

4.4.2.2 Análise de pH

A análise de pH é um teste rápido e eficiente para avaliar as características físico-químicas de um produto. Uma alteração brusca no resultado pode indicar falhas no processo de fabricação, bem como uma possível contaminação microbiológica. Os dados médios de pH do creme e sérum facial foram compilados na Tabela 12. Não houve qualquer efeito negativo nas formulações a incorporação do caldo fermentado de *G.sulphuraria* sem a correção prévia do pH.

Tabela 12 – pH médio dos cremes e sérums facial controles e com adição de CF de *G. sulphuraria*

Condição	Creme facial		Sérum facial	
	Controle (B)	CF (G)	Controle (B)	CF (G)
1 T °C ambiente	7,25 ^{aA} ± 0,17	7,19 ^{aA} ± 0,09	6,29 ^{aA} ± 0,19	6,26 ^{aA} ± 0,20
2 Estufa 40°C	7,08 ^{aA} ± 0,22	7,01 ^{aA} ± 0,17	6,09 ^{bA} ± 0,09	6,04 ^{bA} ± 0,05
3 T °C geladeira	7,27 ^{aA} ± 0,08	7,18 ^{aA} ± 0,15	6,19 ^{abB} ± 0,21	6,27 ^{aA} ± 0,18
4 Movimento	7,23 ^{aA} ± 0,13	7,13 ^{abB} ± 0,13	6,26 ^{aA} ± 0,18	6,24 ^{aA} ± 0,19
5 Fotoperíodo	7,22 ^{aA} ± 0,15	7,15 ^{aA} ± 0,12	6,26 ^{aA} ± 0,19	6,22 ^{aA} ± 0,19

Nota 1: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com teste de Tukey.

Nota 2: Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com teste de Tukey.

Nota 3: A análise estatística foi comparada entre os dados da mesma formulação.

Os pHs tanto do creme quanto do s rum f cil se mantiveram praticamente constantes ao longo do tempo. As m dias e seus desvios padr o foram descritos na Tabela 12 e pode ser observado a const ncia dos valores obtidos. De acordo com a Anvisa (2020), as formula es cosm ticas para pele, em geral, se encontram na faixa de pH entre 5,5 a 7,5; logo, as formula es estudadas est o dentro da conformidade estabelecida pela legisla o.

Entre as condi es de armazenamento exploradas, n o houve altera o significativa das m dias dos valores de pH, para o creme facial. Em rela o ao s rum, observa-se uma diferen a significativa entre a condi o de estufa e as demais; assim como na condi o de geladeira, quando comparado  s duas formula es branco e com ativo de *G. sulphuraria*. As sutis altera es do pH s o indicativas de n o ocorr ncia de rea es indesej veis, tanto entre os componentes da f rmula, embalagem, bem como contamina o microbiana.

4.4.2.3 Atividade de  gua

A atividade de  gua das formula es estudadas foi determinada e expressa nas Tabelas 13, 14, 15 e 16. Uma altera o significativa na atividade de  gua   indicativa de altera o na qualidade do produto, podendo afetar at  mesmo o prazo de validade do mesmo.

Tabela 13 – Atividade de água dos cremes controle (B) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada

Dias	1 – T °C ambiente	2 – Estufa 40°C	3 – T °C geladeira	4 – Movimento	5 – Fotoperíodo
0	0,9964	0,9987	0,9976	0,9981	0,9956
1	0,9973	0,9969	0,9980	0,9955	0,9980
15	0,9982	0,9955	0,9963	0,9973	0,9962
29	0,9920	0,9934	1,0054	0,9937	0,9940
43	0,9895	0,9918	0,9907	0,9959	0,9956
57	0,9914	0,9942	0,9935	0,9946	0,9980
71	0,9963	0,9953	0,9979	0,9967	0,9980
85	0,9988	0,9965	0,9977	0,9919	0,9962
91	1,0063	0,9970	0,9950	0,9922	0,9990
MÉDIA ±	0,9962 ±	0,9955 ±	0,9969 ±	0,9951 ±	0,9967 ±
DESVIO	0,0035	0,0016	0,0027	0,0018	0,0013

Fonte: autoria própria

Tabela 14 - Atividade de água dos cremes CF de *G. sulphuraria* (G) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada

Dias	1 – T °C ambiente	2 – Estufa 40°C	3 – T °C geladeira	4 – Movimento	5 - Fotoperíodo
0	0,9963	0,9953	0,9968	0,9969	0,9993
1	0,9977	0,9983	0,9969	0,9998	0,9963
15	0,9960	0,9976	0,9961	0,9957	0,9965
29	0,9947	0,9958	0,9995	0,9952	0,9920
43	0,9942	0,9928	0,9939	0,9964	0,9952
57	0,9938	0,9972	0,9950	0,9921	0,9969
71	0,9974	0,9951	0,9987	0,9965	0,9966
85	0,9974	0,9958	0,9925	0,9910	0,9975
91	0,9962	0,9959	0,9981	0,9939	0,9946
MÉDIA ±	0,9960 ±	0,9960 ±	0,9964 ±	0,9953 ±	0,9961 ±
DESVIO	0,0012	0,0011	0,0018	0,0020	0,0014

Fonte: autoria própria

Tanto no creme controle quanto na formulação CF contendo ativo de *G. sulphuraria* apresentaram valores de atividade de água superiores a 0,99, o que indica que possui uma grande quantidade de água disponível. Pequenas alterações foram observadas nos valores ao longo do tempo da estabilidade, manteve-se quase que constante. Isso mostra que a estabilidade da emulsão não foi afetada e possivelmente

a qualidade da formulação tenha se mantido ao longo desse período. O comportamento das amostras foi similar frente às diferentes condições propostas.

Tabela 15 - Atividade de água dos sérums facial controle (B) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada

Dias	1 – T °C ambiente	2 – Estufa 40°C	3 – T °C geladeira	4 – Movimento	5 - Fotoperíodo
0	0,9917	0,9912	0,9909	0,9921	0,9929
1	0,9968	0,9979	0,9971	0,9979	0,9982
15	0,9957	0,9978	0,9973	0,9988	0,9990
29	0,9981	0,9938	0,9926	0,9926	0,9938
43	0,9958	0,9930	0,9959	0,9956	0,9932
57	0,9888	0,9870	0,9934	0,9881	0,9928
71	0,9946	0,9950	0,9964	0,9964	0,9968
85	0,9900	0,9899	0,9947	0,9925	0,9926
91	0,9942	0,9941	0,9948	0,9945	0,9938
MÉDIA ±	0,9940 ±	0,9933 ±	0,9948 ±	0,9943 ±	0,9948 ±
DESVIO	0,0025	0,0027	0,0017	0,0026	0,0021

Fonte: autoria própria

Tabela 16 - Atividade de água dos sérums facial de CF de *G. sulphuraria* (G) ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada

Dias	1 – T °C ambiente	2 – Estufa 40 °C	3 – T °C geladeira	4 – Movimento	5 - Fotoperíodo
0	0,9939	0,9921	0,9947	0,9942	0,9925
1	0,9967	0,9998	1,000	0,9982	0,9981
15	0,9968	0,9958	0,9962	0,9932	0,9963
29	0,9939	0,9946	0,9903	0,9921	0,9947
43	0,9964	0,9947	0,9951	0,9954	0,9942
57	0,9976	0,9927	0,9943	0,9870	0,9924
71	0,9952	0,9954	0,9972	0,9952	0,9942
85	0,9932	0,9928	0,9918	0,9913	0,9914
91	0,9947	0,9907	0,9954	0,9937	0,9934
MÉDIA ±	0,9954 ±	0,9943 ±	0,9950 ±	0,9934 ±	0,9941 ±
DESVIO	0,0013	0,0020	0,0020	0,0022	0,0015

Fonte: autoria própria

Tabela 17 – Média das atividades de água do creme e sérum facial ao longo da estabilidade acelerada

Condição	Creme facial		Sérum facial	
	Controle (B)	CF (G)	Controle (B)	CF (G)
1 T °C ambiente	0,9962 ^{aa} ± 0,0035	0,9960 ^{aa} ± 0,0012	0,9940 ^{aa} ± 0,0025	0,9954 ^{aa} ± 0,0013
2 Estufa 40°C	0,9955 ^{aa} ± 0,0016	0,9960 ^{aa} ± 0,0011	0,9933 ^{aa} ± 0,0027	0,9943 ^{aa} ± 0,0020
3 T °C geladeira	0,9969 ^{aa} ± 0,0027	0,9964 ^{aa} ± 0,0018	0,9948 ^{aa} ± 0,0017	0,9950 ^{aa} ± 0,0020
4 Movimento	0,9951 ^{aa} ± 0,0018	0,9953 ^{aa} ± 0,0020	0,9943 ^{aa} ± 0,0026	0,9934 ^{aa} ± 0,0022
5 Fotoperíodo	0,9967 ^{aa} ± 0,0013	0,9961 ^{aa} ± 0,0014	0,9948 ^{aa} ± 0,0021	0,9941 ^{aa} ± 0,0015

Nota 1: Letras iguais na mesma linha ou coluna indicam que não houve diferença significativa conforme teste de Tukey

Os ingredientes da formulação, aspecto e textura do sérum facial conferem em dados de atividade de água um pouco inferiores quando comparado ao creme. Ainda assim, muito próximo do valor de 1,0, que se traduz como uma maior quantidade de água disponível. As diferentes condições, ao longo do tempo do ensaio, para ambas formulações – controle e com *G. sulphuraria* - não tiveram alterações significativas.

4.4.2.4 Análise de espalhabilidade

Os dados de espalhabilidade foram apresentados nas Tabelas 18 e 19 para o creme e sérum facial, respectivamente.

Tabela 18 – Espalhabilidade dos cremes controle e CF de *G. sulphuraria* ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada

Condição testada	Espalhabilidade cm ² .g ⁻¹	
	Controle (B)	CF (G)
1 – T °C ambiente	158,90 ^{aa} ± 22,39	163,09 ^{aa} ± 18,95
2 – Estufa 40°C	236,79 ^{aa} ± 11,51	200,12 ^{aa} ± 60,04
3 – T °C geladeira	171,59 ^{aa} ± 23,45	156,14 ^{aa} ± 20,40
4 – Movimento	152,97 ^{aa} ± 18,72	164,78 ^{aa} ± 16,95
5 –Fotoperíodo	153,83 ^{aa} ± 16,86	166,24 ^{aa} ± 25,80

Fonte: autoria própria

Nota 1: Letras iguais na mesma linha ou coluna indicam que não houve diferença significativa conforme teste de Tukey

Interpreta-se o resultado da espalhabilidade como a capacidade de um grama de amostra se espalhar em uma área de $x \text{ cm}^2$, conforme expressos na Tabela. As amostras do controle (B) e CF acondicionadas sob temperatura de 40°C (condição 2) apresentaram maior capacidade de se espalhar numa área em relação às demais amostras das condições testadas. Isso pode ser causado pela ação na elevada temperatura na redução da viscosidade do produto, também pontuada nas análises de aspecto.

O aumento da temperatura, diminui a consistência de uma emulsão, tornando-a mais líquida; com isso pequenas gotas dentro dessa mistura podem se colidir mais facilmente umas com as outras devido ao aumento de sua energia e a mistura torna-se mais fina, o que permite que as partículas internam se movam mais livremente, relata (GENTILE; CECATTO, 2023). Apesar disso, não foi observada separação de fase, bem como alterações mais significativas a ponto de diminuir a qualidade do produto.

Outro ponto observado: a adição do caldo fermentado de *G. sulphuraria* (CF) não provocou alterações expressivas na formulação, mantendo as amostras estáveis e dentro da conformidade com as amostras controle (B), confirmado pela análise estatística.

Tabela 19 - Espalhabilidade dos sérums controle e CF de *G. sulphuraria* ao longo do tempo de ensaio da estabilidade acelerada

Condição testada	Espalhabilidade $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	
	Controle (B)	CF (G)
1 – T $^\circ\text{C}$ ambiente	409,14 ^{ba} \pm 39,68	493,05 ^{aa} \pm 32,60
2 – Estufa 40°C	681,62 ^{ba} \pm 34,77	629,54 ^{aa} \pm 52,82
3 – T $^\circ\text{C}$ geladeira	467,62 ^{aa} \pm 79,01	549,04 ^{aa} \pm 43,43
4 – Movimento	522,53 ^{aba} \pm 16,65	584,58 ^{aa} \pm 36,22
5 – Fotoperíodo	567,70 ^{aba} \pm 25,36	644,44 ^{aa} \pm 28,16

Fonte: autoria própria

Nota 1: Letras iguais na mesma linha ou coluna indicam que não houve diferença significativa conforme teste de Tukey

Nota 2: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com teste de Tukey.

Nota 3: Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com teste de Tukey

Para as formulações de sérum facial, nas condições propostas no ensaio de estabilidade acelerada, a espalhabilidade não apresentou grandes variações para as amostras controle (B) e com adição do caldo fermentado *G. sulphuraria* (CF), exceto para condição 2 (estufa 40 °C). O mesmo comportamento ocorreu nessas formulações, assim como observado no creme facial. A temperatura elevada da condição 2 possivelmente provocou uma redução na viscosidade, o que aumentou a capacidade de espalhamento da amostra.

Comparando com o creme facial, o sérum possui maior capacidade de espalhamento, possivelmente em razão da sua menor quantidade de emulsificante e/ou espessante em relação ao creme. A espalhabilidade está inversamente relacionada à concentração do polímero, o que pode aumentar a repulsão entre as cadeias.(AULIFA et al., 2020) A consistência mais fluida, característica da formulação, permite o “deslizamento” do produto sobre a pele, promovendo maior espalhabilidade.

Por fim, a adição do ativo de *G. sulphuraria*, em geral, promoveu um aumento na espalhabilidade, mas não desestabilizou às emulsões e manteve a qualidade da formulação.

4.4.2.5 Análise microbiológica

Os dados obtidos em número de colônias em cada diluição foram convertidos para UFC.ml⁻¹ e a média dos valores foi apresentado nas Tabelas a seguir.

Tabela 20 – Análise microbiológica para bactérias a 35°C ao longo da estabilidade acelerada do creme facial

Condição/dias	Controle (B) / UFC.ml ⁻¹			CF (G) / UFC.ml ⁻¹		
	1	45	90	1	45	90
1 – T °C ambiente	<10 ³	3.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	5.10 ⁵	<10 ³
2 – Estufa 40°C	<10 ³	6.10 ⁶	<10 ³	<10 ³	5.10 ⁶	<10 ³
3 – T °C geladeira	<10 ³	5.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	2.10 ⁵	<10 ³
4 – Movimento	<10 ³	5.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	6.10 ⁵	<10 ³
5 –Fotoperíodo	<10 ³	7.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	8.10 ⁵	2.10 ⁵

Fonte: autoria própria

Legenda	UFC.ml ⁻¹ – Unidade formadoras de colônia por mL de amostra
----------------	--

A análise microbiológica para detectar a presença de bactérias mesófilas das formulações elaboradas demonstrou resultados variados, sem nenhum comportamento definido e contínuo. A amostragem do dia 1, para as amostras controle e com adição do ativo não apresentaram contagem de bactérias mesófilas nas diluições realizadas (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). A princípio, os dados do primeiro dia de análise não excedem os limites definidos pela RDC nº 752 de 19 de setembro de 2022 (ANVISA, 2022), de não mais que 10^3 UFC.ml⁻¹, com limite máximo igual a 5.10^3 UFC.ml⁻¹.

No entanto, vários fatores podem influenciar no resultado da contagem de microrganismos, tais como: preparação das formulações, contaminação proveniente dos ingredientes, coleta das amostras, bem como manuseio durante a análise. Diante disso, foram realizadas mais duas amostragens (meio e fim) do tempo de ensaio de estabilidade, tanto para acompanhar a qualidade microbiológica do produto, avaliar a influência do ativo adicionado, bem como alguma possível ação bactericida e/ou fungicida presente na formulação.

Além disso, para descartar a possibilidade de uma contaminação proveniente do caldo fermentado de *G. sulphuraria* (CF), o mesmo foi submetido às mesmas análises microbiológicas de mesófilos e fungos e leveduras nas três diluições

definidas. Como resultado, o ativo não apresentou contaminação, podendo-se descartar uma possível contaminação dos produtos pelo ativo testado.

Na análise de 45 dias, foi possível observar uma contaminação significativa nas amostras controle e com adição de CF de *G. sulphuraria*, ultrapassando em escala logarítmica os limites da legislação. Perante esse achado, vale ressaltar que, ao longo do teste de estabilidade, devido ao manuseio semanal das amostras, possíveis contaminações bacterianas podem ter ocorrido.

No entanto, as amostras de 90 dias apresentaram resultados de contaminação inferiores a 10^{-3} UFC.ml⁻¹, com exceção da amostra exposta a condição 5 (fotoperíodo). Ao final dos 90 dias, com resultados dentro dos limites da legislação e as demais análises em conformidade, pode-se prever que as formulações com o novo ativo proveniente do caldo fermentado de *G. sulphuraria* são estáveis e entregam qualidade ao longo do período proposto de estabilidade acelerada. Além disso, quaisquer contaminações microbianas ocorridas ao longo do estudo, provocariam alterações de pH (contaminação microbianas provocam acidificação do meio), aspecto e atividade de água.

Essa mudança positiva de contagem microbiana reforça a importância de conter na formulação agentes antimicrobianos, como o Hebeatol CG, presente na formulação. Além disso, pode-se levantar a hipótese que o ativo de *G. sulphuraria* possui propriedades antimicrobianas, o que torna o caldo fermentado um ativo multifuncional.

Tabela 21 - Análise microbiológica para Fungos e leveduras ao longo da estabilidade acelerada do creme facial

Condição/dias	Controle (B) / UFC.ml ⁻¹			CF (G) / UFC.ml ⁻¹		
	1	45	90	1	45	90
1 – T °C ambiente	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³
2 – Estufa 40°C	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	1.10 ³
3 – T °C geladeira	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³
4 – Movimento	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	5.10 ⁴	<10 ³

5 – Fotoperíodo	<10 ³	1.10 ³				
-----------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------------

Fonte: autoria própria

Os resultados para fungos e leveduras não apresentara contaminações para as diluições definidas, ao longo do período da estabilidade acelerada. Pontualmente, a amostragem da condição 4 (movimento) do dia 45, obteve contagem de 5.10⁴ UFC.ml⁻¹; possivelmente uma contaminação no manuseio da amostra durante a análise ou coleta.

Nas tabelas seguintes estão expressos os resultados de avaliação microbiológica para o sérum facial.

Tabela 22 - Análise microbiológica para Bactérias a 35 °C ao longo da estabilidade acelerada do sérum facial

Condição/dias	Controle (B) / UFC.ml ⁻¹			CF (G) / UFC.ml ⁻¹		
	1	45	90	1	45	90
1 – T °C ambiente	1.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	4.10 ⁵	<10 ³	<10 ³
2 – Estufa 40°C	8.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	1.10 ⁵	<10 ³	<10 ³
3 – T °C geladeira	2.10 ⁶	<10 ³	<10 ³	1.10 ³	1.10 ³	<10 ³
4 – Movimento	2.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	3.10 ²	<10 ³	<10 ³
5 – Fotoperíodo	1.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	2.10 ³	<10 ³	<10 ³

Fonte: autoria própria

Diferente do creme, as amostras do sérum facial já no dia 1 de análise, apresentaram contaminações por bactérias mesófilas nas três diluições definidas, com valores excedendo os limites da RDC nº 752 de 19 de setembro de 2022 (ANVISA, 2022). A presença dessa contaminação pode ser indicativa de falhas no manuseio ou até mesmo contaminação dos ingredientes, porém, nas amostragens de 45 e 90 dias, essas contaminações não foram observadas. Dessa forma, pode-se descartar a possibilidade de contaminações originadas dos ingredientes da formulação.

Com isso, as formulações do controle e com adição do CF de *G. sulphuraria* finalizam o período de estabilidade acelerada com contagens de bactérias mesófilas dentro do limite estabelecido por legislação. Esse dado, junto com os demais apresentados conferem a essa formulação qualidade e conformidade durante o tempo de estabilidade acelerada.

Tabela 23 - Análise microbiológica para Fungos e leveduras ao longo da estabilidade acelerada do sêrum facial

Condição/dias	Controle (B) / UFC.ml ⁻¹			CF (G) / UFC.ml ⁻¹		
	1	45	90	1	45	90
1 – T °C ambiente	7.10 ⁵	6.10 ⁵	1.10 ⁵	3.10 ³	<10 ³	<10 ³
2 – Estufa 40°C	6.10 ⁵	2.10 ⁵	1.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	<10 ³
3 – T °C geladeira	1.10 ⁵	6.10 ⁵	2.10 ⁴	2.10 ⁵	<10 ³	<10 ³
4 – Movimento	3.10 ⁵	1.10 ⁴	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³
5 – Fotoperíodo	6.10 ⁵	<10 ³	<10 ³	1.10 ⁵	<10 ³	<10 ³

Fonte: autoria própria

Para a contagem de fungos e leveduras, ao decorrer do tempo de estabilidade acelerada, foi possível observar contagem microbiana com mais frequência nas amostragens. Ressalta-se que, para as amostras controle, a contaminação perdurou ao longo do período de 90 dias para as condições 1, 2 e 3.

Já nas amostras com adição de CF de *G. sulphuraria*, tem-se uma redução da contagem de fungos e leveduras a partir dos 45 dias, fechando os 90 dias com contagens abaixo de 10³ UFC.ml⁻¹. Como relatado anteriormente, é possível que esse ativo microalgal tenha uma ação antimicrobiana, fungicida e/ou bactericida a ponto de reduzir a carga microbiana da formulação.

5 CONCLUSÃO

Nesse estudo pioneiro, foram avaliadas as frações intra (biomassa) e extracelular (caldo fermentado) do cultivo de *G. sulphuraria* sob condições heterotróficas, contendo amido de milho como fonte de carbono para seu crescimento. Foram analisadas a composição centesimal da biomassa extraída e a capacidade antioxidante e anti tirosinase da fração extracelular para fins cosméticos.

A avaliação do caldo fermentado, de forma inovadora, apresentou dados promissores em relação ao potencial antioxidante e presença de compostos fenólicos nessa fração, até então, pouco explorada. Em paralelo às análises de compostos bioativos, pode-se notar uma alta taxa da inibição da enzima tirosinase, atingindo percentuais médios de inibição máximos (100% inibição relativa) e maiores comparados ao padrão de mercado, ácido kójico.

Diante dos resultados encontrados da fração extracelular, abriu-se oportunidade para desenvolver formulações cosméticas com o ativo extraído do cultivo de *G. sulphuraria*. Os resultados de estabilidade acelerada puderam demonstrar que a adição do caldo fermentado dessa microalga não impactou na estabilidade e qualidade dos produtos formulados.

Com isso, esse estudo pioneiro pode-se abrir uma oportunidade para o uso concomitante das frações obtidas de *G. sulphuraria* em aplicações cosméticos na obtenção de uma formulação natural, com propriedades multifuncionais e com apelo sustentável.

Diante do exposto, o referido trabalho contribui na comunidade acadêmica para ampliar o campo de aplicação dessa microalga; esse é o primeiro relato do potencial antioxidante e anti tirosinase da fração extracelular de *Galdieria sulphuraria*, o que pode fornecer uma referência para futuros trabalhos nesse âmbito. Essa microalga poliextremófila torna-se uma possível candidata a novos ativos clareadores de pele.

REFERÊNCIAS

- ABIUSI, F. et al. Mixotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* for C-phycoerythrin and protein production. **Algal Research**, v. 61, n. December 2021, 2022.
- ABU-GHOSH, S. et al. Unconventional high-value products from microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v. 329, n. January, 2021.
- ALAM, M. A.; XU, J. L.; WANG, Z. **Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products**. Singapore: Springer Singapore, 2020.
- AMORIM, M. L. et al. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 12, p. 1976–2002, 2021.
- ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos - séries temáticas**. Brasília, DF, 2004.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria - RDC nº 752, 19 setembro de 2022**, 2022.
- ASHOKKUMAR, V.; RENGASAMY, R. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 394–399, 2012.
- ASHOORHA, M. et al. Kojic acid–natural product conjugates as mushroom tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 201, p. 112480, 2020.
- AULIFA, D. L. et al. Formulation of the serum gel containing green coffee bean (*Coffea robusta* L) extract as an antioxidant and tyrosinase enzyme inhibitor. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 2346–2351, 2020.
- BARBIER, G. et al. Comparative genomics of two closely related unicellular thermo-acidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbo. **Plant Physiology**, v. 137, n. 2, p. 460–474, 2005.
- BARSANTI, L. et al. Oddities and curiosities in the algal world. **NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology**, p. 353–391, 2008
- BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos, SP, 2010.
- BEN HLIMA, H. et al. Molecular and Structural Characterizations of Lipases from *Chlorella* by Functional Genomics. **Marine drugs**, v. 19, n. 2, p. 1–16, 2021.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239,

n. 1, p. 70–76, 1996.

BJORNSSON, W. J. et al. Pilot-scale supercritical carbon dioxide extractions for the recovery of triacylglycerols from microalgae: A practical tool for algal biofuels research. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 547–555, 2012.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Development and evaluation of physical stability from O/W lotions containing sunscreens. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 531–537, 2006.

BOTTONE, C. et al. Antioxidant and anti-proliferative properties of extracts from heterotrophic cultures of *Galdieria sulphuraria*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 11, p. 1659–1663, 2019.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 72, p. 248–254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL, B. DOS S. A. F. et al. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. **Algal Research**, v. 25, n. February, p. 76–89, 2017.

BREWER, C. E. et al. **Hydrothermal Liquefaction of *Galdieria sulphuraria* Grown on Municipal Wastewater**. 2017 Spokane, Washington July 16 - July 19, 2017. **Anais...**St. Joseph, MI: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2017.

CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 12, p. 982–985, 1994.

CANELLI, G. et al. Amino acid profile and protein bioaccessibility of two *Galdieria sulphuraria* strains cultivated autotrophically and mixotrophically in pilot-scale photobioreactors. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 84, n. January, p. 103287, 2023.

CARBONE, D. A. et al. Biomass and phycobiliprotein production of *Galdieria sulphuraria*, immobilized on a twin-layer porous substrate photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 7, p. 3109–3119, 2020.

CASELLA, P. et al. Purification of astaxanthin from microalgae by using commercial activated carbon. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, n. April, p. 295–300, 2020.

CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of The Total Environment**, v. 724, p. 138138, 1 jul. 2020.

CEFALI, L. C. et al. In vitro antioxidant activity and solar protection factor of blackberry and raspberry extracts in topical formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 539–544, 2019.

CHAIKLAHAN, R. et al. Polysaccharide extraction from *Spirulina sp.* and its antioxidant capacity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 73–78, 2013.

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CINIGLIA, C. et al. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 7, p. 1827–1838, 2004.

CURIEN, G. et al. Mixotrophic growth of the extremophile *Galdieria sulphuraria* reveals the flexibility of its carbon assimilation metabolism. **New Phytologist**, v. 231, n. 1, p. 326–338, 2021.

DA SILVA, T. F. et al. Desenvolvimento E Estudo De Estabilidade Físico-Química De Formulações Cosméticas Natienvelhecimento. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 107–113, 2019.

DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**, p. 253–271, 2019.

DEL MONDO, A. et al. Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 155–171, 2021.

DERI, B. et al. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–10, 2016.

DIANURSANTI; PRAKASA, M. B.; NUGROHO, P. The effect of adding microalgae extract *Spirulina platensis* containing flavonoid in the formation of Sunscreen towards cream stability and SPF values. **AIP Conference Proceedings**, v. 2255, 2020.

DINESHKUMAR, R. et al. Microalgae as Bio-fertilizers for Rice Growth and Seed Yield Productivity. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 5, p. 793–800, 2018.

ENDE, S. S. W.; NOKE, A. Heterotrophic microalgae production on food waste and by-products. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 3, p. 1565–1571, 2019.

EREN, A. et al. Genetic structure of *Galdieria* populations from Iceland. **Polar Biology**, v. 41, n. 9, p. 1681–1691, 2018.

FERNÁNDEZ-ACERO, F. J. et al. Valorisation of the microalgae *Nannochloropsis*

gaditana biomass by proteomic approach in the context of circular economy. **Journal of Proteomics**, v. 193, n. October 2019, p. 239–242, 2019.

GEADA, P. et al. Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology – Applications, techniques and future trends. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, n. November 2017, p. 656–668, 2018.

GENTILE, L. L.; CECATTO, A. P. Creme hidratante com extrato de calêndula: os benefícios da calêndula para a pele. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 6, p. 32022–32042, 18 dez. 2023.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 3, p. 210–221, 2011.

GOMES, C. et al. Biotechnology applied to cosmetics and aesthetic medicines. **Cosmetics**, v. 7, n. 2, p. 1–14, 2020.

GOYAL, N.; JEROLD, F. Biocosmetics: technological advances and future outlook. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 10, p. 25148–25169, 2023.

GRAVERHOLT, O. S.; ERIKSEN, N. T. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 69–75, 2007.

GRAZIANI, G. et al. Microalgae as human food: Chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. **Food and Function**, v. 4, n. 1, p. 144–152, 2013.

GRIVALSKÝ, T. et al. Development of thin-layer cascades for microalgae cultivation: milestones (review). **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 5, p. 603–614, 2019.

HAJIMAHMOODI, M. et al. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 43–50, 2010.

HAŁDYS, K.; LATAJKA, R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 378–389, 2019.

HAMED, I. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 6, p. 1104–1123, 2016.

HENKANATTE-GEDERA, S. M. et al. Removal of dissolved organic carbon and nutrients from urban wastewaters by *Galdieria sulphuraria*: Laboratory to field scale demonstration. **Algal Research**, v. 24, p. 450–456, 2017.

HU, Z. M. et al. Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. **Journal of Dermatological**

Science, v. 55, n. 3, p. 179–184, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1ª Edição Digital. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**, 2008.

JACKSON, B. A.; BAHRI, P. A.; MOHEIMANI, N. R. Repetitive extraction of botryococcene from *Botryococcus braunii*: a study of the effects of different solvents and operating conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 6, p. 3491–3501, 2019.

JI, K.; KIM, Y.; KIM, Y. T. A study on the tyrosinase inhibitory and antioxidant effect of microalgae extracts. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 49, n. 2, p. 167–173, 2021.

JU, X. et al. Effective and selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfothermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria*. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 759–764, 2016.

KANDA, H. et al. Wet extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane. **Fuel**, v. 105, p. 535–539, 2013.

KAWASHIMA, H.; UMEZAWA, M.; KIJIMA, M. Site-selective hydrosilylation of botryococcene - The algal biomass hydrocarbon oil. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 1, p. 273–276, 2018.

KAZI, M. A. et al. The Inhibitory Effect of Polyphenon 60 from Green Tea on Melanin and Tyrosinase in Zebrafish and A375 Human Melanoma Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.

KIM, J. H. et al. Beneficial effects of marine algae-derived carbohydrates for skin health. **Marine Drugs**, v. 16, n. 11, p. 1–20, 2018.

KIM, Y. J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 15, p. 1707–1723, 2005.

LAUCERI, R.; CHINI ZITTELLI, G.; TORZILLO, G. A simple method for rapid purification of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* and *Porphyridium cruentum* biomass. **Algal Research**, v. 44, n. May, p. 101685, 2019.

LEDWOŃ, P. et al. Tripeptides conjugated with thiosemicarbazones: new inhibitors of tyrosinase for cosmeceutical use. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 38, n. 1, p. 2193676, 2023.

LI, H. BIN et al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 771–776, 2007.

LI, J. et al. Recent advances in the design and discovery of synthetic tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 224, p. 113744, 2021.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043–1049, 2009.

LIM, J. K.; MIN, K.; PARK, W. K. Use of an extremophile red microalga (*Galdieria sulphuraria*) to produce phycocyanin from tangerine peel waste. **Bioresource Technology Reports**, v. 22, 2023.

LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. **Marine Drugs**, v. 14, n. 10, p. 1–19, 2016.

LU, L. et al. Heterotrophic growth and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* using glucose as a carbon source under different C/N ratios. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2017.

LU, Q. et al. Astaxanthin as a microalgal metabolite for aquaculture: A review on the synthetic mechanisms, production techniques, and practical application. **Algal Research**, v. 54, n. January, p. 102178, 2021.

MALTSEV, Y. et al. Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. **Biology**, v. 10, n. 10, p. 1–24, 2021.

MANSUR, J. DE S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria / Determination of sun protection factor by spectrophotometry. **An. bra. dermatol.dermatol.**, v. 61, n. 3, p. 121–124, 1986.

MARGRAF, T. et al. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2397–C2403, 2015.

MARKET RESEARCH. Global Natural Cosmetics Market 2023-2027. **Market Research**, 2023.

MARTINEZ-GARCIA, M. **Functional carbohydrates from the red microalga *Galdieria sulphuraria***. University of Groningen, 2017.

MARTINEZ-GARCIA, M.; KORMPA, A.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C. The glycogen of *Galdieria sulphuraria* as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 75–82, 2017.

MARTINEZ-GARCIA, M.; STUART, M. C. A.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C. Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* and comparison with other glycogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 12–18, 2016.

MARTÍNEZ-RUIZ, M. et al. Microalgae Bioactive Compounds to Topical Applications Products—A Review. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 1–22, 2022.

MARTINS, R. et al. Food Wastes and Microalgae as Sources of Bioactive Compounds

and Pigments in a Modern Biorefinery: A Review. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 1–27, 2023.

MASSA, M. et al. Biochemical composition and in vitro digestibility of *Galdieria sulphuraria* grown on spent cherry-brine liquid. **New Biotechnology**, v. 53, n. March 2018, p. 9–15, 2019.

MINODA, A. et al. Recovery of rare earth elements from the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria* using aqueous acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1513–1519, 2015.

MORIMOTO, D.; YOSHIDA, T.; SAWAYAMA, S. Draft Genome Sequence of the Astaxanthin-Producing Microalga *Haematococcus lacustris* Strain NIES-144. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 23, p. 1–2, 4 jun. 2020.

MOROCHO-JÁCOME, A. L. et al. (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 22, p. 9513–9522, 2020.

MOURELLE, M. L.; GÓMEZ, C. P.; LEGIDO, J. L. The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. **Cosmetics**, v. 4, n. 4, 2017.

MOUSAVIAN, Z. et al. Characterization, antioxidant and anticoagulant properties of exopolysaccharide from marine microalgae. **AMB Express**, v. 12, n. 1, 2022.

MUNHOZ, A. J. et al. **Desenvolvimento de uma formulação de água micelar com extrato de *Galdieria sulphuraria***. 2021. 94 pg. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, PR, 2021.

NOVAK, A. C. **Potencial Cosmético dos esporos de *Ganoderma lucidum***. 2013. 121 pg. Tese - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2013.

NOVAK, A. C.; SYDNEY, E. B.; SOCCOL, C. R. Biocosmetics. In: **Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals**. New York, NY: Springer New York, 2014. v. 9781461480p. 389–411.

OCCHIPINTI, P. S. et al. Valorisation of buttermilk in mixotrophic and heterotrophic conditions by using the acidophilic strain *Galdieria sulphuraria*. **Journal of Applied Phycology**, v.1, 2023.

ORTIZ-RUIZ, C. V. et al. Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 82, n. 2, p. 115–122, 2016.

PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A. Natural and bioinspired phenolic compounds as tyrosinase inhibitors for the treatment of skin hyperpigmentation: Recent advances. **Cosmetics**, v. 6, n. 4, 2019.

PATIL, B. S. et al. Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8142–8160, 2009.

PENG, Z. et al. A systematic review of synthetic tyrosinase inhibitors and their structure-activity relationship. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 15, p. 4053–4094, 2022.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; JUNG, S. H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. **Cellular Signalling**, v. 40, n. September, p. 99–115, 2017.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; NAMASIVAYAM, V. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 403–425, 2017.

PLEISSNER, D.; LINDNER, A. V.; HÄNDEL, N. Heterotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* under non-sterile conditions in digestate and hydrolyzed straw. **Bioresource Technology**, v. 337, 2021.

PORTILLO, F. V. L. et al. Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy. **Algal Research**, v. 65, 2022.

RAHMAN, D. Y.; SARIAN, F. D.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C. Biomass and phycocyanin content of heterotrophic *Galdieria sulphuraria* 074G under maltodextrin and granular starches–feeding conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 1, p. 51–57, 2020.

RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

RAZZAK, S. A. et al. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. February, p. 379–390, 2017.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. November 2017, p. 394–404, 2018.

SAFAFAR, H. et al. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015.

SAHIN, S. C. The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 236–243, 2018.

SAKURAI, T. et al. Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Bioresource**

Technology, v. 200, p. 861–866, 2016.

SALBITANI, G. et al. Sulfur Starvation in Extremophilic Microalga *Galdieria sulphuraria*: Can Glutathione Contribute to Stress Tolerance? **Plants**, v. 11, n. 4, p. 1–13, 2022.

SAYRE, R. M. et al. a Comparison of in Vivo and in Vitro Testing of Sunscreening Formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, n. 3, p. 559–566, 1979.

SCHALKA, S.; DOS REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: Significado e controvérsia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507–515, 2011.

SCHMIDT, R. A.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 77–84, 2005.

SEARLE, T.; AL-NIAIMI, F.; ALI, F. R. The top 10 cosmeceuticals for facial hyperpigmentation. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 6, 2020.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113–136, 2008.

SHEN, C. T. et al. Purification of algal anti-tyrosinase zeaxanthin from *Nannochloropsis oculata* using supercritical anti-solvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 955–962, 2011.

SINGH, J.; DHAR, D. W. Overview of carbon capture technology: Microalgal biorefinery concept and state-of-the-art. **Frontiers in Marine Science**, v. 6, n. FEB, p. 1–9, 2019.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1 jan. 1965.

SLOTH, J. K. et al. Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on substrates made of food waste from restaurants and bakeries. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 296–305, 2017.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

SYDNEY, E. B. et al. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5892–5896, 2010.

SYDNEY, E. B. et al. Biomolecules from extremophile microalgae: From genetics to bioprocessing of a new candidate for large-scale production. **Process Biochemistry**, v. 87, n. May, p. 37–44, 2019.

TANNIN-SPITZ, T. et al. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga

Porphyridium sp. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 3, p. 215–222, 2005.

THIELEMANN, A. K.; SMETANA, S.; PLEISSNER, D. Cultivation of the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on food waste: A Life Cycle Assessment. **Bioresource Technology**, v. 340, n. July, p. 125637, 2021.

TSE, T. W. Hydroquinone for skin lightening: Safety profile, duration of use and when should we stop? **Journal of Dermatological Treatment**, v. 21, n. 5, p. 272–275, 2010.

VAN VOORHIES, W. et al. Evaluation of a thermo-tolerant acidophilic alga, *Galdieria sulphuraria*, for nutrient removal from urban wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 395–399, 2014.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 789–807, 2011.

VILLARÓ, S. et al. Microalgae derived astaxanthin: Research and consumer trends and industrial use as food. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2021.

VUPPALADADIYAM, A. K. et al. Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 2, p. 304–324, mar. 2018.

WAN, M. et al. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 272–278, 2016.

WAN, M. et al. Comparison of C-phycocyanin from extremophilic *Galdieria sulphuraria* and *Spirulina platensis* on stability and antioxidant capacity. **Algal Research**, v. 58, n. June, p. 102391, 2021.

WOLLMANN, F. et al. Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 12, p. 860–871, 2019.

YADAVALLI, R. et al. Simultaneous production of astaxanthin and lipids from *Chlorella sorokiniana* in the presence of reactive oxygen species: a biorefinery approach. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 3, p. 881–889, 2022.

YARKENT, Ç.; GÜRLEK, C.; ONCEL, S. S. Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, n. February, 2020.

YU, M. et al. Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 139–150, 2019.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals** *Food Chemistry*, 1999.

ZIMERMANN, J. D. F. **Cultivo da microalga *Galdieria sulphuraria* em permeado**

de soro de leite. Dissertação - Departamento de Engenharia Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Ponta Grossa, PR, 2019.

ZIMERMANN, J. D. F. et al. Growth kinetics, phenolic compounds profile and pigments analysis of *Galdieria sulphuraria* cultivated in whey permeate in shake-flasks and stirred-tank bioreactor. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101598, dez. 2020.