

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA CARRIEL PONTES

**PROBIÓTICOS VIABILIZADOS EM MATRIZ AUTOPRESERVANTE PARA
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

PONTA GROSSA

2022

RAFAELA CARRIEL PONTES

**PROBIÓTICOS VIABILIZADOS EM MATRIZ AUTOPRESERVANTE PARA
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

Probiotics made viable in a self-preserving matrix for cosmetic application

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr. Alessandra C. Novak Sydney.

PONTA GROSSA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

RAFAELA CARRIEL PONTES

**PROBIÓTICOS VIABILIZADOS EM MATRIZ AUTOPRESERVANTE PARA
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 29 de junho de 2022

Alessandra Cristine Novak Sydney
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Maria Carolina de Oliveira Ribeiro
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Luis Alberto Chavez Ayala
Mestre
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PONTA GROSSA

2022

Dedico este trabalho aos meus pais, Vagner e Adriana, por serem meus maiores apoiadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por me ouvir, consolar e apoiar. E principalmente pelo suporte.

Agradeço a minha orientadora Prof.(a) Dr.(a) Alessandra C. Novak Sydney, por me orientar durante todo o curso. Ao Prof. M.e Luis Alberto Chavez Ayala, por me fazer as perguntas certas que tornaram esse trabalho possível, e à Prof.(a) Dr.(a) Maria Carolina de Oliveira Ribeiro pelo suporte técnico na execução desse trabalho.

A minha amiga Larissa, a quem sempre me ajudou e me trouxe esperança nessa trajetória.

E à música, que torna a vida uma experiência única, extraordinária e mágica.

Tente.
Levante sua mão sedenta e recomece a andar.
Não pense que a cabeça aguenta se você parar.
Tente outra vez.
(SEIXAS; SOUZA; MOTTA, 1975).

RESUMO

A aplicação de microrganismos probióticos para a manutenção e melhoria da saúde humana vem sendo muito estudada. Assim, tem sido elucidados os mecanismos e comprovado seu potencial em competir com patógenos, possuir ação anti-inflamatória, bem como influenciar a reconstrução e melhora da barreira da pele. Além disso, o uso dos mesmos microrganismos presentes na microbiota intestinal em aplicação tópica tem mostrado resultados promissores. Estudos como esse embasam a utilização de moléculas produzidas por probióticos como tratamento para uma série de distúrbios cutâneos, e já se encontram no mercado como fórmulas comerciais. Apesar disso, o estudo da entrega desses bioativos em veículos vivos ainda vem sendo investigado. O objetivo deste trabalho foi analisar a viabilização do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* comercial em uma formulação cosmética. Foi testado a formulação de um cosmético combinado com diferentes estratégias de imobilização e comparando diferentes conservantes para inibição do crescimento microbiano e melhor adaptação do probiótico. A melhor combinação foi a utilização direta de uma cepa comercial liofilizada aplicada diretamente no gel e combinada com os conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio. Obteve-se a contagem celular de $6,3 \cdot 10^3$ UFC /ml permitindo viabilizar, uma formulação cosmética minimalista capaz de manter células reservadas dentro dela em temperatura ambiente.

Palavras-chave: probiótico; cosmético; viabilidade.

ABSTRACT

The application of probiotic microorganisms for the maintenance and improvement of human health has been extensively studied. Thus, the mechanisms have been elucidated and its potential to compete with pathogens, have anti-inflammatory action, as well as influence the reconstruction and improvement of the skin barrier has been proven. In addition, the use of the same microorganisms present in the intestinal microbiota in topical application has shown promising results. Studies like this support the use of molecules produced by probiotics as a treatment for a series of skin disorders and are already on the market as commercial formulas. Despite this, the study of the delivery of these bioactive in live vehicles is still being investigated. The objective of this work was to analyze the feasibility of the commercial probiotic microorganism *Lactobacillus acidophilus* in a cosmetic formulation. The formulation of a minimalist gel was tested combined with different immobilization strategies and comparing different preservatives for inhibition of microbial growth and better adaptation of the probiotic. The best combination was the direct use of a commercial lyophilized strain applied directly to the gel and combined with the preservative's potassium sorbate and sodium benzoate. A cell count of $6,3 \cdot 10^3$ UFC /ml was obtained, allowing a minimalist cosmetic formulation capable of keeping reserved cells inside it at room temperature.

Keywords: probiotic; cosmetic; viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 - Demonstração de uma infecção/ Inflamação da pele | 21 |
| Figura 2 - Restauração do equilíbrio para uma pele saudável | 21 |
| Fotografia 1 - Representação de uma das placas que apresentaram crescimento | 35 |
| Quadro 1 - Parâmetros que influenciam a estabilidade e viabilidade de um probiótico..... | 22 |
| Quadro 2 - Características desejáveis para matriz ou suporte selecionado para imobilizar células microbianas | 24 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 - Composição gel | 29 |
| Tabela 2 - Imobilização celular..... | 30 |
| Tabela 3 - Composição gel e conservantes | 31 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | Objetivo geral | 16 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 16 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 | Vocabulário de pesquisa: compreendendo o que é microbiota e como é definida | 17 |
| 3.2 | Probiótico e pós-biótico | 18 |
| 3.2.1 | O que a ANVISA classifica como probiótico | 18 |
| 3.2.2 | Doenças relacionadas ao desequilíbrio da microbiota da pele ou couro cabeludo e tratamentos alternativos..... | 19 |
| 3.3 | Potenciais do <i>Lactobacillus acidophilus</i> como probiótico de uso tópico | 20 |
| 3.4 | Desafio da viabilização do microrganismo vivo em matriz alimentícia e cosmética | 22 |
| 3.5 | Estratégias e técnicas de imobilização celular aplicadas em probióticos | 23 |
| 3.6 | Encapsulamento e aprisionamento em matriz porosa | 25 |
| 3.6.1 | Matriz gelatinosa autopreservante..... | 26 |
| 4 | METODOLOGIA | 27 |
| 4.1 | Formulação cosmética e os ingredientes de interesse | 27 |
| 4.1.1 | Água | 27 |
| 4.1.2 | Carbopol 940..... | 27 |
| 4.1.3 | Conservante | 28 |
| 4.1.4 | Princípio ativo..... | 28 |
| 4.2 | Triagem: Cultivo do <i>Lactobacillus acidophilus</i> e estratégias de imobilização | 29 |
| 4.2.1 | Preparo do gel | 29 |
| 4.2.2 | Células Imobilizadas..... | 30 |
| 4.2.3 | Adição das células liofilizadas em gel | 31 |
| 4.3 | Cultivo do <i>Lactobacillus acidophilus</i> em gel | 31 |
| 4.3.1 | Cultivo em gel, utilizando diferentes conservantes..... | 31 |
| 4.3.2 | Quantificação de células viáveis..... | 32 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 33 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.1 | Testes preliminares..... | 33 |
| 5.2 | Contagem de células viáveis..... | 34 |
| 6 | CONCLUSÃO | 37 |
| | REFERÊNCIAS..... | 38 |

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por biotecnologia o uso de organismos vivos para solucionar problemas e desenvolver produtos com aplicação em inúmeras áreas, tais como: farmácia, alimentos, agronomia, química e outras, através da transformação de matéria prima e assim melhorar a forma como vivemos através da inovação (SILVA; MALTA, 2017).

Devido a versatilidade dos produtos obtidos biotecnologicamente, existe empregabilidade da biotecnologia em produtos cosméticos aplicados em inúmeras fórmulas e produtos (EMILIANO; GUIMARÃES; NETZ, 2012).

Um exemplo disso é a goma xantana, produzida por fermentação, amplamente utilizada na indústria devido a sua capacidade de modificar a reologia de shampoos e loções. Outro uso comum é o de enzimas, como é o caso da papaína, que além de auxiliar no processo digestivo humano, pode ser aplicada também em esfoliantes e *peelings* devido a sua capacidade de remover as células mortas da camada córnea da pele (SALLVE, 2019).

Além disso, existem cosméticos que visam tratar doenças que afetam a pele, causam algum dano a derme ou a camadas profundas e que tragam dores, alergias, inflamações. Estudos indicam que algumas dessas doenças não contagiosas estão relacionadas a microbiota local (como dermatite atópica, dermatite seborreica, psoríase e acne), definida pelas comunidades microbianas complexas presentes naquele espaço e vivendo em equilíbrio para a manutenção e a fisiologia do meio em que estão inseridas, em uma relação íntima entre o comensal e o hospedeiro. A composição dessas comunidades depende de fatores como a característica da pele, umidade, temperatura, sebo, além de fatores genéticos e ambientais. Existem inúmeras espécies distintas e comunidades complexas habitando cada centímetro quadrado de pele exposta, além dos microrganismos vivendo em nosso interior (POLAK-WITKA *et al.*, 2020; SIVIERI *et al.*, 2021).

A microbiota da pele pode estar relacionada não somente ao desequilíbrio e a doenças, como também contribuem para a saúde dermatológica, sendo considerada também um ponto de partida para a compreensão da resposta imune da pele (BEATO, 2017). A modificação do meio, o aumento ou diminuição de uma determinada população podem desencadear uma disbiose no ambiente, desencadeando uma possível resposta ao desequilíbrio (FARIA *et al.*, 2020).

Pesquisas que indicam que o estilo de vida moderno, aliado ao uso excessivo de cosméticos, mesmo aqueles inofensivos como uma rotina de *skin care* utilizando sabonete, *cleanser*, controladores de oleosidade, antimicrobianos, antiacne, tonificantes e esfoliantes podem atuar na contramão, como fator de risco de incidência e progressão de doenças de pele como a rosácea ou acne (TAO; LI; WANG, 2021).

Aliado a isso, surgem teorias como a *hygiene hypothesis* que sugere que o aumento de doenças autoimunes, alergias e doenças de pele em países em desenvolvimento ou ricos e com estilo de vida extremamente voltados para a eliminação de microrganismos, inclusive aqueles que cooperam para a formação do sistema imunológico humano, tornando esses indivíduos mais suscetíveis às doenças listadas (OKADA *et al.*, 2010).

Outra teoria recorrente, é a de que os conservantes utilizados para proteger formulações cosméticas, controlar a oxidação de muitos ativos e inibir o crescimento de microrganismos indesejados pode afetar de alguma forma a saúde humana. Apesar disso, esses conservantes estão presentes em diversas formulações com um propósito muito claro, inibir a proliferação de microrganismos capazes de deteriorar a formulação, aumentando assim o seu tempo de prateleira e conseqüentemente suportar períodos maiores, garantindo sua estabilidade e mantendo suas propriedades inatas pelo maior tempo possível (BEATO, 2017). Conservantes de amplo espectro são eficazes contra inúmeros microrganismos, mas poderiam eles combater também os da microbiota da pele, que estão ali apenas contribuindo para o equilíbrio do meio? (MURPHY *et al.*, 2021).

Paralelamente, essa situação pode ser contornada realizando a suplementação da microbiota local. Seja utilizando fontes e alimentos que proporcionem um ambiente favorável, aumentando a população dos microrganismos minoritários ou até mesmo inibindo o crescimento de patógenos no meio. Tudo isso, pensando em restabelecer o equilíbrio biótico daquela comunidade. Nesse ponto pode-se introduzir o conceito de probiótico, que por definição “são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” termo que deve ser restrito aos microrganismos testados e com resultados que comprovem sua ação (KNACKSTEDT; KNACKSTEDT; GATHERWRIGHT, 2020; ISAPP, 2019).

Existem inúmeros estudos investigando a aplicação tópica de probióticos para diversas condições de pele, incluindo dermatites, acne ou alergias, inclusive partindo de grandes indústrias cosméticas (BEATO, 2017). A complexidade da relação microbiana e hospedeiro é inegável e pensando nisso, esse trabalho visa viabilizar a aplicação de microrganismos vivos imobilizados através de uma matriz polimérica autopreservante com aplicação cosmética. Assim, o produto biotecnológico poderá ser, no futuro, manufaturado pela indústria cosmética para compor produtos que final possa ser no futuro, manufaturado pela indústria cosmética para compor produtos que objetivem a manutenção de uma microbiota saudável,

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elaborar uma metodologia de manutenção da bactéria láctea viável sem resfriamento para aplicação em formulações cosméticas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar técnicas de imobilização microbiana que melhor se empregam para prevenir o crescimento microbiano durante o armazenamento.
- Comparar a concentração de diferentes conservantes e a influência no crescimento do *Lactobacillus acidophilus*.
- Comparar o crescimento de células livres e imobilizadas.
- Aplicar os resultados obtidos para desenvolver uma formulação utilizando probiótico ou pós-biótico com aplicação cosmética.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Vocabulário de pesquisa: compreendendo o que é microbiota e como é definida

Sabe-se que a pele atua como barreira física exercendo diversas funções como a proteção de fluidos, termorregulação, respostas imunes, funções neurosensoriais, funções metabólicas e proteção primária contra infecções. Os microrganismos presentes na superfície da pele estão ali, competindo com patógenos agressivos que consomem sebo, ácido graxos e proteínas. Ou seja, funcionam como uma linha de defesa, que vamos chamar de microbiota (CINQUE *et al.*, 2011).

O primeiro passo para compreender a linha de raciocínio desse projeto, é compreender o termo microbiota, que está comumente associado a alimentação e ao trato digestivo (ABBOTT, 2016). E aqui fazemos referência a populações de bactérias, fungos, arqueias, protozoários e vírus que colonizam um ambiente específico em um determinado tempo (TORRES, 2021). Esses organismos podem ser encontrados no couro cabeludo, axila, fezes, boca, pele, intestino e em toda a extensão do corpo humano (LOOI, 2020).

Por definição, microbiota descreve a composição e tamanho das comunidades microbianas, habitantes do corpo humano ou o meio ambiente, com residência permanente ou não (MARCHESI; RAVEL, 2015). Podendo ser dividida em a) transitória (microrganismos que não residem o ambiente ou estabelecem uma colonização significativa) e b) residente, aqui consideramos os microrganismos que colonizam o organismo em condições de simbiose com o hospedeiro (SIVIERI *et al.*, 2021). O censo microbiano é dado através de análises genômicas, onde os genes são amplificados e sequenciados a partir de uma amostra biológica. O avanço das plataformas analíticas de DNA, biomoléculas através da bioinformática possibilita hoje definir e catalogar a composição, estrutura, algumas funções dessas comunidades microbianas que habitam o corpo humano (MARCHESI; RAVEL, 2015).

Apesar da ciência ter uma noção de quais microrganismos estão presentes em cada ambiente, a composição da microbiota varia de acordo com fatores genéticos, idade, dieta, fatores ambientais, uso de medicamentos e estado de saúde do hospedeiro. Essa variação pode ser um indicativo de influência no metabolismo do hospedeiro e até mesmo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas, inflamatórias, imunológicas, neurológicas ou psíquicas (OTTOMAN *et al.*,

2012). Tudo isso ocorre através de interações complexas entre nutrientes e microrganismos, que regem resultados benéficos ou prejudiciais ao hospedeiro sendo necessária abordagens personalizadas que se encaixem em cada contexto clínico (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

O corpo é composto por glândulas, repletas de sais, glicose, vitamina, aminoácidos, fornecendo a dieta perfeita a esses pequenos habitantes nativos que estão em constante parceria conosco. Sendo capazes de suportar e sobreviver em diferentes condições (LOOI, 2020).

3.2 Probiótico e pós-biótico

Muitos produtos existentes no mercado classificam de maneira errada o que é um probiótico. Algumas vezes o produto é vendido como probiótico pela mera ilustração do nome, já que é fácil de compreender. Entretanto, por definição temos três diferentes classificações, que ajudam a diferenciar os produtos existentes no mercado:

Quando falamos de probiótico, fazemos referência ao microrganismo ou grupo vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro, termo restrito a microrganismos que foram testados e demonstraram trazer benefícios à saúde (ISAPP, 2019).

O segundo tópico são os prebióticos, que nesse caso servem como fonte de nutriente, definidos como “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo um benefício à saúde”, tipos de fibra solúvel que o corpo humano não consegue digerir, que servem como nutriente para microrganismos benéficos que já vivem em seu cólon ou em outras partes do corpo (PATEL; DENNING, 2013; CARP, 2018; ISAPP, 2019).

Para completar, a ISAPP define pós-biótico como preparação de microrganismos inanimados ou seus componentes que confere um benefício à saúde do hospedeiro (ISAPP, 2021).

3.2.1 O que a ANVISA classifica como probiótico

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde. Esses microrganismos pertencem a

diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como de leveduras. No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer avaliação prévia da Anvisa, segundo requisitos da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 241/2018 (BRASIL, 2018).

A quantidade mínima viável de probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação do produto, valores menores podem ser aceitos desde que a empresa comprove sua eficácia (BRASIL, 2018).

3.2.2 Doenças relacionadas ao desequilíbrio da microbiota da pele ou couro cabeludo e tratamentos alternativos

Algumas doenças estão relacionadas ao desequilíbrio da microbiota da pele, ou seja, apresentam a escassez ou excesso de um microrganismo de maneira diferente do que uma microbiota saudável.

Mudanças como perda de água transepidérmica, sebo e pH podem afetar a composição da microbiota e causar caspa. Um exemplo de teoria é que o sebo é necessário para proteger a pele e também suportar o crescimento da *Malassezia*, entretanto ao alterar o pH pode-se favorecer o aumento de *Staphylococcus spp.* (especialmente do *S. aureus*) e influenciar enzimaticamente no comprometimento da pele (LIN *et al.*, 2021), ajudando na hidrólise do sebo e garantindo nutriente para a *Malassezia*.

Nessa interrelação, em condições normais o *Staphylococcus epidermidis* e o *Staphylococcus hominis* podem agir liberando substâncias antimicrobianas que impedem o crescimento do *Staphylococcus aureus*, dissolvendo proteínas necessárias para formação de biofilme. Mas em situações de desequilíbrio essas bactérias podem agir permitindo a fixação desse patógeno. De maneira complementar, o desequilíbrio de *Cutibacterium spp.* pode induzir a agregação *S. aureus* (POLAK-WITKA *et al.*, 2020).

Muitos tratamentos para caspa (dermatite seborreica leve) envolvem a utilização de agentes antifúngicos e anti-inflamatórios, o que permite reduzir a contagem de *Malassezia* (associada a caspa) e reduzir o processo inflamatório causado pelo fungo que desencadeia possíveis reações em cascata que aumentam o sebo (WIKRAMANAYAKE *et al.*, 2019; KIM, 2009).

Esses tratamentos abordam apenas parte do problema, sem considerar a relação sistêmica entre as comunidades presentes naquele ambiente, podendo ser insustentável ou pouco efetivo a longo prazo e além disso, não considera restaurar o equilíbrio do sistema e fortalecer a pele danificada, ignorando o papel da microbiota da pele que impede a colonização de patógenos indesejados (DRÉNO *et al.*, 2016).

Além disso, existem relatos de que alguns *Lactobacillus* podem competir diretamente com patógenos da pele inibindo a adesão e produzindo metabólitos antimicrobianos (sem contar nos benefícios anti-inflamatórios e de restauração da barreira da pele), sendo uma alternativa promissora no desenvolvimento de produtos e tratamentos para doenças que afetam a pele e o couro cabeludo (DELANGHE *et al.*, 2021).

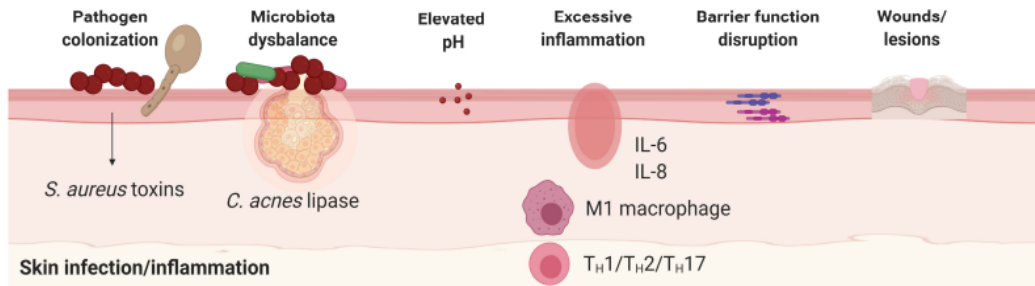
3.3 Potenciais do *Lactobacillus acidophilus* como probiótico de uso tópico

Existem estudos que apresentam o *Lactobacillus acidophilus* como uma alternativa para inibição do crescimento de diversos patógenos e sua suplementação pode devolver e regular o equilíbrio, trazer a homeostase da pele, tratar de inflamações e entre outros (CINQUE *et al.*, 2011).

As bactérias láticas, como as do gênero *Lactobacillus*, metabolizam o substrato produzindo ácido lático como produto. As diferentes espécies usam seus próprios mecanismos na diminuição de pH, inibindo o crescimento de e competindo com eles (CINQUE *et al.*, 2011).

A literatura sugere que cepas comprovadamente aprovadas como probióticas de *Lactobacillus* podem competir diretamente com os patógenos, impedindo a adesão e produzindo de peptídeos antimicrobianos e bacteriocinas capazes de suprimir inúmeros patógenos. Além disso, essa capacidade antimicrobiana foi descrita para *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* (DELANGHE *et al.*, 2021). A figura 1 mostra uma pele danificada e com patógenos invasores.

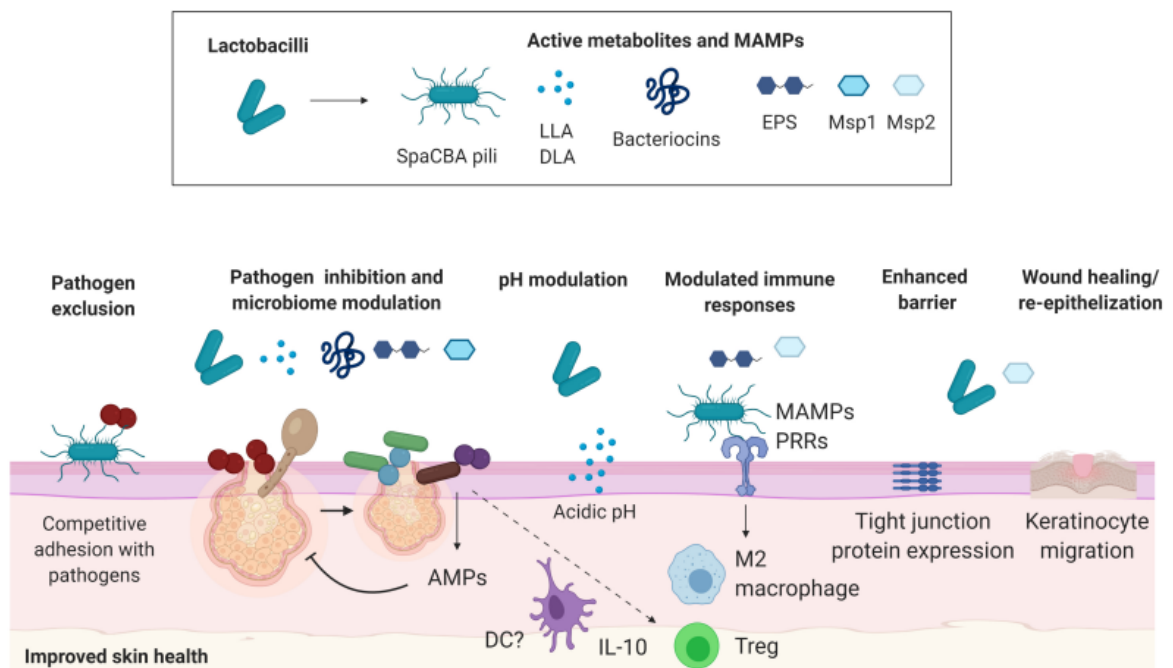
Figura 1 - Demonstração de uma infecção/ Inflamação da pele



Fonte: Adaptado de DELANGUE *et al.* (2021).

A figura 1 demonstra a alteração do pH que permite a alteração e aumento da contagem da *S. aureus*, que está trabalhando na degradação de sebo. Ao passo que o nível de o aumento do nível de *C. acnes* incentiva a produção de sebo e a fixação da *S. aureus*. Junte isso a um aumento na inflamação, provavelmente desencadeado por uma série de reações de defesa, somado a uma pele danificada e lesionada, esse cenário completo compõe uma pele que sofre com infecção. A figura 2, em contrapartida mostra o mecanismo de ação dos *Lactobacillus* na restauração do equilíbrio.

Figura 2 - Restauração do equilíbrio para uma pele saudável



Fonte: Adaptado de DELANGUE *et al.* (2021).

No caso da figura 2, podemos ver os ativos e metabólitos, o *SpaCBA pili* que permite aderir e competir com os patógenos, as moléculas receptoras e de reconhecimento, as bacteriocinas inibindo a modulação dos patógenos. Ao mesmo tempo, moléculas estão modulando a resposta imune, ajudando na reestruturação da barreira se juntando e movendo os queratinócitos. Ou seja, operando em um trabalho multifatorial e cumulativo.

3.4 Desafio da viabilização do microrganismo vivo em matriz alimentícia e cosmética

Atualmente, os probióticos encontrados na forma comercial como suplementos alimentares ou alimentos (entregues no formato de iogurtes, leites fermentados, sorvetes, queijos e entre outro). A viabilização celular desses probióticos é feita precisa garantir a estabilidade e segurança do produto durante a estocagem. Sendo capaz de fornecer substratos necessários para a fermentação, como açúcares e proteínas (SIQUEIRA; CERIOILLI; ARNO, 2021; FERREIRA, 2012).

Os alimentos lácteos são amplamente utilizados como veículos de bactérias probióticas, tendo boa aceitação comercial e permitindo conservar e viabilizar os níveis probióticos do alimento durante a estocagem e na entrega do ativo no suco gástrico (funcionando como protetor celular) (SIQUEIRA; CERIOILLI; ARNO, 2021).

Para manter os microrganismos probióticos viáveis, são considerados alguns fatores que influenciam a viabilidade de microrganismos probióticos em produtos lácteos durante a produção, o processamento e o armazenamento. Alguns parâmetros são responsabilidade do alimento, outros do processo, outros microbiológicos ou causados pela adição de aditivos (SIQUEIRA; CERIOILLI; ARNO, 2021). Como pode ser ilustrado no quadro 1:

Quadro 1 - Parâmetros que influenciam a estabilidade e viabilidade de um probiótico

| Parâmetros do Alimento | Parâmetros do Processo | Parâmetros Microbiológicos |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| pH | Tratamento térmico | Cepas probióticas |
| Acidez titulável | Temperatura de incubação | Taxa e proporção de inoculação |
| Oxigênio molecular | Taxa de resfriamento | Concentração de metabólitos |
| Atividade da água | Embalagem | |

| | | |
|---|-------------|--|
| Presença de sal, açúcar, ou aditivos químicos | Armazenagem | |
|---|-------------|--|

Fonte: Adaptado de SIQUEIRA; CERIOLLI; ARNO, 2021

A temperatura de fermentação também é um dos fatores importantes que afetam a viabilidade dos microrganismos probióticos. Temperaturas mais baixas reduzem o crescimento microbiano e permitem uma sobrevivência mais longa (SIQUEIRA; CERIOLLI; ARNO, 2021). Todas as estratégias são consideradas pensando em manter recursos indispensáveis para a manutenção da vida celular durante a estocagem.

Entretanto, quando o assunto são probióticos em cosméticos, a viabilização ainda vem sendo estudada e ainda existem muitas incógnitas sobre durabilidade, segurança e funcionamento a longo prazo. Além disso, uma matriz cosmética é muito diferente de um alimento, conta com ativos químicos isentos de nutrientes essenciais para a manutenção celular, e o mercado consumidor possui pouca afinidade ao armazenamento a frio do produto. Fazendo com que a estratégia de entrega ao consumidor seja diferente da que é empregada por exemplo, por um iogurte. Devido a essa dificuldade de implementação de um probiótico em matriz cosmética, esse trabalho estudará diferentes estratégias de manutenção e viabilização celular que permitam a entrega de um microrganismo probiótico de maneira controlada através de uma matriz cosmética.

Ainda não existe regulamentação ou legislação que adeque a aplicação de probióticos em cosméticos (FERREIRA, 2012). Dessa forma, esse trabalho adotou o comparativo estabelecido para alimentos, visto que não existe uma regulamentação para probióticos viabilizados em cosméticos.

3.5 Estratégias e técnicas de imobilização celular aplicadas em probióticos

Temas como saúde, microbiota e bem-estar aumentaram a demanda por produtos que entreguem seu potencial integralmente, no ramo dos probióticos muito se fala sobre microrganismos imobilizados para sobreviver ao trato digestivo, sendo absorvidos com menores perdas no cólon.

Algumas estratégias de imobilização servem para armazenar materiais (moléculas, células, enzimas, micronutrientes) dentro de uma cápsula protetora, e assim aumentar a viabilidade e funcionalidade tornando possível proteger os probióticos contra condições ambientais hostis dentro de uma matriz (ROCHA, 2020).

A célula imobilizada é uma célula impedida de se mover para a fase aquosa do sistema. Entretanto, suas atividades catalíticas são mantidas no interior do confinamento (KOVALESKI; BITTENCOURT; RODRIGUES, 2020).

De acordo com o tamanho da partícula podemos estar falando de microencapsulamento ou nano encapsulamento. Sendo as técnicas mais comuns de imobilização aplicadas em microrganismos probióticos são: extrusão, emulsão, coacervação, seguidos de liofilização ou secagem (REQUE; BRANDELLI, 2021).

Alguns estudos sugerem que a imobilização seguida por secagem aumenta a qualidade da célula imobilizada (SÁNCHEZ *et al.*, 2017). Apesar de aplicação ser bem definida, essas técnicas devem considerar aspectos como garantir a entrega dos benefícios, ter boas propriedades sensoriais, prazo de validade e funcionalidade visando o consumidor final (REQUE; BRANDELLI, 2021).

Além disso, é possível misturar meio de cultivo, e elementos prebióticos para aumentar a vida útil dos microrganismos probióticos como inulina, dextrose, sacarídeos, ou antioxidantes como cúrcuma, sucos de fruta, chá verde permitindo melhorar a viabilidade das microcápsulas durante a produção e armazenamento, esse processo é denominado co-encapsulamento simbiótico (KVAKOVA *et al.*, 2021). O quadro 2 descreve as principais características visadas em uma matriz polimérica de imobilização.

Quadro 2 - Características desejáveis para matriz ou suporte selecionado para imobilizar células microbianas

| Características |
|---|
| Ter grande área superficial com espaço intersticial para crescimento celular |
| Possuir grupos funcionais ligantes (adesão artificial) |
| Ser facilmente regenerável e possível de reuso |
| Proporcionar a viabilidade celular e atividade catalítica por longo período de tempo |
| Apresentar porosidade uniforme a fim de permitir trocas gasosas, entrada de substrato e fluxo de produtos do metabolismo microbiano |
| Ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica |
| Ser estável a mudanças drásticas de pressão, temperatura e pH do meio |
| Proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial |

Fonte: Adaptado de COVIZZI *et al.* (2007).

O espaço onde acontece o confinamento físico celular é chamado de suporte, e não pode oferecer toxicidade ao microrganismo, ter pouca sensibilidade, certo grau de resistência mecânica e permitir interação entre substrato e produtos. Muitos

materiais podem ser usados como suporte, como polímeros naturais, polímeros sintéticos ou materiais inorgânicos, podendo gerar uma malha rígida ou semirrígida (COVIZZI *et al.*, 2007). A literatura cita que o aprisionamento com matriz gelatinosa é a técnica mais utilizada (BATISTA, 2005). Os principais polímeros usados para o encapsulamento de probióticos são alginato, amido, quitosana, goma xantana, formas de celulose, gelatina (ROCHA, 2020).

3.6 Encapsulamento e aprisionamento em matriz porosa

O método mais comum para a encapsulamento com matriz porosa é o método de extrusão. Essa técnica consiste no preparo de uma solução hidrocoloide, como alginato de sódio, com um volume de suspensão celular (onde está localizado o bioativo a ser encapsulado). Essa mistura irá gotejar em uma solução de cloreto de cálcio, formando assim pequenas esferas de alginato de cálcio (KOVALESKI; BITTENCOURT; RODRIGUES, 2020). As cápsulas são formadas instantaneamente, e o formato e tamanho depende do tamanho e diâmetro da seringa ou tubo utilizado para gotejar a mistura.

O aprisionamento em gel de alginato é amplamente utilizado por permitir a imobilização de células viáveis dentro de uma rede polimérica ao mesmo tempo em que permite interação e troca de nutrientes e metabólitos entre o meio externo e o material aprisionado. O alginato é um polissacarídeo encontrado em algas marrons, formado por unidades de ácido manurônico e unidades de ácido gulurônico que gelifica em presença de cátions bivalentes, não alterando conforme a mudança de temperatura, pH ou pressão osmótica e a viabilidade dos microrganismos imobilizados (BATISTA, 2005). Além disso, existe outra forma de gelificar o alginato de sódio internamente, a solução de alginato é misturada com uma solução de cátions bivalentes em sua forma não ativa, liberado com a mudança de pH (OLIVEIRA, 2018).

Porém, os géis de alginato de cálcio são quimicamente instáveis na presença de alguns componentes do meio de cultivo, como íons fosfato e citrato, podendo sofrer rupturas ou até mesmo dissolverem-se no meio. Esse problema pode ser controlado com o uso de outros polímeros como a pectina e quitosana aumentando a estabilidade química e mecânica das cápsulas (KOVALESKI; BITTENCOURT; RODRIGUES, 2020).

3.6.1 Matriz gelatinosa autopreservante

Além da alternativa da imobilização celular através de micropartículas, um grupo de pesquisas demonstrou uma matriz gelatinosa autopreservante capaz de manter as células do *B. coagulans* vivas por dado período. O trabalho desenvolveu uma gelatina contendo o que eles chamam de emulgel (gel produzido por microemulsão), com baixa atividade de água que impede a germinação do probiótico durante o armazenamento, permitindo que o gel probiótico absorva a umidade da pele e ambiente e germine na superfície da pele (SHARMA *et al.*, 2021).

Em condições assépticas o gel desenvolvido foi um preparado de gelatina pré hidratada a 50°C, misturada com solubilizante, glicerina e conservante em constante agitação. A solução de esporos do bacilo foi dispersa em óleo de girassol e adicionada lentamente a emulsão. O aquecimento foi interrompido a agitação constante de 200-500 rpm. Após resfriamento, o creme foi agitado mecanicamente por 10 min a 2000 rpm a 4-8°C, e depois por 10 min a 1000 rpm para gerar um nanogel. A formulação em gel facilita a adesão microbiana na pele (SHARMA *et al.*, 2021).

Esse trabalho é promissor, mas sua ideia geral não se aplica ao *Lactobacillus acidophilus*, já que esse microrganismo não é capaz de esporular. Apesar disso, seu resultado mostra que a gelatina facilita a adesão do microrganismo na pele é um bom indício de que a imobilização utilizando matriz polimérica gelatinosa pode ser empregado em cosméticos.

4 METODOLOGIA

Pensando em melhor aproveitar o tempo disponível para a realização desse trabalho, optou-se por testar o microrganismo de interesse diretamente em uma formulação cosmética básica e minimalista. Optou-se também por realizar testes de triagem para determinar qual metodologia melhor se empregaria.

4.1 Formulação cosmética e os ingredientes de interesse

Para o desenvolvimento desse trabalho, pensou-se em diferentes materiais para a composição de uma formulação cosmética. Cada ingrediente foi pensado, de acordo com a sua função, aplicação, benefício e visando a produção de uma fórmula minimalista que permita a preservação do microrganismo de interesse, seja de fácil espalhabilidade e que permita a melhor adesão a pele. Para esse projeto, foi pensada uma formulação em gel que facilita a adesão microbiana na pele (SHARMA *et al.*, 2021).

4.1.1 Água

A água age como solvente para muitas substâncias, permitindo a diluição de muitos ingredientes, além de permitir que alguns compostos fiquem aptos para entrar em contacto direto com a pele. Além disso, uma alta porcentagem de água em uma formulação, pode garantir um bom custo de produto (DAREZZO, 2017).

4.1.2 Carbopol 940

O carbopol 940 é um polímero de ácido poliacrílico, tratando-se de um pó branco. Sua principal função é modificadora de reologia (alterar a viscosidade) de cosméticos, formando géis transparentes e cremes hidroalcoólicos. Uma característica considerável desse ingrediente, é a capacidade de alterar drasticamente a viscosidade de um produto mediante a alteração do pH (devido a repulsão de cargas, alguns sais tendem a desestabilizar estruturalmente um gel e carbopol, devido a interação de cargas (DECKNER, 2013).

4.1.3 Conservante

A função de um conservante em uma formulação cosmética é basicamente proteger e inibir o crescimento de microrganismos no produto, evitando deteriorações causadas por bactérias, fungos e leveduras (CONSERVANTES, 2007).

Acontece, que nesse projeto, o conservante tem um papel crucial e deve ser escolhido e empregado adequadamente, visto que ele deve não somente proteger a formulação da deterioração, como também impedir o crescimento excessivo do microrganismo de interesse (tratado aqui como o princípio ativo).

Para esse projeto, escolhemos analisar a função de 2 conservantes: óleo essencial de melaleuca (*tea tree oil*), proteg BP (uma mistura de benzoato de sódio e sorbato de potássio).

O sorbato de potássio é um conservante amplamente empregado na indústria de alimentos. O sorbato de potássio é bastante ativo contra mofo, razoavelmente ativo contra leveduras e fraco contra bactérias, já o benzoato de sódio tem boa atividade antifúngica, mas apresenta também alguma atividade contra bactérias (CONSERVANTES, 2007). Alguns fabricantes determinam que a dosagem de uso deve estar entre 0,5-1,5% (NATURALLY THINKING, 2022; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COSMETOLOGIA, 2020).

Enquanto o óleo essencial de melaleuca, existem inúmeros estudos que investigam a capacidade antimicrobiana e bacteriostática do óleo (COX *et al.*, 2001), que pode ser usado na faixa de 0,01-0,25% (NATURALLY THINKING, 2022).

4.1.4 Princípio ativo

Como descrito previamente, um princípio ativo é um ingrediente com função dentro de um cosmético. Nesse caso, o princípio ativo desse projeto trata-se de um microrganismo vivo. Serão testadas duas versões comerciais do *Lactobacillus acidophilus*. As cepas comerciais foram escolhidas, por já terem sido testadas previamente pelo fabricante como cepas probióticas.

A primeira, é composta pelo probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA 14, conhecida pelo nome de PROLIVE e comercializada pela Aché Laboratórios Farmacêuticos, e conta com 10^9 UFC. O microrganismo está na forma liofilizada, e armazenado dentro de um duo de capsulas, que o fabricante denomina de lipocaps: que melhora a passagem do lactobacilo até o intestino, que consiste em uma capsula

interna que armazena o microrganismo, e uma capsula externa que contendo um líquido oleoso que protege a capsula interna (CONSULTA REMÉDIOS, 2022).

A segunda cepa, também é composta pelo probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA 14 liofilizado e é vendida pelo nome comercial FLORASTOR, sendo produzida e comercializada pelo grupo União Química. O produto é vendido em pacotes de 4g contendo $2 \cdot 10^8$ UFC (CONSULTA REMÉDIOS, 2022).

4.2 Triagem: Cultivo do *Lactobacillus acidophilus* e estratégias de imobilização

Foram desenvolvidos alguns testes preliminares para a determinação das condições mais adequadas para a viabilização da bactéria de interesse. Para cada amostra, foram consideradas as características de homogeneidade, cor, pH, textura, aparência no geral e características microbiológicas como: a microscopia do *Lactobacillus acidophilus* e a presença de contaminantes.

4.2.1 Preparo do gel

O preparo do gel, foi executado de forma semelhante em todas as etapas do trabalho. Diferindo apenas na forma como o microrganismo foi adicionado e na quantidade de conservante adicionada.

Foi executado um teste preliminar, contendo um gel formado por carbopol 940 e água. A composição do gel pode ser verificada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição gel

| Ingrediente | Quantidade (%) |
|--------------------|-----------------------|
| Água destilada | q.s.p |
| Carbopol 940 | 1% |
| Conservante | 0-1,5% |

Fonte: Autoria própria (2022)

O preparo do gel, consistiu em pesar o volume total de água e carbopol separadamente, em agitação constante (utilizando um mixer de cozinha com única agitação) o carbopol foi dispersado. Foi necessário misturar por aproximadamente 1 hora para a melhor hidratação do polímero, sem necessidade de correção de pH.

O gel foi dividido em amostras de 24g, armazenadas em um tubo Falcon, cada amostra foi nomeada e recebeu uma quantidade de conservante (na fase inicial, o conservante utilizado foi o óleo essencial de melaleuca e nas etapas posteriores usou-

se o proteg BP). Além disso, todas as amostras foram autoclavadas para garantir a esterilidade do gel.

Todas as amostras, foram levadas a uma cabine de fluxo laminar e separadas em diferentes sub testes.

4.2.2 Células Imobilizadas

O tratamento de imobilização celular resultou em dois sub testes preliminares. O preparo da biomassa consistiu na suspensão do *Lactobacillus acidophilus* liofilizado (FLORASTOR) em água destilada estéril, A mistura foi adicionada a solução de alginato de sódio 1,5% previamente autoclavadas.

A imobilização foi dada de duas formas. Na primeira o material foi pipetado gota a gota em solução de Cloreto de Cálcio 125 mM estéril. As microcápsulas foram lavadas com água destilada estéril, peneiradas e inseridas no gel (PONTES; SYDNEY, 2019).

Na segunda estratégia a solução de cloreto de cálcio foi misturada ao gel, e em uma mistura contínua adicionou-se a biomassa com alginato, formando uma emulsão.

Foram testadas as duas estratégias, e para cada uma delas foi feita uma amostra com e sem conservante essa relação pode ser analisada na tabela 2.

Tabela 2 - Imobilização celular

| Amostra | Imobilização | Conservante (Óleo essencial de melaleuca) | Quantidade de conservante (%) |
|---------|---------------------|---|-------------------------------|
| 1 | Microencapsulamento | Não | 0 |
| 2 | Microencapsulamento | Sim | 0,2% |
| 3 | Emulsão | Não | 0 |
| 4 | Emulsão | Sim | 0,2% |

Fonte: Autoria própria (2022)

As amostras foram enumeradas de 1 a 4, sendo duas amostras microencapsuladas e duas amostras emulsionadas, e cada uma sem e com conservante, como descrito na tabela 2. Foram consideradas as características de homogeneidade, cor, pH, textura, aparência no geral e características microbiológicas como: a visualização ou não do *Lactobacillus acidophilus* em microscópio e a presença de contaminantes.

4.2.3 Adição das células liofilizadas em gel

Outro teste realizado previamente, foi a adição de 1g do *Lactobacillus acidophilus* liofilizado diretamente em gel autoclavado. Considerando a amostra sem nenhum conservante e outra amostra com uma quantidade 0,2% de óleo essencial de melaleuca como agente antimicrobiano e preservativo natural para a formulação.

Nesse teste, foram feitas 4 amostras. Cada cepa comercial, FLORASTOR e PROLIVE, foi adicionada em um respectivo gel com e sem conservante.

4.3 Cultivo do *Lactobacillus acidophilus* em gel

A realização dos sub testes preliminares, permitiu escolher uma estratégia de imobilização mais adequada para mapear e registrar o crescimento do microrganismo de interesse. O sub teste que se desempenhou melhor, foi o que continha células liofilizadas do produto comercial FLORASTOR.

4.3.1 Cultivo em gel, utilizando diferentes conservantes

Foram preparadas 5 amostras de 24g de gel, 4 amostras receberam diferentes concentrações do conservante proteg BP (composto por benzoato de sódio e sorbato de potássio) no range de concentração sugerido pelo fabricante, e uma amostra recebeu o conservante sorbato de potássio puro, essa relação pode ser descrita na tabela 3.

Tabela 3 - Composição gel e conservantes

| Amostra | Conservante (nome comercial) | Composição química dos conservantes | Quantidade de conservante (%) |
|---------|------------------------------|---|-------------------------------|
| 1 | - | - | 0 |
| 2 | proteg BP | Benzoato de Sódio e Sorbato de Potássio | 0,5% |
| 3 | proteg BP | Benzoato de Sódio e Sorbato de Potássio | 1% |
| 4 | proteg BP | Benzoato de Sódio e Sorbato de Potássio | 1,5% |
| 5 | sorbato de potássio | Sorbato de Potássio | 0,2% |

Fonte: Autoria própria (2022)

Para cada amostra, foram consideradas as características de homogeneidade, cor, pH, textura, aparência no geral e características microbiológicas

como: a visualização ou não do *Lactobacillus acidophilus* em microscópio e quantificação.

4.3.2 Quantificação de células viáveis

Utiliza a técnica de profundidade (*Pour Plate*) para a contagem de microrganismos anaeróbios (DINIZ, 2018).

O processo a seguir foi realizado da mesma forma para as 5 amostras. Cada amostra de 25g (24g de gel + 1g de FLORASTOR) foi diluída em 225mL de água peptonada 0,1% estéril, 1 ml da amostra e transferida para 9mL de diluente (água peptonada 1%) e assim sucessivamente, até sofrer diluições em série (de 10^{-1} a 10^{-9}). Depois disso, foi pipetado 1mL de cada diluição para uma placa esterilizada e verter 15-20 ml do meio MRS sólido fundido, a placa foi homogeneizada em movimentos circulares (em “8”), todas as placas foram incubadas em posição invertida a 37°C por 48h.

A técnica considera que homogeneizando uma pequena quantidade do material, obtém-se células individuais e separadas. E que cada colônia isolada descende de uma única célula (provavelmente de uma cultura pura) (DINIZ, 2018; REZENDE *et al.*, 2020).

Para determinar a população de microrganismos na amostra original, foram selecionadas placas com o número de colônias entre 25 e 250, conforme o padrão metodológico (DINIZ, 2018).

O meio de cultivo aplicado nessa técnica é o MRS, comumente o mais empregado para cultivo de *Lactobacillus*. O preparo do meio de cultivo para uso em diferentes aplicações e etapas desse projeto consiste na pesagem dos ingredientes, diluição em água e esterilização por autoclave (COSTA *et al.*, 2011).

O processo foi feito para as 5 amostras. Foram selecionadas as diluições de 10^{-2} , 10^{-5} , e 10^{-9} para o plaqueamento, para a contagem de colônias e determinação de UFC/ml.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Testes preliminares

As amostras feitas nos testes preliminares, foram mantidas por um período de 45 dias, confinadas em um ambiente escuro e com temperatura ambiente média (25 °C). Os testes preliminares, contabilizaram 6 amostras no total e foram relevantes na escolha de qual matriz imobilizadora foi a mais adequada para a continuidade do trabalho.

Ambas as amostras contendo micropartículas encapsuladas (com e sem conservante), desestabilizaram completamente o gel de carbopol. Tornando-o líquido, alterando o pH para 4,5 e alterando o odor do produto (que passou de sem cheiro para cheiro de leite estragado, indicando uma possível formação de ácido láctico proveniente do *Lactobacillus acidophilus*).

Ambas as emulsões com alginato, apresentaram o aparecimento de manchas rosas no creme. A avaliação microbiológica demonstrou o aparecimento de leveduras contaminantes.

As 4 amostras contendo *Lactobacillus acidophilus* diretamente em gel (PROLIVE e FLORASTOR) mantiveram as características sensoriais, sem odor, pH constante, sem alterações visuais na cor e viscosidade do produto. As observações microbiológicas demonstraram que o *Lactobacillus acidophilus* cresceu e era possível visualizá-lo microscopicamente. Entretanto, também foi indicado a presença de fungos e leveduras, indicando uma alta contaminação. As contaminações podem ter diversas origens como matéria prima contaminada, água, embalagem, equipamentos, operação, ambiente, execução inadequada no preparo da amostra, tempo errado de esterilização, manuseio errado da retirada das amostras da embalagem comercial (proveniente do ar), e até mesmo contaminação no filtro do fluxo laminar.

Portanto, foi necessária a utilização de um conservante mais eficiente que o óleo essencial de melaleuca. Dessa forma, o proteg BP foi escolhido devido a sua ação contra fungos e leveduras, e baixa ação contra bactérias.

As análises seguintes foram feitas com a cepa comercial do FLORASTOR, devido a maior facilidade de manuseio. Visto que o sistema “*duo caps*” do PROLIVE dificulta a liberação direta do ativo no gel, sendo necessário um rompimento mecânico das capsulas. Enquanto o FLORASTOR conta apenas com o pó liofilizado.

5.2 Contagem de células viáveis

Foram comparados o crescimento do *Lactobacillus acidophilus* utilizando a técnica de contagem *Pour Plate*. Considerando as amostras ilustradas na tabela 3: controle, 0,2% sorbato de potássio, 0,5% de proteg BP, 1% proteg BP e 1,5% de proteg BP. Obtiveram-se os seguintes resultados:

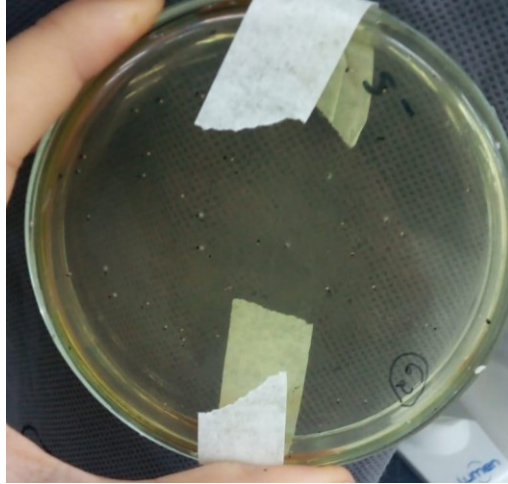
A amostra sem conservante, apresentou crescimento do *Lactobacillus acidophilus*. Apesar disso, a placa apresentou grandes contaminações que puderam ser observadas visualmente. As contaminações podem ser diretas, e ter diversas origens como matéria prima contaminada, água, embalagem, equipamentos, operação, ambiente, execução inadequada no preparo da amostra, ou até mesmo na execução inadequada da técnica de plaqueamento.

A amostra com 0,2% de sorbato de potássio, não apresentou crescimento em nenhuma diluição. O sorbato de potássio utilizado nesse teste, possuía pureza P.A. e não foi previamente diluído. A ausência de crescimento pode significar que essa concentração de conservante estava muito alta, e impactou diretamente no não crescimento microbiano.

As amostras com 1 e 1,5% de proteg BP, apresentaram crescimento de *Lactobacillus acidophilus* inferior ao limite de contagem estipulado pela técnica, impossibilitando a contagem.

Apenas a amostra com 0,5% de proteg BP permitiu o crescimento do *Lactobacillus acidophilus*, na diluição de 10^{-2} . Como pode ser vista na fotografia 1.

Fotografia 1 - Representação de uma das placas que apresentaram crescimento



Fonte: Autoria própria (2022)

A média da contagem resultou em $6,3 \cdot 10^3$ UFC /ml, resultado que indica que foi possível obter células viáveis confinadas em gel de carbopol e que o conservante escolhido foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo dentro da matriz imobilizadora (o gel). A concentração celular obtida foi considerada inferior à que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera para classificar um produto como probiótico em alimentos. Apesar disso, a normativa empregada em alimentos talvez não seja o comparativo adequado, um probiótico testado em alimentos passa por diversas condições de estresse para a sobrevivência dentro do trato digestivo, por condições de ataque de pH e a contagem final de células deve ainda se manter em uma quantidade capaz de entregar os benefícios. Ao passo que essas não são as mesmas condições em que um microrganismo aplicado topicamente enfrentaria, e precisaria ser considerado o pH da pele, o tempo de exposição ao ambiente externo (ar, luz, calor, umidade, nutrição, crescimento), apenas testando esses fatores entenderíamos se a quantidade de células viabilizadas possui potencial como probiótico de uso tópico ou não.

Portanto, ao se obter o resultado de $6,3 \cdot 10^3$ UFC /ml, concluiu-se que o objetivo geral do trabalho foi cumprido, permitindo elaborar uma metodologia capaz de manter células viáveis da bactéria *Lactobacillus acidophilus*, sem resfriamento, para aplicação em formulações cosméticas. Além de permitir cumprir alguns dos objetivos específicos como avaliar diferentes técnicas de imobilização celular, comparar a concentração de diferentes conservantes, comparar o crescimento de células livres e imobilizadas e aplicar o resultado obtido para o desenvolvimento de uma formulação cosmética (viabilizado pelo uso do gel de carbopol, uma formulação

cosmética minimalista capaz de manter células viáveis e preservadas dentro dela em temperatura ambiente).

6 CONCLUSÃO

Os benefícios dos microrganismos probióticos para a saúde humana vem sendo amplamente explorados há muito tempo, e as investigações sobre a aplicação tópica desses microrganismos como ativos cosmeceúticos para tratamento de diversas condições da pele vem sendo alvo de interesse em todo o mundo. E fomenta pesquisas que visam compreender a complexidade da composição e da relação entre a microbiota do natural do hospedeiro, os estados de disbiose e as possíveis alternativas para restaurar o equilíbrio desse ambiente

Muito estudos indicam que a aplicação de microrganismos, antes encontrados apenas em outras partes do corpo humano, como “exército de suporte” regulando o pH do meio, produzindo substâncias que inibem uma gama de patógenos. Apesar disso, a ciência ainda está buscando uma maneira de viabilizar e entregar essas substâncias na forma de um cosmético essenciais à saúde da pele.

A metodologia testada nesse trabalho, contribui com uma a parcela desse conteúdo, que tem um grande potencial de inovação. Através desse trabalho, foi possível viabilizar, uma formulação cosmética minimalista capaz de manter células viáveis e preservadas dentro dela em temperatura ambiente, ainda que não tenha atingido uma contagem de células viáveis ideais para a legislação que regulamenta probióticos em alimentos, além disso cabem a testes futuros atingir esse número, investigar e comprovar a ação probiótica do microrganismo empregado em cosméticos.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. Scientists bust myth that our bodies have more bacteria than human cells. **Nature**, 11 jan. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COSMETOLOGIA. **Guia para aulas práticas: manual de inovação em cosmetologia**. 1. ed. São Paulo: Livros on demand, v. 1, 2020.

BATISTA, M. D. A. **Estudo da imobilização de células de Saccharomyces cerevisiae em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 44. 2005.

BEATO, I. S. F. **Impacto dos cosméticos no microbiota da pele**. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas), Universidade de Lisboa. Lisboa. 2017.

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018**: Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, Distrito Federal, 26 jul. 2018. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf . Acesso em: 03 mar. 2022.

CARP, J. The Difference Between Prebiotics, Probiotics, and Postbiotics Plus Their Benefits. **Miracle Noodle**, 2018. Disponível em: <https://miraclenoodle.com/blogs/miraclenoodle-blog/the-difference-between-prebiotics-probiotics-and-postbiotics-plus-their-benefits>. Acesso em: 1 nov. 2021.

CINQUE, B. *et al.* Use of Probiotics for Dermal Applications. **Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects**, 2011. p. 221-241.

CONSERVANTES. Conservantes utilizados em cosméticos. **Revista Cosméticos e Perfumes**, v. 44, p. 28-52, 2007.

CONSULTA REMÉDIOS. Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A (Brasil): Prolive, para o que é indicado e para o que serve? **Consulta remédios**, 2022. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/prolive/bula>. Acesso em: 4 mai. 2022.

CONSULTA REMÉDIOS. União Química Farmacêutica Nacional S/A (Brasil). Florastor, para o que é indicado e para o que serve? **Consulta remédios**, 2022.

Disponível em: Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/florastor/bula>. Acesso em: 4 mai. 2022.

COSTA, A. L. P. D. *et al.* Avaliação de modificações no meio MRS (Seletivo para *Lactobacillus spp*) por diferentes sais de amônia e tween 20 em substituição ao citrato de amônio e tween 80. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 3, 2011.

COVIZZI, L. G. *et al.* Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 28, n. 2, 2007. p. 143-160.

COX, S. D. *et al.* Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. **Molecules**, v. 6, n. 2, 2001. p. 87-91.

DAREZZO, A. Água para produção de cosméticos. **Química da Beleza**, 2017. Disponível em: <https://www.quimicadabeleza.com/agua-para-producao-de-cosmeticos/>. Acesso em: 4 mai. 2022.

DECKNER, G. Carbomers: Overview, Tips, & Recommendations. **UL Prospector (U.S.A)**, 2013. Disponível em: <https://knowledge.ulprospector.com/261/pcc-carbomers/>. Acesso em: 4 mai. 2022.

DELANGHE, L. *et al.* The role of lactobacilli in inhibiting skin pathogens. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 2, 2021. p. 617-627.

DINIZ, C. G. **Roteiro para aulas práticas de bacteriologia. Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Setor de Microbiologia.** Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, p. 1-68. 2018.

DRÉNO, B. *et al.* Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 12, 2016. 2038-2047.

EMILIANO, A.; GUIMARÃES, F.; NETZ, D. J. A. **BIOTECNOLOGIA NA OBTENÇÃO DE ATIVOS E EXCIPIENTES.** Monografia de Graduação em Estética Facial e Corporal, Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, p. 22. 2012.

FARIA, I. L. D. *et al.* A influência da microbiota na prevenção de alergias. **Educação em Saúde**, v. 8, n. 1, p. 304-308, 2020.

FERREIRA, C. L. D. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção.** [S.l.]: Editora Rubio, v. 2, 2012.

ISAPP. Probiotic. **Isapp Science**, 2019. Disponível em: <https://isappscience.org/for-consumers/learn/probiotics>. Acesso em: 13 dez. 2021.

ISAPP. Should the concept of postbiotics make us see probiotics from a new perspective? **Isapp Science**, 2021. Disponível em: <https://isappscience.org/should-the-concept-of-postbiotics-make-us-see-probiotics-from-a-new-perspective/>. Acesso em: 12 dez. 2021.

KIM, G. K. Seborrheic Dermatitis and Malassezia species: How Are They Related? **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 2, 2009. p. 7-14.

KNACKSTEDT, R.; KNACKSTEDT, T.; GATHERWRIGHT, J. The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. **Experimental Dermatology**, v. 29, n. 1, 2020. p. 15-21.

KOVALESKI, G.; BITTENCOURT, J. V. M.; RODRIGUES, S. A. **Estudo da Imobilização Celular de Saccharomyces Cerevisiae em Alginato de Cálcio**. Ponta Grossa: Editora Aya, v. 1, 2020.

KVAKOVA, M. *et al.* Co-Encapsulated Synbiotics and Immobilized Probiotics in Human Health and Gut Microbiota Modulation. **Foods**, v. 10, n. 6, 4 jun. 2021.

LIN, Q. *et al.* Malassezia and Staphylococcus dominate scalp microbiome for seborrheic dermatitis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, 2021. p. 965-975.

LOOI, M. The human microbiome: Everything you need to know about the 39 trillion microbes that call our bodies home. **BBC Science Focus**, v. 1, 2020.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, Jacques. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 31, 2015.

MURPHY, B. *et al.* In-vivo impact of common cosmetic preservative systems in full formulation on the skin microbiome. **Plos one**, v. 16, n. 7, jul. 2021.

NATURALLY THINKING. Sodium Benzoate & Potassium Sorbate. **Naturally Thinking**, 2022. Disponível em: <https://naturallythinking.com/sodium-benzoate-potassium-sorbate#:~:text=Using%20Sodium%20benzoate%20%26%20Potassium%20sorbate&text=Sodium%20benzoate%20%26%20Potassium%20sorbate%20is%20normally%20used%20in%20concentrations%20of,pH%20is%20less%20than%205.5>. Acesso em: 27 abr. 2022.

OKADA, H. *et al.* The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, 2010. p. 1-9.

OLIVEIRA, A. F. **Desenvolvimento de sistemas microfluídicos para produção de lipase por *Bacillus Subtilis* imobilizado em micropartículas de alginato [recurso eletrônico] : Development of microfluidic systems for lipase production by *Bacillus subtilis* immobilized on algina.** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, p. 120. 2018.

OTTMAN, N. *et al.* The function of our microbiota: who is out there and what do they do? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 9 ago. 2012.

PATEL, R. M.; DENNING, P. W. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? **Clin Perinatol**, v. 40, n. 1, 2013.

POLAK-WITKA, K. *et al.* The role of the microbiome in scalp hair follicle biology and disease. **Experimental Dermatology**, v. 29, n. 3, 2020.

PONTES, R. C.; SYDNEY, A. C. N. **Bioatividade em compostos de origem biotecnológica: Encapsulamento de *Spirulina maxima* em esferas de alginato para cultivo em biorreator agitado.** Relatório de Pesquisa ou Técnico do Programa de Iniciação Científica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa. 2019.

REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 114, 2021. p. 1-10.

REZENDE, C. L. E. *et al.* Comparação da qualidade microbiológica da carne moída após repetidos processos de congelamento e descongelamento. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, 2020.

ROCHA, M. D. F. F. Imobilização celular e suas principais aplicações em bioprocessos: uma revisão. In: CONAPESC, IV **Tecnologia, investigação, sustentabilidade e os desafios do século XXI**. [S.l.]: ed. Campina Grande: Realize Editora, 2020. p. 543-557.

SALLVE. Esfoliação enzimática biológica: Quais os benefícios? **Sallve**, 2019. Disponível em: <https://www.sallve.com.br/blogs/sallve/esfoliacao-enzimatica-beneficios.%20Acesso%20em:%2016%20out.%202021>. Acesso em: 16 out. 2021.

SÁNCHEZ, M. T. *et al.* An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: Protection, survival and stability study. **Food Hydrocolloids**, n. 69, 2017. p. 67-75.

SEIXAS, R. S.; SOUZA, P. C. D.; MOTTA, M. R. **Tente outra vez**. Rio de Janeiro: Philips Records, 1975.

SHARMA, G. *et al.* Self-preserving gelatin emulgel containing whole cell probiotic for topical use: preclinical safety, efficacy, and germination studies. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 18, n. 11. p. 1777-1789, 2021.

SILVA, C. J. A. D.; MALTA, D. J. D. N. A IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS NA BIOTECNOLOGIA. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - PERNAMBUCO**, n. 3, 11 Jan 2017. p. 49-66.

SIQUEIRA, A. C.; CERIOLLI, P. C.; ARNO, V. **Probióticos e sua aplicação nos alimentos: Uma breve revisão bibliográfica**. Relatório de Conclusão de Curso (Técnico em Alimentos), Instituto Federal de Santa Catarina. Xanxerê-SC, p. 35. 2021.

SIVIERI, K. *et al.* Microbiota da pele: Novos desafios. **Arquivos Catarinenses De Medicina**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 93-112, 2021.

TAO, R.; LI, R.; WANG, R.. Skin microbiome alterations in seborrheic dermatitis and dandruff: A systematic review. **Experimental Dermatology**, v. 30, n. 10, 2021. p. 1546-1553.

TORRES, A. Diferença entre microbiota x microbioma. **Andreia Torres Nutricionista**, 2021. Disponível em: <https://andreiatorres.com/blog/2021/9/12/microbiota-microbioma>. Acesso em: 12 out. 2021.

WIKRAMANAYAKE, T. C. *et al.* Seborrheic dermatitis—Looking beyond *Malassezia*. **Experimental dermatology**, v. 28, n. 9, 2019. p. 991-1001.

ZMORA, N.; SUEZ, J.; ELINAV, E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 1, 2019. p. 35-46.