

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DE QUERATINASE DE *BACILLUS SUBTILIS* COMO AGENTE
DEPILATÓRIO E PROMOTOR DE ABSORÇÃO PARA USO TÓPICO EM
HUMANOS

VIVIANE CRISTINA KRUCINSKI

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DE QUERATINASE DE *BACILLUS SUBTILIS* COMO AGENTE
DEPILATÓRIO E PROMOTOR DE ABSORÇÃO PARA USO TÓPICO EM
HUMANOS

Dissertação apresentada por
Viviane Cristina Krucinski
para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, 2012.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada com LOUVOR em 27 de março de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Teixeira Ferreira

Universidade de Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Krucinski, Viviane Cristina

ESTUDO DE QUERATINASE DE BACILLUS SUBTILIS COMO AGENTE DEPILATÓRIO E PROMOTOR DE ABSORÇÃO PARA USO TÓPICO EM HUMANOS / Viviane Cristina Krucinski. -- 2012.

105 f.

Orientadora: Alexandre José Macedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Bacillus subtilis. 2. queratinase microbiana. 3. agente depilatório. 4. célula de Franz. 5. enzima. I. Macedo, Alexandre José, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Tecnologia Bioquímica, Laboratório 405 e Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas no Centro de Biotecnologia da UFRGS, com financiamento CNPq, CAPES e FAPERGS.

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste trabalho, muitas pessoas tiveram participação e a elas dedico meus agradecimentos especiais:

Ao meu orientador e amigo, Professor Dr. Alexandre José Macedo pela confiança e generosidade;

Ao meu colega de profissão e amigo, Fernando Spengler pela compreensão e apoio;

À Simone Kobe, pelo estímulo inicial e constante;

Aos professores Carlos Termignoni e Teresa Dalla Costa pela acolhida em seus laboratórios;

À Sandra Haas, pelas incontáveis contribuições, paciência, empenho e amizade;

A William Lopes, pelo afeto e disponibilidade, à Marina Scopel pela amizade dentro e fora do laboratório e à Danielle Campiol Arruda por toda atenção;

À Jéssica Lourenço e Sharon Reis, pela contribuição em diferentes momentos na realização deste trabalho; às colegas de pós-graduação Karine Rigon Zimmer, Danielle da Silva Trentin e demais colegas do Laboratório de Peptídeos e Enzimas proteolíticas e LBDiM;

Aos colaboradores e amigos do Centro Bioanalítico de Medicamentos e do Laboratório 405, especialmente ao João, Pedro, Ana Luíza, Cristiane e Cássia;

Aos membros da banca, por aceitarem o convite;

Aos colegas de trabalho da Farmácia Spengler;

À equipe do Professor Doutor David Driemeier;

À minha família, pelo apoio e compreensão constante, por entender e respeitar a ausência, por estarem sempre disponíveis, pelo amor.

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo."

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho iniciou com a caracterização de 19 bactérias isoladas em meio seletivo contendo farinha de pena seguido da seleção de seis cepas com elevada atividade queratinolítica. Os seis microrganismos selecionados foram denominados de NP4, NP5, NP8, FCA1, FCA3 e FCA8. Os mesmos foram cultivados em diferentes meios de cultivo: fios de cabelo humano (CB), farinha de pena (FP) e Luria-Bertani e seus sobrenadantes foram ensaiados frente aos substratos azoqueratina e azul de queratina. Desse rastreamento, o isolado NP5, *Bacillus subtilis*, foi o que teve maior atividade queratinolítica e foi o escolhido para o prosseguimento do estudo. A Influência de parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção enzimática foi avaliada e as condições finais de cultivo foram: inóculo de 10^8 células de NP5 em meio com 7,5% de farinha de pena e 0,05% de extrato de levedura em água deionizada, em 72 horas, a 37 °C e 180 rpm. Nessas condições de cultivo obtivemos uma atividade de $4,91 \pm 0,30$ U.h.min⁻¹. A seguir, a atividade queratinolítica do sobrenadante foi avaliada antes e após incorporação em quatro veículos de uso dermatológico: Gelcreme Sepigel[®], Gel Aristoflex[®] AVC, Gel Carbopol[®] e Gel Goma xantana[®]. Com base nas atividades obtidas, o veículo dermatológico escolhido foi o gelcreme sepigel e o mesmo foi utilizado para os testes *in vitro*, em Célula de Franz Modificada, e *in vivo*, em camundongos. Nos experimentos em Célula de Franz Modificada, a formulação enzimática mostrou ser capaz de promover maior penetração de diclofenaco sódico no estrato córneo nos tempos de 15 minutos e 1 hora após o tratamento. No experimento *in vivo*, 4 grupos de animais foram ensaiados: enzima, papaína, veículo e controle. Os grupos tratados com enzima e papaína apresentam áreas pilosas falhadas em comparação aos grupos veículo e controle e, na formulação gelcreme, o extrato enzimático se mostrou mais eficiente no efeito depilatório do que a papaína. Ainda dentro desse experimento aguardamos os resultados das análises histológicas do pulmão, baço, coração, fígado, cérebro, rins e da pele para a avaliação final.

Palavras-chave: queratinases, agente depilatório, enzimas, *Bacillus subtilis*, célula de Franz.

ABSTRACT

Study of Keratinase from Bacillus subtilis as Depilatory Agent and Absorption Promoter for Topical Products for Use in Humans

This work began with the characterization of 19 bacteria isolated in selective medium containing feather meal followed by the selection of six strains with keratinolytic activity noted. The six selected microorganisms were designated NP4, NP5, NP8, FCA1, FCA3 and FCA8. They were grown in different culture media: human hair (CB), feather meal (FM) and Luria-Bertani and their supernatants were tested against the azokeratin and Keratin azure[®]. After this screening, the NP5, a *Bacillus subtilis*, presented the higher keratinase activity and was chosen for further study. The influence of nutritional parameters and physico-chemical in enzyme production was evaluated and the final conditions of cultivation were: inoculum for NP5 10^8 cells in medium with 7.5% feather meal, and 0.05% yeast extract in deionized water in 72 hours at 37 °C and 180 rpm. In these culture conditions we obtained an activity of 4.91 ± 0.30 U.h.min⁻¹. Afterwards the keratinolytic activity of the supernatant was measured before and after incorporation into four distinct vehicles for dermatological use: Sepigel[®] Gelcreme, Aristoflex AVC[®] Gel, Carbopol[®] Gel and Xanthan gum[®] Gel. Based on the activities obtained from the dermatological vehicle Sepigel Gelcreme[®] was chosen and it was used for the tests *in vitro*, in Modified Franz cell, and *in vivo* in mice. From the experimental results in Modified Franz cell, the enzyme formulation was able to exert action on the penetration of diclofenac sodium in the stratum corneum after 15 minutes and 1 hour, after treatment. In *in vivo* experiment, four groups of animals were tested: enzyme, papain, and vehicle control. Groups treated with the enzyme and papain have more failed hairy areas compared to control groups and vehicle, and the formulation gelcreme the enzymatic extract is more efficient than the effect depilatory papain. Also within this experiment we await the results of histological analyzes of lung, spleen, heart, liver, kidneys, brain and skin for the final evaluation.

Keywords: keratinases, depilatory agent, enzymes, *Bacillus subtilis*, Franz cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da Célula de Difusão de Franz.....	51
Figura 2. Tubos reacionais de azul de queratina com veículos + EE e seus respectivos controles	80
Figura 3. Curva de calibração média da solução padrão de diclofenaco sódico... 82	
Figura 4. Formulações utilizadas para o teste <i>in vivo</i>	86
Figura 5 a. Fotos dos animais do grupo enzima em 0, 10, 16, 22 e 26 dias.....	88
Figura 5 b. Fotos de animais do grupo papaína, veículo e controle em 0, 10, 16, 22 e 26 dias.....	89
Figura 6. Foto dos grupos de animais observados, após o tratamento, no último dia do experimento.....	90
Figura 7. Fotografia de camundongo tratado com creme de papaína em experimento de Traversa <i>et al.</i> (2007)	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz +/- de PB.....	53
Tabela 2. Matriz ausência/presença de PB.....	53
Tabela 3. Dispersões e suas respectivas fórmulas dermatológicas.....	56
Tabela 4. Composição e características das fórmulas de Gelcreme de Diclofenaco Sódico e de Gelcreme de Diclofenaco Sódico + EE.....	58
Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação de diclofenaco no líquido receptor e no <i>tape stripping</i>	61
Tabela 6. Grupos de animais ensaiados <i>in vivo</i> e a formulação teste correspondente.....	62
Tabela 7. Características e identificação dos microrganismos isolados.....	68
Tabela 8. Avaliação da atividade queratinolítica dos sobrenadantes de FCA1, FCA3, FCA8, NP4, NP5 e NP8 em diferentes meios frente ao substrato azoqueratina.....	69
Tabela 9. Estudo do efeito de diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio na produção de queratinase.....	71
Tabela 10. Atividade queratinolítica dos sobrenadantes de NP5 e S14 em meio com farinha de pena pura e combinada.....	74
Tabela 11. Atividade queratinolítica dos sobrenadantes de NP5 e S14 isolados e de NP5 + S14 combinados em meio com 5% de farinha de pena.....	75
Tabela 12. Influência de diferentes pHs na atividade queratinolítica do sobrenadante do isolado NP5.....	76
Tabela 13. Atividade queratinolítica do sobrenadante de NP5 em diferentes meios de cultivo.....	77
Tabela 14. Atividade queratinolítica do sobrenadante de NP5 associado a veículos dermatológicos a base de dispersões.....	79
Tabela 15. Atividades queratinolíticas do sobrenadante de NP5 incorporado a gelcreme e gel e de substâncias de referência.....	81
Tabela 16. Diclofenaco quantificado na superfície cutânea, estrato córneo e no líquido receptor após a aplicação de formulações contendo 1,5% do fármaco.....	83
Tabela 17. Peso médio dos animais e órgãos, por grupo, ao fim do experimento <i>in vivo</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS

CB – cabelo

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

EE – extrato enzimático

FCA – Franca

FP – farinha de pena

LB – Luria Bertani

NP – Nova Petrópolis

OD 600 – densidade ótica em 600nm

PB – Plackett-Burman

Q.S. – quantidade suficiente

Q.S.P. – quantidade suficiente para

U – unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3. OBJETIVOS.....	43
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	93
7. PERSPECTIVAS.....	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

Na pesquisa sobre bioativos, as queratinases bacterianas ocupam um lugar de destaque, devido à ampla gama de aplicações, todas relacionadas a um ganho de valor econômico e/ou ambiental. Como exemplos da amplitude de usos já estabelecidos, podemos destacar:

- (i) na remoção de pelos na indústria de processamento de peles de animais;
- (ii) na biodegradação do resíduo penas de aves para suplementação de ração animal;
- (iii) na composição de detergentes e
- (iv) na indústria cosmética; entre outros.

Especialmente ao que se refere ao mercado cosmético e farmacêutico, é cada vez mais frequente a presença de ativos provenientes de fontes naturais ou obtidos de microrganismos em formulações para face, corpo e cabelo. Com isso, a procura por ativos multifuncionais que gerem baixo impacto ambiental e com menor custo de obtenção do que os atualmente utilizados cresce continuamente. Acompanhando essa tendência, ativos de origem biotecnológica estão sendo produzidos e usados (associados com outros ativos ou não) para a criação de produtos tópicos de uso humano, com segurança e sem efeitos colaterais, em substituição a ativos tradicionais com potencial tóxico e sensibilizante.

Assim, com este trabalho procuramos identificar e selecionar compostos biologicamente ativos, em especial, queratinases microbianas, que sejam capazes de se manter estáveis e ativas em formulações de uso tópico para uso humano dermatológico e/ou cosmético.

Dentro desse contexto, rastreamos e selecionamos microrganismos produtores de enzimas queratinolíticas; otimizamos as condições de cultivo e avaliamos a atividade dos sobrenadantes da cultura antes e após incorporação em veículo à base de dispersões (gel e gelcreme). Uma vez definida a forma e fórmula

farmacêutica (produto cosmético grau de risco 2 de acordo com definição da ANVISA) avaliamos a penetração de fármaco (*in vitro*) e alterações nas propriedades da pele (*in vivo*) em camundongos após tratamento com gelcreme contendo queratinase.

A revisão de literatura deste trabalho será apresentada na forma de trabalho de revisão elaborado durante a realização da dissertação, citando abaixo:

- Viviane Cristina Krucinski, Carlos Termignoni, Alexandre José Macedo. Enzymes potential in the cosmetic market, em preparação.

O trabalho descreve um panorama do mercado cosmético mundial e as perspectivas de crescimento esperadas para o setor. Além disso, descreve os avanços obtidos na área da pesquisa, bem como, as expectativas para a mesma e a busca cada vez maior pelo desenvolvimento e obtenção de ativos com apelo natural, dermatologicamente compatível e com ampla ou, pelo contrário, específica ação cosmética / farmacêutica sobre a pele.

Dentro deste contexto, surgem as enzimas e co-enzimas com as suas notáveis capacidades de interferirem em processos biológicos pelos mais diversos mecanismos de ação. Inúmeros produtos comercializados possuem enzimas em sua composição, sendo destinados para as mais diversas finalidades. Um enfoque especial é dado às enzimas proteolíticas do tipo queratinase, obtidas via microbiana.

A seguir, é apresentada a íntegra do manuscrito a ser submetido para publicação.

Mini-review

Enzymes potential in the cosmetic market

Viviane Cristina Krucinski¹, Carlos Termignoni^{2,3} and Alexandre José Macedo^{1,2*}

¹Faculdade de Farmácia and ²Centro de Biotecnologia, ³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Alexandre J. Macedo, Faculdade de Farmácia and Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Tel/Fax: +55 51 3308 5354. E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

ABSTRACT

The purpose of this mini review is to present a picture of the global cosmetics market for enzymes, pointing out research trends, especially in microbial-derived enzymes for topical use.

KEYWORDS: enzymocosmetic, cosmeceutical, microbial enzymes, cosmetic market, keratinase.

1. THE COSMETIC MARKET: A WORLD PANORAMA

The global cosmetics industry has showed considerable dynamism in recent years. The ten top countries positioned in the global cosmetics market between 2006 and 2007 were the United States, Japan, Brazil, Britain, France, Germany, China, Italy, Russia and Spain. According to a report accompanying from Brazilian Agency for Industrial Development (ABDI), the global cosmetics market reached more than \$ 290 billion in 2007, an increase of 5.9% over 2006. The same report noted the continuity of the trend of increasing importance of emerging countries such as Brazil, China and Russia, which has emerged as consumer markets in previous reports.¹ While France, Germany, Italy, Japan, Spain and the United States presented levels of growth below 5%, Brazil, Argentina, China, India and Russia already showed rates of growth higher than two digits in 2006. In 2008, the United States continued in the top rank in market volume, and Brazil went up from the fifth to the fourth position in volume, comparing 2006 and 2007. France had the highest expenditure per capita per year in cosmetics in the world: US\$ 245.31 per capita while Brazil spent US\$ 98.05, which demonstrated the potential of growth in consumption in this market.² As pointed by the Kline's Report, the global natural care market in 2010 was over US\$ 20 billions, being the brazilian the fastest growing market achieveing values around US\$ 4 billion (<http://www.klinegroup.com/reports/y632d.asp>).

In addition to this trend of growing share by emerging countries, the leadership of beauty products and makeup, especially those products associated with skin care must be highlighted. This phenomenon is related to increase life expectancy, rising

average age of the world population and increasing urban population, among other factors.¹ Skincare cosmeceuticals represents approximately 80% of the total U.S. and European cosmeceutical market.³ These global trends have been reflected in terms of business strategies in the search for new active ingredients with anti-aging action and hydrating properties, with special emphasis on the motto “natural or organic”. In addition, there are growing investments in marketing of cosmetic companies in emerging countries by international big players. It is possible to note investments in two distinct areas: (i) small businesses, focusing on specific market niches and (ii) large companies or already recognized brands looking link its image with natural products.¹

Seeking to meet the market and the consumption demand, raw materials manufacturers present daily new alternatives to develop more suitable cosmetics to meet the market ambition.⁴ In this context, the development of new vehicles for dermatological use and the use of biotechnological actives in cosmetic formulations are receiving particular attention from the industry.^{5,6,7} The possibility of formulating products with dermatological actives with very specific and / or multifunctional sites of action, besides the increasing appeal for "natural" and more and more frequent, concepts such as "biocompatible", "biodegradable" and "dermocosmetic". These terms outline the presence of active molecules obtained from natural sources, such as microorganisms and plants, in preparations for face, body and hair in the cosmetic market worldwide. Many of these products are called cosmeceuticals, which refers to the concepts of cosmetic product in combination with pharmaceutical product.

Enzymes, coenzymes and enzymatic cofactors are extensively investigated and it is possible to find, in the market, many products containing these actives for many different purposes: acne treatments, minimizing aging signs, oral hygiene, hair dyes, hair removal coadjuvant, preservatives and the treatment of dandruff, among others.^{7,8} Another important point to emphasize is the use of enzymes as promoters of absorption, through the keratolytic actions on the proteins and indirectly affect also the lipids content, trough the cleaning of the skin.^{9,10}

The global market of enzymes is estimated at around US\$ 1.5 billion and is expected to grow by 5-10% annually.⁷ Research on the metabolism of several microorganisms increases the number of enzymes with potential for use in several applications, including cosmetics.^{6,11}

Among the biotechnological actives with cosmetic and pharmaceutical properties, one class that stands out is the research on microbial proteases^{7,12,13,14} which is justified by the fundamental role that these enzymes represent in several intra and extracellular regulation mechanisms. Many microorganisms have also been identified as producers of human useful enzymes and coenzymes, not only naturally, but also by means of genetic modification through molecular biology.^{15,16}

2. MICROBIAL PROTEASES

Traditionally, the processes used in industry for cosmetics production involve reactions of hydrolysis and interesterifications. The limitations of these processes are associated with the types of chemical catalysts employed which are not very versatile and require high temperatures and pressure to achieve a reasonable reaction rate. In this context, emerged the enzymatic technology is an attractive alternative, especially due to the advantages of this route, such as high catalytic efficiency, selectivity and productivity, lower energy consumption, reduced waste production and performance in mild temperature (30 - 70 °C) and atmospheric pressure conditions.^{5,7,15}

Various fermentative processes are used to obtain microbial products, specially, proteases, such as keratinases.^{17,18} These enzymes may be associated with these actives in order to present synergism or even an innovative mechanism of action.¹³

Due to its specificity upon keratin, keratinases are the most potential enzyme for topical human application because they can replace traditional actives which present toxic and sensitizing potential.

Although several research groups have been working on keratinases the main focus is on hide dehairing and not on cosmetic/dermatological. In this context, we may present the works done by Cai et al.¹⁹ which report the production of keratinase through mutant strain of *B. subtilis*, which degrade feathers, hair, silk and wool. Also, a *B. subtilis* strain produces a keratinase able to remove hair from bovine hide, but with the differential of preserving collagen fibers.^{20,21} Radha and Gunasekaran²² cloned and expressed genes related to the keratinase in *B. megaterium*, another work describes keratinase obtained from *Streptomyces sp.* and its great potential in biotreatments, in particular in degrading feathers;²³ Riffel and Brandelli²⁴ isolated bacteria that produce keratinase which potential for biotechnological application in processes related to hydrolysis of keratin. Mazzoto et al.¹⁷ worked with human hair, yeast extract and *B. subtilis* for the production of the keratinase, pointing its use in cosmetics.

3. ENZYMOCOSMETICS

The study of enzymes in the cosmetic area is called enzymocosmetics, which can be direct or indirect.⁵ Direct enzymocosmetics is when the active enzyme is incorporated directly in the cosmetic product and the indirect enzymocosmetics is when the final product contains substances such as cofactors, coenzymes and enzymatic modulators in order to influence cellular process. Examples of actives in the direct enzymocosmetics: superoxide dismutase (combat free radicals);²⁵ keratinases and other proteases (promote non-irritative biological peeling, cleaning and progressive epilators); lipase and hyaluronidase in auxiliary products of the treatment of cellulitis; among others. In indirect enzymocosmetics we can cite: inhibitors of the metalloproteinases (avoiding the degradation of macromolecules of the extracellular matrix, such as collagen and elastin); inhibitors of the 5-alpha-reductase (regulators of sebaceous secretion) and inhibitors of the tyrosinase (pigment remover); among others.^{5,26}

The skin acts as a barrier to exclude the penetration of substances, however it is a selective and semi-permeable barrier. Substances with low molecular weight and high lipophilicity permeate easily through the skin, and can act at the dermal level as

well as systemically. In general, enzymes do not penetrate the skin, since they have high molecular weight and are weakly lipophilic.⁵ They act for a short time on the skin external surface, each enzyme acts only upon a specific substrate.⁵ Thus, the risk of systemic action is virtually discarded at the same time its selectivity of action avoids sensitizing or not expected reactions, as well as their occurrence outside the site of action.

In dermatology,¹¹ enzymes have been used for many years for numerous purposes, such as preparing the damaged skin surface to receive surgical grafts, cleaning infected wounds and aiding in the removal of hyperchromic stains.^{26,27} Regarding cosmetic, since the 1960s the research on enzymes increased and several enzymatic products were released on the market, all with some gain in safety,²⁸ specificity of action or multifunctionality when compared to traditional products available. Since, the enzymes have been already used in products with the most different objectives and the actions:

- (i) specific reactions that facilitate or hinder the skin biochemical reactions;
- (ii) to protect and/or repair the skin,
- (iii) to destroy or remove intentionally, partially or totally some of the structures of the skin.²⁹

As seen, there are numerous applications of enzymes in cosmetology, including dermatological aesthetic and the preparation of the so-called "cosmeceutics" or "dermocosmetics" as summarized in Table 1.

Table 1: Examples of patents related to the use of enzymes in cosmetic products^{5,30}

Patent	Depositor	Year	Description
US5476607	Warner Lambert Co	1993	Effervescent Powder for cleaning dentures with proteolytic enzymes
FR2725898	L'Oreal	1994	Bottle A (precursor of hidroxiacid) + Bottle B (lipase): a mixture of both at the time of the application, thus generating a hidroxiacid for combating the aging
FR2719215	Yves Rocher	1994	Lipase for use in capillary treatment of seborrhea
E710478	L'Oreal	1994	Lipase associated with the C2-C25 esters as despigmentation
WO9507686	Unilever PLC	1995	Proteases for the care of dry skin
US5441740	Longevity Network Ltd	1996	Papain, bromelain and alpha-hidroxiacidos for skin care
WO97444005E	Protopapa et al	1997	Proteolytic enzymes incorporated in depilatory microemulsion
WO9830682	Novo-Nordisk	1998	Enzyme coupled with a polymer for skin care
WO9906071	Procter & Gamble Co.	1999	Proteases combined with polymer, with low allergenicity
WO9936036	L'Óreal	1999	Dye hair containing laccase as oxidant
EP970691	L'Óreal	2000	Lipase with precursor of vitamin and alcohol fatty
EP1004289	Pugliese, PT and Pugliese, S.M	2000	Preparation for skin care containing catalase
PI0115182-7 A2	Biolab Sanus Farmacêutica Ltda	2001	Composition of the substance carried-based products of papain and hyaluronidase
PI0312369-3 A2	Mölnlycke Health Care AB (SE)	2003	Glutathione bandages for skin
US6537328	L'Óreal	2003	Laccase in hair dyes oxidative
PI0518050-3 A2	MEDIWOUND LTD	2005	Bromelain debridement of wounds and bedsores
PI0405446-6 A2	Visufarma S.R.L. (IT)	2004	Coenzyme Q10 as agent in cell antiapoptotic and skin tissues or adipose
PI0501128-0 A2	Helena R. B. Lima (BR/MG)	2005	Reducing lotion with papain and thiomucase
PI0705452-1 A2	Marisa G. Cunha (BR/SP)	2007	Blocking lotion 5-alpha reductase for acne treatment
902312-7 A2	Fapesp USP	2009	Hyaluronidase microencapsulated for tissue repair

3.1. Applications – Enzymes and Coenzymes

Skin aging and cellular epidermis renewal: The skin aging and skin cell renewal, through the modulation of metalloproteinases can be offset chemical actions that occur in the extracellular matrix and in the dermal-epidermal junction, molecules such as collagen, elastin and glycosaminoglycans to degrading a greater or lesser degree. Also, through the modulation of proteases with functionalities different becomes possible to increase the cohesion of the skin cells or desquamating dead cells.^{8,31} General examples: proteolytic enzymes trypsin, papain and bromelain; among others,⁵ coenzyme Q10 and superoxide desmutase (prevent the effects of aging caused by the sun, is antioxidant);^{23,32} MDI Complex[®] (an inhibitor of matrix metalloproteinases 2, 5 and 9); Arazyme[®] (metalloproteinase exocelular obtained by biotechnological process from a bacterium symbiotic to a spider).⁵

Depilatory Products: depilatory products are used by women and men and many techniques and formulations were developed for the removal of hair, which can be classified into three main methods:

- (i) chemical methods (powders, pastes, creams, gels),
- (ii) physical methods (sandpaper, razor blades, clamps, waxes, electrical epilators) and
- (iii) cosmiatric methods (laser, electrocoagulation, electrolysis).⁴

The enzymatic agents are part of the group of chemical depilatories, along with the alkaline agents and the reducer agents. Commercially, there are products that combine mixtures of these agents to obtain preparations that have effectiveness, synergism of action and organoleptic characteristics, with the cosmetic acceptance, because they are easier to be perfumed than those that have thioglycollate as single agent in its composition, which confers strong smell of sulfur.⁴

Papain and bromelain are the most used enzymes in these formulations.^{33,34} Unfortunately, products that contain only these enzymes act very slowly, although progressive, so that they are suggested simply for prolonging the effects of some other depilatory methods or even after the use of alkaline agents or reducing agents. There is not yet a product based exclusively on enzymes which efficient enough to discard the use of other methods or depilatory agents. It is known that depilatory creams based on the action of tioglycolics alter the functional barrier of the epidermis, acting as promoters of permeation of drugs,⁹ however this is not desired or expected for a cosmetic product.

Degradation of the hard keratin of the hair by enzymes is possible by using protein reductase, keratinase and papain.³⁵ These enzymes facilitate the process of removing hair, through the dissolution of the hair constituents, and also act on the proteins of the skin to facilitate the process.

Enzymes in products for hair and scalp: transhydrogenases and reductases inhibitors can be used in hair straightening and hair perm, replacing the alkalis and other agents of traditional preparations. The action of enzymocosmetics is softer, but safer, since the traditional formulas may, if inadequately used, destroy the hair and cause serious burns in the scalp. Lipases and proteases may be assist in treating hair and scalp dandruff and laccase for use in products for hair dyeing.^{7,35}

Other applications: enzymocosmetics may also be used as additives in hair dyes; as preservatives in cosmetics; as enzymatic moderators in deodorants; in products for the treatment of acne and skin cleansing, as promoters of skin absorption and oral hygiene.

From the technological point of view, there are several critical aspects that may affect the enzyme stability and action,^{11,36} as well as contribute or not for the viability of the formula for the large scale production:

(i) Physico-chemical characteristics of the enzyme: molecular weight, character hydrophilic-lipophilic molecule, optimal pH for activity, stability under the heat and under normal conditions of storing the cosmetic product;^{5,13,37}

(ii) Vehicle to be used: it must be inert to the enzyme, ensure homogeneity of the enzymatic activity on the surface to be treated; be appropriate to the final consumer, be of easy application and stable;¹³

(iii) Characteristics of the final product: compatibility with the pH of the site of application and with the best pH of the enzyme, low allergenicity and irritation in topical application;^{5,13}

(iv) Economic and technological viability and nature of the substrate, the route of obtaining the enzyme, cost of production, analysis of the need for the use of biotechnology for the production of a stable enzyme system.^{5,36}

In spite of so many aspects to consider, the use of enzymes in the production of topical products, cosmetic or dermatological, is one of the interests of research that is increasing.

These are mainly due to major advances in the biotechnological area, which facilitated the process of identification, purification and characterization of enzymes.³⁹ In addition, better knowledge and use of molecular biology techniques enabled the optimized production and large-scale, through the use of recombinant proteins and gene expression in microorganisms.^{7,10}

At the same time, or new technologies emerge and are enhanced to incorporate enzymes in skin formula, in order to correct the critical technology. For this, there are the forms of liposomes, nanoparticles, nanocapsules and polymeric matrices, among others protectors agents.^{13,35,38} These forms can bring significant improvements in thermostability and storage stability, opening the way for a broad overview of biotechnology and pharmaceutical applications.³⁶

CONCLUSIONS

Considering all aspects presented in this review, involving microbial, biotechnological and pharmaceutical advances needed points to the importance of integration of various areas in search of technological development. The use of natural assets and specificity of action add value to products and brands of cosmetics, being useful to both niche markets, for the mass market or even for the luxury market. In this segment, the enzymes from microbial sources have great potential because of its specificity of action, possibilities of scaling up and application in various products for skin care, along with the dynamism of this area.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge MCT/CNPq, NANOBIOTEC Brasil from CAPES and CNPq (Jovens Pesquisadores em Nanotecnologia and Edital Universal 2009) and FAPERGS for financial support.

REFERENCES

- 1 Hiratuka C, Araujo RD, Mello CH, Casadei J. Sectoral Monitoring Report (Vol. II): Cosmetics. Agreement ABDI and UNICAMP. São Paulo, Dez, 2008.
- 2 Moraes R. Market trends – Cosmetics – Biotechnology and natural assets based record sales. Rev. Quim. Der. 2008; ed. 477
(<http://www.quimica.com.br/revista/qd477/cosmeticos/cosmeticos01.html>).
- 3 Brandt FS, Cazzaniga A, Hann M. Cosmeceuticals: current trends and market analysis. Seminars Cutaneous Medicine Surgery, 2011; 30(3): 141-3.
- 4 Santos H. Depilatórios e Epilatórios: Técnicas de remoção de Pelos. Cosmetic & Toiletries, Ed. Tecnopress, Mai/Jun, 2007.
(http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/ct_exibir_materia.php?id_materia=23)

- 5 Santos PN, Velasco MVR, Villa ALV, Simões SI. Enzimas na indústria de cosméticos. In: BON, Elba Pinto da Silva Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 333-348.
- 6 Mohorcic M, Friedich J, Renimel I, André P, Mandin D, Chaumont JP. Production of a Melanin Bleaching Enzyme of Fungal Origin and Its Application in Cosmetics. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2007;12: 200-6.
- 7 Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv* , 2005; 23: 471–99.
- 8 Smith WP, Bishop M, Gillis G, Maibach H. Topical proteolytic enzymes affect epidermal and dermal properties. *Int J Cosmet Sci*, 2007; 29: 15-21.
- 9 Lee JN, Jee SH, Chan CC, Lo W, Dong CY, Lin SJ. The effects of depilatory agents as penetration enhancers on human stratum corneum structures. *J Invest Dermatol*, 2008; 128, 2240-7.
- 10 Gupta R, Tiwary E. Subtilisin-g-Glutamyl Transpeptidase: A Novel Combination as Ungual Enhancer for Prospective Topical Application. *J Pharm Sci*. 2010, 99(12). doi 10.1002/jps.22199.
- 11 Ferrer M, Martinez-Abarca F, Golyshin PN. Mining genomes and “metagenomes” for novel catalysts. *Cur Opin Biotech*. 2005; 16: 588-93.
- 12 Fein H, Maytin EV, Mutasim DF, et al. Topical protease therapy as a novel method of epidermal ablation: preliminary report. *Dermatol Surg*. 2005; 31: 139-48.
- 13 Sundararajan S, Kannan CN, Chittibabu S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: potential application as a dehairing agent. *J Biochem Bioeng*, 2011; 111(2): 128-33.

- 14 Sim YC, Lee SG, Lee DC, Kang BY. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. *Biotechnol Lett*, 2000; 22:137–40.
- 15 Luoma S, Peltoniemi K, Joutsjoki V, et al. Expression of six peptidases from *Lactobacillus helveticus* in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 1232-8.
- 16 Snellman EA, Colwell RR. *Acinetobacter* lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004; 31: 391-400.
- 17 Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Braz J Microbiol*, 2002; 33: 213-8.
- 18 Mazotto AM, Lage Cedrola SM, Lins U, Rosado AS, Silva KT, Chaves JQ, Rabinovitch L, et al. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Letters Appl Microb*, 2010; 50: 89-96.
- 19 Cai C, Lou B, Zheng X. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2008; 9(1): 60-7.
- 20 Macedo AJ, Silva WOB, Termignoni C. Properties of a non collagen-degradin *Bacillus subtilis* Keratinase. *Can. J. Microbiol.*, 2008; 54: 180-188.
- 21 Macedo AJ, Silva WOB, Gava R, Driemeier D, Henriques JAP, Termignoni C. Novel Keratinase from *Bacillus subtilis* S 14 Exhibiting Remarkable Dehairing capabilities. *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71(1): 594-6.
- 22 Radha S. Gunasekaran P. Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. *J Appl Microbiol*, 2007;103:1301-10.

- 23 Tatineni R, Doddapaneni KK, Potumarthi RC, Vellanki RN, Kandathil MT, Kolli N, et al. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. *Bioresour. Technol.* 2007, doi:10.1016/j.biotech.2007.04.019.
- 24 Riffel A, Brandelli A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Braz Journal Microbiol*, 2006; 37: 395-9.
- 25 Lods, Dres, Johnson, Scholz & Brooks. The future of enzymes in cosmetics. *Int J Cosmet Sci*, 2000; 22: 85-94.
- 26 Macrini DJ, Suffredini IB, Varella AD, Younes RN, Ohara MT. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. *Braz J Pharm Sci*, 2009; 45(4): 715-21.
- 27 Brenda. The comprehensive enzyme information system. <http://www.brenda-enzymes.org/> (2008). Accessed Jun 2011.
- 28 Howard KL. The use of enzymes cosmetics. *J.Soc. Cosm. Chemists*, 1962; 13(1): 59-63.
- 29 Santos EP. Uso de enzimas em cosméticos. VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – Enzitec, Rio de Janeiro, 2004.
- 30 Instituto Nacional de Pesquisa Indústria. <http://www.inpi.gov.br/>. Acessado em outubro 2011.
- 31 Forestier JP. Review – Les enzymes de l'espace extra-cellulaire du stratum corneum. *Int J Cosmet Sci*, 1992; 14: 47-63.
- 32 Hsu CH, Cui Z, Mumper RJ, Jay J. Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS PharmSciTech*. 2003; 4(3): E32.

- 33 Traversa E, Machado-Santelli GM, Velasco MVR. Histological evaluation of hair follicle due to papain's depilatory effect. *Int J Pharmac.* 2007; 335: 163-66.
- 34 Protopapa EE, Gaissert H, Xenarkis A, Avramiotis S, Stavrianeas N, Sekeris C et al. The effect of proteolytic enzymes on hair follicles of teragenic mice expressing the lac Z-protein in cells of the bulge region. *Eur Acad Dermatol Venereol*, 1999, 13(1): 28-55.
- 35 Couto SR, Herrera JLT. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv* , 2006; 24:500–13.
- 36 Villalonga R, Cao R, Fragoso A. Supramolecular Chemistry of Cyclodextrins in Enzyme Technology. *Chem. Rev.*, 2007; 107: 3088-116.
- 37 Jaouadi B, Abdelmalek B, Fodil D, Ferradji FZ, Rekik H, Zarai N. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. *Biores Technol* 2010; 101: 8361–69.
- 38 Konwarth R, Karak N, Rai SK, Mukherjee AK. Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase. *Nanotechnol* 2009; doi: 225107/IOP Publishing (10pp).

3.1 Objetivo Geral:

Desenvolver formulações de uso tópico contendo queratinases microbianas para uso humano.

3.2 Objetivos específicos:

- Rastrear e selecionar microrganismos produtores de enzimas queratinolíticas;
- Produzir, por via microbiana, queratinases de alta atividade avaliando a influência de diferentes substratos e parâmetros no cultivo;
- Avaliar a atividade dos sobrenadantes da cultura antes e após incorporação em veículo à base de dispersões (gel e gelcreme);
- Delinear e definir a forma e fórmula farmacêutica (produto cosmético grau de risco 2 de acordo com definição da ANVISA);
- Avaliar a penetração de fármaco (*in vitro*) e alterações nas propriedades da pele (*in vivo*) após tratamento com gelcreme contendo queratinase.

-

4. PARTE EXPERIMENTAL

Microrganismos e identificação molecular

As bactérias utilizadas nesse trabalho são oriundas da coleção de microrganismos do nosso laboratório, provenientes de amostras coletadas em dois locais diferentes: resíduo de aviário em Nova Petrópolis, no estado do Rio Grande do Sul e oriundos de solo sob carcaça bovina em Franca, no estado de São Paulo. O isolamento foi realizado em meio seletivo ágar farinha de pena (5% m/v) e os isolados obtidos foram denominados com os seguintes prefixos: NP e FCA (oriundos da amostra de Nova Petrópolis e Franca, respectivamente).

Os isolados foram identificados por coloração de Gram e filogeneticamente através do sequenciamento do gene 16S rRNA. A amplificação do gene foi realizada utilizando a técnica de PCR através do uso dos primers universal F8-27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3') e R1541-1522 (5'-AAGGAGGTCCAGCCGCA-3'). As reações foram realizadas em sequenciador de DNA / nucleotídeos Applied Biosystems 377 e as sequências finais foram alinhadas pelo programa SEQUENCHER Version 4.0.5 (Gene Codes Corporation, USA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

A manutenção dos microrganismos foi realizada conforme protocolos de rotina do laboratório.

Seleção do meio de cultura para pré-inóculo

Dois meios foram avaliados para servirem de pré-inóculo das culturas: caldo Luria-Bertani (LB, 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio) e meio R2A (0,05% de extrato de levedura, 0,05% peptona, 0,05% dextrose, 0,05% de amido solúvel, 0,03% de fosfato de potássio dibásico, 0,05% de sulfato de magnésio). Foram distribuídos 10 mL de cada meio em tubos de ensaio, em duplicata. A seguir, as culturas foram inoculadas e os tubos foram para a agitação a 200 rpm e 30 °C. Alíquotas de 200 µL foram coletadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e procedeu-se à leitura da densidade ótica em espectrofotômetro em 600 nm.

Influência de parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção enzimática

Os microrganismos isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de produção de queratinase através de ensaio com azul de queratina (Macedo *et al.*, 2008). O pré-inóculo de cada microrganismo foi realizado cultivando-os em caldo LB a 200 rpm e 30 °C por 18 horas. Adicionou-se 1 mL de cada pré-inóculo diretamente a um tubo com 20 mg de Keratin azure[®] e 4 mL de tampão fosfato pH 7.0 e os mesmos foram submetidos à agitação em 200 rpm a 30 °C. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e a absorbância foi avaliada em 595 nm.

A partir dos testes anteriores, selecionamos três amostras de cada região, totalizando seis amostras. Com o intuito de verificar a influência de outros meios de cultivo na produção de queratinase procedemos ao cultivo dos seis isolados, individualmente, em três distintos meios contendo: fios de cabelo humano (CB), farinha de pena (FP) e o meio LB. A escolha dos meios seguiu critérios diversos, conforme explicado nos parágrafos seguintes. Todos os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

A farinha de pena é um resíduo proveniente da indústria aviária. Sua composição é de cerca de 90% de queratina. É sabido que diversos microrganismos que produzem enzimas proteolíticas podem utilizar pena ou sua farinha como fonte de nutrientes. A farinha de pena foi utilizada na concentração de 20 g/L em tampão fosfato pH 7.0, 10 mM e foi delipidada com éter de petróleo e lavada exaustivamente com água até a total eliminação do éter e seca em estufa a 50 °C. Os fios capilares utilizados no experimento foram coletados em ambiente comercial de corte de cabelos profissional, tendo sido observado se tratar de cabelo que não tinha passado por nenhum procedimento químico. Previamente ao seu uso, os fios foram desengordurados com éter de petróleo e acetona, lavados com água deionizada associada com detergente e postos para secar em estufa. Os fios de cabelo foram utilizados na concentração de 20 g/L em tampão fosfato pH 7.0, 10 mM. O cabelo foi utilizado como fonte de carbono e nitrogênio, visando o desafio ao microrganismo para a produção de queratinase sobre a fonte original a ser degradada. O meio LB é considerado um meio bastante nutritivo e é muito usado para cultivos de rotina de microrganismos de modo geral.

Os pré-inóculos de cada isolado foram preparados pelo crescimento por 18 horas em tubos contendo 2 mL de caldo LB em 200 rpm a 30 °C. Para cada Erlenmeyer contendo 50 mL de meio inoculou-se 2 mL de pré-inóculo. Todos os testes foram feitos em duplicata. Alíquotas de 2 mL foram coletadas no tempo 0, 24, 48 e 72 horas, centrifugadas a 10.000 rpm e o sobrenadante foi congelado para posterior ensaio da atividade queratinolítica frente a dois substratos (adaptado de Macedo *et al.*, 2008):

(i) Azoqueratina: nesse experimento, alíquotas dos sobrenadantes coletados de cada ensaio são centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm. A atividade queratinolítica é testada adicionando 100 µL da amostra sobre uma suspensão de azoqueratina (1,5% de azoqueratina em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8.0) por 15 minutos a 50 °C. A reação é interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético a 30%. O controle consiste na adição de 100 µL de água deionizada em substituição da amostra. A seguir, a amostra é centrifugada a 11.000 rpm por 10 minutos e a leitura da absorbância é feita em 440 nm utilizando SpectraMax[®] M2/M2[®] (Molecular Devices, EUA). Todos os ensaios sobre a azoqueratina foram realizados em quadruplicata.

O substrato azoqueratina é preparado no próprio laboratório a partir de farinha de pena. A mesma é colocada em um béquer com éter e submetida à agitação para a remoção da gordura e depois lavada com água para a remoção do éter. A seguir, é colocada para secar em estufa a 50 °C por 18 horas. Então, nitrogênio líquido é adicionado à farinha e a mesma é triturada e colocada em estufa novamente. A suspensão de azoqueratina foi preparada com 0,75 g de azoqueratina e 50 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0. Dessa suspensão, pipeta-se, sob agitação constante, 500 µL para eppendorfs individuais, os quais ou são imediatamente utilizados ou são congelados para posterior utilização.

(ii) Azul de queratina: nesse experimento o substrato é Keratin azure[®] (lã de ovelha impregnada com corante azul - Sigma-Aldrich). O resultado do ensaio é baseado na reação da amostra com a lã, onde há liberação de cor azul para o meio, sendo que a intensidade da cor é proporcional à atividade enzimática da queratinase. Para cada tubo com 200 µL de amostra e 800 µL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8.0, utiliza-se 4 mg Keratin azure[®] (em alguns experimentos, alteramos alguns

parâmetros; nesses casos, a especificação aparece junto com a descrição do experimento nos resultados ou nos materiais e métodos). Os tubos reacionais são incubados por 1 hora, a 300 rpm e 50 °C e a reação é interrompida ao colocá-los em banho de gelo. A seguir, os tubos são centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm e a leitura da absorbância é feita em 595 nm utilizando SpectraMax[®] M2/M2[®] Molecular devices, EUA). Todos os ensaios em azul de queratina foram realizados em triplicata.

Em princípio, priorizamos o uso do substrato azul de queratina para os ensaios de atividade, mas ao recebermos novos lotes do reagente tivemos resultados discrepantes, o que nos levou a optar pelo substrato azoqueratina em muitos ensaios. Para podermos comparar um resultado frente a um substrato verso o outro, estabelecemos uma relação, onde 1U em azoqueratina equivale a 2,5U de atividade em azul de queratina.

Com o intuito de otimizar a execução de experimentos realizou-se um planejamento experimental Plackett-Burmann para verificar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

O planejamento Plackett-Burmann consiste em um número mínimo de ensaios que devem ser feitos conforme o número de fatores que se deseja estudar, calculando o efeito de muitas variáveis (independentes) ao mesmo tempo. Assim, reduz-se o custo e o tempo de pesquisa quando comparado com um método tradicional de testar uma variável por vez (Stowe e Mayer, 1966). Para tal, uma matriz é montada com sinais positivos (indicando o limite superior, nesse caso representando a presença ou concentração mais alta da variável) e sinais negativos (indicando o limite inferior, no caso, representando a ausência ou concentração mais baixa). As matrizes para os experimentos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

O objetivo desse experimento foi aprimorar as condições de cultivo do microrganismo visando obter uma produção maior de enzima. Assim, através das combinações acima citadas foram mensurados, no sobrenadante da cultura, os efeitos dos componentes na produção de queratinase pelos isolados NP5 e S14, sendo, esse último, *Bacillus subtilis*, um isolado de referência do nosso laboratório na produção de queratinase (Macedo *et al.*, 2005). A influência das seguintes

variáveis foi avaliada: farinha de pena, glicose, extrato de levedura e proteína de soja. O experimento foi realizado em duas etapas: (i) concentração mais alta/mais baixa e (ii) ausência/presença, para cada um dos dois isolados, totalizando quatro experimentos.

Os critérios utilizados para a avaliação dos resultados foram a percepção visual da degradação dos componentes insolúveis dos meios (farinha de pena e proteína de soja) e o cálculo do efeito dos componentes que influenciaram positivamente a produção de queratinase.

Tabela 1. Matriz +/- de PB de 8 experimentos para avaliação de até 7 variáveis (adaptado de Stowe e Mayer, 1966).

Ensaio	Farinha de pena	Glicose	Extrato de levedura	Proteína de soja	B1*	B2*	B3*
1	2%	0,2%	0,1%	2%	-1	1	1
2	2%	2%	0,1%	0,2%	1	-1	1
3	2%	2%	1%	0,2%	-1	1	-1
4	0,2%	2%	1%	2%	-1	-1	1
5	2%	0,2%	1%	2%	1	-1	-1
6	0,2%	2%	0,1%	2%	1	1	-1
7	0,2%	0,2%	1%	0,2%	1	1	1
8	0,2%	0,2%	0,1%	0,2%	-1	-1	-1

* onde, B1, B2 e B3 são variáveis fantasmas usadas para o cálculo da variância e do erro.

Tabela 2. Matriz ausência/presença de PB de 8 experimentos para avaliação de até 7 variáveis (adaptado de Stowe e Mayer, 1966).

Ensaio	Farinha de pena	Glicose	Extrato de levedura	Proteína de soja	B1*	B2*	B3*
1	sim	não	não	sim	não	sim	sim
2	sim	sim	não	não	sim	não	sim
3	sim	sim	sim	não	não	sim	não
4	não	sim	sim	sim	não	não	sim
5	sim	não	sim	sim	sim	não	Não
6	não	sim	não	sim	sim	sim	Não
7	não	não	sim	não	sim	sim	Sim
8	não	não	não	não	não	não	Não

* onde, B1, B2 e B3 são variáveis fantasmas usadas para o cálculo da variância e do erro.

Em todos os ensaios foram inoculadas 10^8 células por Erlenmeyer, calculado através da medida da densidade ótica em 600 nm de cultura de pré-inóculo em meio

LB, 200 rpm a 30 °C por 18 horas, ressaltando que cada composição de meio teve seu respectivo branco. Para completar o meio de cultura foi utilizado tampão fosfato 10 mM pH 7.0 até o volume final de 100 mL e os frascos foram submetidos à agitação em 200 rpm a 30 °C. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos seguintes tempos: 0, 12, 24, 32, 48 e 96 horas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante congelado. A medida da atividade enzimática do sobrenadante foi realizada através do ensaio com azoqueratina em quadruplicata.

Dentro dessa mesma avaliação da contribuição de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a produção enzimática, realizamos um terceiro experimento, onde a farinha de pena foi utilizada sozinha e em associação com outros componentes. Além disso, mudamos os tempos de coleta, visando obter a melhor relação tempo de cultivo verso produção de queratinase, como uma maneira de otimizar o processo. O pré-inóculo foi feito como citado anteriormente e os meios de cultivo estudados foram:

- (i) Meio 1: 2% farinha de pena em tampão fosfato 10 mM pH 7.0;
- (ii) Meio 2: 0,2% farinha de pena em tampão fosfato 10 mM pH 7.0;
- (iii) Meio 3: 2% farinha de pena, 2% glicose, 0,2% extrato de levedura e 0,2% proteína de soja em tampão fosfato 10 mM pH 7.0;
- (iv) Meio 4: 0,2% farinha de pena, 2% glicose, 0,2% extrato de levedura e 0,2% proteína de soja em tampão fosfato 10 mM pH 7.0.

Nesse experimento realizamos os ensaios com os sobrenadantes do cultivo do isolado NP5 e do isolado S14. Para cada meio ensaiado houve controle individual, o qual continha todos os itens especificados, exceto o microrganismo. Todos foram submetidos à agitação em 150 rpm a 30 °C e o experimento foi conduzido em duplicata. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 24, 28, 32, 48 e 72 horas, centrifugadas a 10.000 rpm e o sobrenadante foi congelado. O ensaio frente ao substrato azul de queratina foi realizado conforme descrito, mas usando 4 mg de Keratin azure[®] com 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.0 por tubo reacional. Os resultados representam a média de triplicatas.

Baseado em dados da literatura, outras condições de cultivo foram ensaiadas para verificar se obteríamos alguma produção surpreendente de enzima. Assim, diversos experimentos foram realizados alterando diferentes parâmetros no cultivo, tais como: adição de mais de um microrganismo no cultivo, variação do pH do meio, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio, velocidade de rotação, presença de cálcio, concentração de farinha de pena pura e associada com outros itens. Nessa fase de experimentação, trabalhamos sempre com inóculos de 10^8 células do isolado quando o cultivo era individual e 10^4 células de cada isolado quando o cultivo era associado (NP5 + S14). Os cultivos sempre foram feitos, no mínimo, em duplicata e os ensaios de atividade frente aos substratos azoqueratina ou azul de queratina foram realizados conforme descritos anteriormente. As demais especificações dos cultivos estão apresentadas junto aos resultados dos mesmos, os quais podem ser vistos nas tabelas 11, 12 e 13.

Produção do extrato bruto

De posse de todos os resultados obtidos padronizou-se a produção do extrato bruto em Erlenmeyer sob agitação e temperatura controladas. O pré-inóculo foi cultivado como citado anteriormente e o meio de cultivo padronizado em 7,5% de farinha de pena, 0,05% de extrato de levedura em q.s. de água deionizada, a 180 rpm e 37 °C pelo período de 72 horas.

Avaliação da atividade dos sobrenadantes de cultura antes e após incorporação em veículos de uso dermatológico e eleição do veículo

O objetivo desse experimento foi verificar se o sobrenadante mantinha a sua atividade queratinolítica mesmo quando incorporado em um veículo dermatológico.

Para tal, o extrato bruto produzido foi centrifugado por uma hora a 10.000 g e as frações enzimáticas foram separadas dos microrganismos por filtração esterilizante em capela de fluxo laminar com filtro de 0,2 μm . A fração livre de microrganismos foi denominada de EE (extrato enzimático), sendo esta fração utilizada em todos os ensaios que seguem. Primeiramente, o EE teve sua ação queratinolítica confirmada através de ensaio (dados não mostrados) com o substrato azul de queratina e, então, foi submetido a novo ensaio frente ao mesmo substrato, mas associado

individualmente com quatro tipos diferentes de gel. Cada dispersão originou um veículo dermatológico, cujas fórmulas são apresentadas na Tabela 3.

O ensaio foi conduzido em quadruplicata e em cada tubo foram pesados 3,2 mg de Keratin azure, 0,4 g de veículo e 0,4 mL de amostra. Cada veículo teve seu controle o qual continha 0,4 mL de água no lugar da amostra. Os demais procedimentos do ensaio foram iguais aos descritos anteriormente.

Tabela 3. Dispersões e suas respectivas fórmulas dermatológicas.

Dispersão	Fórmula*
Gel carbopol[®] = gel de polímero acrílico	Carbopol [®]1,00 (p/p) Germall II [®]0,25 (p/p) Propilenoglicol.....3,00 (v/p) Trietanolamina.....1,40 (v/p) Água deionizada q.s.p.....100 (v/p)
Gel aristoflex[®] AVC = gel de co-polímero sintético de ácido sulfônico acriloidimetiltaurato e vinilpirrolidona	Aristoflex [®]2,00 (p/p) Germall II [®]0,25 (p/p) Propilenoglicol.....3,00 (v/p) Água deionizada q.s.p.....100 (v/p)
Gel de goma xantana[®] = gel de polissacarídeo obtido naturalmente pela fermentação da bactéria <i>Xanthomonas campestris</i>	Goma Xantana [®]2,00 (p/p) Germall II [®]0,25 (p/p) Propilenoglicol.....3,00 (v/p) Água deionizada q.s.p.....100 (v/p)
Gelcreme sepigel[®] = gel de poliacrilamida, isoparafina C13 -14 e 7-láurico	Sepigel [®]2,00 (p/p) Germall II [®]0,25 (p/p) Propilenoglicol.....3,00 (v/p) Água deionizada q.s.p.....100 (v/p)

*Germall II[®] (diazolinidil uréia) é o conservante, o propilenoglicol é o umectante e a água deionizada o excipiente de cada formulação.

Em seguida, realizamos um segundo experimento ensaiando as bases dermatológicas gelcreme sepigel[®] e gel aristoflex[®] avc frente à amostra e à papaína utilizando azoqueratina como substrato para o ensaio. Proteinase K também foi ensaiada frente a azoqueratina. Cabe ressaltar que todos os veículos aqui citados são de uso dermatológico, estão disponíveis comercialmente e são amplamente utilizados em formulações para uso humano, tanto via prescrição médica quanto em produtos industrializados. Foram feitas novas formulações para cada um dos veículos, com ajuste de viscosidade para a realização do ensaio e alterações na

fórmula, onde o EE foi usado como q.s.p. 100% nas mesmas em substituição à água deionizada, conforme segue:

(i) Gel Enzimático (Gel EE):

Aristoflex [®] AVC	0,43 (p/p)
Germall II [®]	0,25 (p/p)
Propilenoglicol	3,00 (v/p)
EE q.s.p.	100 (v/p)

(ii) Gelcreme Enzimático (Gelcreme EE):

Sepigel [®]	0,60 (p/p)
Germall II [®]	0,25 (p/p)
Propilenoglicol	3,00 (v/p)
EE q.s.p.	100 (v/p)

Para este ensaio, pipetou-se em cada tubo de azoqueratina 100 µl de cada amostra/veículo. A papaína também foi incorporada aos veículos gel e gelcreme idem às formulações acima citadas, sendo a única alteração a substituição do EE por q.s. de solução aquosa de papaína a 0,8%. A concentração testada de papaína foi baseada em estudos semelhantes (Traversa, *et al.*, 2003). Todos os ensaios tiveram seus controles onde a amostra (papaína ou EE) foi ensaiada sem o veículo, bem como tiveram seus “brancos” onde as amostras/veículos foram ensaiados somente com azoqueratina mais água em vez de amostra. Para o ensaio com Proteinase K usou-se 25 µl de uma solução padrão a 200 µg/mL mais 75 µl de água deionizada, essa enzima foi ensaiada somente pura, por se tratar de uma referência padrão.

Após a realização dos ensaios com esses veículos e seus adjuvantes dermatológicos, elegemos a fórmula de trabalho para incorporar o EE.

Ensaio biológicos *in vitro*

Nesta etapa, avaliamos *in vitro* a formulação gelcreme + EE. O objetivo do experimento foi inferir o nível de ação da fórmula dermatológica (tópico ou sistêmico) e para isso realizamos o experimento em Célula de Franz Modificada.

Como fármaco modelo foi utilizado o diclofenaco sódico, em duas formulações: (i) associado à formulação gelcreme + EE e (ii) adicionado somente ao gelcreme. As fórmulas e suas características estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Composição e características das fórmulas de Gelcreme de Diclofenaco Sódico e de Gelcreme de Diclofenaco Sódico + EE.

	Fórmula teste	Características
Gelcreme Dic + EE	Sepigel [®] 2%, Germall II [®] 0,25%, Propilenoglicol 3%, Diclofenaco 1,5% e EE qsp 100%	Gelcreme opaco, de cor marrom, odor característico; viscosidade baixa, pH 7,5.
Gelcreme Dic	Sepigel [®] 2%, Germall II [®] 0,25%, Propilenoglicol 3%, Diclofenaco 1,5% e água deionizada qsp 100%	Gelcreme opaco, de cor esbranquiçado, inodoro; viscosidade média, pH 7,5.

O diclofenaco teve sua concentração de uso corrigida para base livre, ressaltando que calculou-se a concentração de saturação do diclofenaco em dois diferentes líquidos receptores: (i) tampão PBS (Ferrante *et al.*, 2010) e (ii) salina fisiológica e etanol a 100% (7:3 v/v), de modo a assegurar a condição *sink* durante todo o experimento. O diclofenaco sódico foi escolhido para avaliar a capacidade da formulação enzimática em alterar a penetração cutânea por tratar-se de um antiinflamatório não esteroide hidrofílico com comprovada penetração através da pele (Lopes *et al.*, 2008).

Inicialmente realizou-se a adaptação da metodologia analítica para quantificação de diclofenaco nas amostras de *tape stripping* (Ferrante *et al.*, 2010). Assim, foi possível estudar a capacidade da formulação enzimática descrita acima de alterar a

cinética e a penetração de fármacos através da pele. Essa técnica se caracteriza por ser minimamente invasiva, na qual o estrato córneo é removido sequencialmente após repetidas aplicações de fitas adesivas, possibilitando determinar a quantidade de fármaco presente na primeira camada da pele (Pinkus, 1951 *apud* Escobar-Chávez *et al.*, 2008). Veículos tópicos convencionais como cremes ou géis, agem predominantemente exercendo o seu efeito ao liberar o fármaco na superfície da pele e as moléculas, então, se difundem para as demais camadas. O método mais utilizado para determinar essa difusão molecular é o de Células de Difusão de Franz, pois apresenta resultados confiáveis e de baixo custo (Sartorelli *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2001). A extensão e a duração da difusão dependem das características físico-químicas do próprio fármaco (Foldvari, 2000). Geralmente, em experimentos *in vitro*, utilizando-se Células de Difusão de Franz para a realização de *tape stripping*, são utilizados um compartimento doador, uma membrana natural (pele de porco) e um compartimento receptor, conforme esquema apresentado na Figura 1.

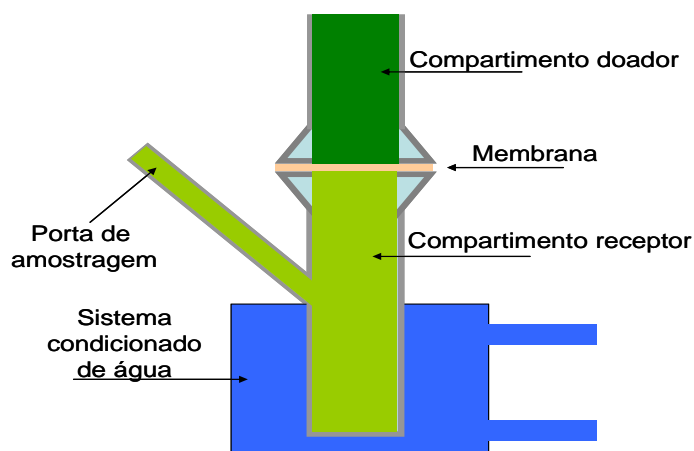


Figura 1. Esquema representativo da Célula de Difusão de Franz. A seta indicando a membrana mostra o local onde a pele de porco preparada para o ensaio é inserida.

As peles de porco foram adquiridas frescas diretamente em frigoríficos da região e passaram por um processo de preparação antes de serem utilizadas. Elas tiveram seus pelos removidos e foram lavadas com solução de lauril sulfato de sódio (1% m/m). A gordura remanescente no lado dérmico da pele foi removida com éter. A pele foi, então, lavada com água Milli-Q e recortada em pedaços de dezesseis centímetros quadrados de tamanho (4 x 4 cm), embaladas e congeladas na

temperatura de $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso. Apenas as peles intactas foram utilizadas. A espessura dos cortes de pele foi determinada com auxílio de paquímetro (Mitutoyo) em 1,8 mm.

No momento da utilização, as peles foram descongeladas e colocadas na Célula de Difusão de Franz com o lado dérmico da pele exposto para o fluído receptor e o estrato córneo em contato com o compartimento doador. A área nominal da pele foi de 16 cm^2 e o volume do compartimento receptor foi de 45 mL. O fluído receptor era composto por salina fisiológica e etanol a 100% (7:3 v/v). Após a pele ser colocada na Célula de Franz, uma quantidade pesada de amostra (4 mg de formulação / cm^2 de pele) foi aplicada na superfície da mesma com o auxílio de espátula. As células foram imersas em banho de água a $37,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o fluído da câmara receptora foi mantido em agitação constante com o auxílio de um agitador magnético, permanecendo assim por intervalos de tempos pré-definidos (15 minutos, 1, 2, 4 e 12 horas). Decorrido o tempo estipulado, as células foram removidas do banho e quantificou-se a concentração de diclofenaco sódico no compartimento receptor da Célula de Franz através da coleta de uma alíquota do mesmo. Também quantificou-se o diclofenaco nas camadas da pele através da aplicação das fitas de *tape stripping* e, também, na espátula usada para a aplicação. Esse ensaio foi repetido, no mínimo, seis vezes para cada tempo e para cada uma das formulações. A técnica de *tape stripping* é detalhada no próximo parágrafo.

A determinação da presença do fármaco no estrato córneo foi realizada conforme previamente descrito (Lboutounne *et al.*, 2002; Fresno-Contreras *et al.*, 2005; Felippi, 2008). Resumidamente, camadas consecutivas do estrato córneo são separadas da pele através da aplicação de sucessivas *tape-strippings* com fitas adesivas (Scotch 3M-19x40 mm) para cada amostra, segundo procedimentos estabelecidos (Pinkus, 1951 *apud* Escobar-Chávez *et al.*, 2008). A primeira *strip* é considerada como a quantidade de diclofenaco sódico que não penetrou no estrato córneo. Em nosso experimento padronizamos o uso de 20 *tapes stripping*s por célula, de tamanho 2 x 5 cm, após um experimento piloto. Elas foram agrupadas da seguinte maneira: 1ª a 5ª individualmente; da 6ª a 17ª em duas-a-duas e a 18ª, 19ª e 20ª juntas num único tubo. Em seguida, foram dissolvidas com 4 mL de acetonitrila para extrair o diclofenaco sódico. As amostras foram submetidas ao aparelho vórtex

por 3 minutos, seguida de ultra-sonicação por 20 minutos e filtração. As amostras contidas em cada tubo foram analisadas individualmente por CLAE com método previamente validado. As características do método analítico estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação de diclofenaco no líquido receptor e nas amostras de *tape stripping*.

Característica	Descrição
Coluna	μ Bondapak™ C18 10 μ m 125Å Waters 3.9 x 300mm
Pré-coluna	C8
Fluxo	1 ml/min
Volume de injeção	50 μ l
Detecção	280 nm
Fase móvel	Acetonitrila/água/ácido acético (59:49:2, v/v/v). previamente filtrada em membrana de polivinilideno (0,45 μ m, 47mm, Millipore®).
Equipamento	CLAE (Shimadzu®) composto de: bomba LC-10ADVP, controlador de sistema SCL-10AVP, autoinjeter SIL-10ADVP, detector de fluorescência RF-10AXL, software Shimadzu®, CLASS-VP (versão 6.12)
Curva de calibração	0,05 – 50 μ g/mL
Extração das amostras	Acetonitrila

Os resultados da quantificação de diclofenaco sódico obtidos para cada tempo nas 20 fitas de *tapes* (agrupadas como citado anteriormente) bem como no líquido receptor para cada formulação foram comparados entre si e com os grupos controles através de teste ANOVA multifatorial ($\alpha = 0,05$) no programa SigmaStat versão 3.5 e, também, através dos testes de Levene e de teste não-paramétrico Kruskal-Wallis no Software SPSS versão 18.

Ensaio biológicos *in vivo*

O objetivo desse ensaio foi determinar as ações da formulação enzimática sobre o estrato córneo, principalmente a ação depilatória e, no caso de ação sistêmica, as possíveis alterações causadas no cérebro, rins, coração, pulmões, baço e fígado. Foram utilizados 40 camundongos (*Mus domesticus domesticus*) machos com 60 dias de idade (Traversa *et al.*, 2007), adquiridos da Fundação da Produção e

Pesquisa em Saúde (FEPPS, RS) e mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pesando, em média, 35 g. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas com dimensões de 47 x 34 x 18 cm (com dois a cinco animais por caixa), em ambiente com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas e fotoperiodicidade de 12 / 12 horas. Os animais tiveram acesso livre à alimentação (ração comercial Nuvital[®]) e água. Os experimentos foram realizados durante o período diurno por 26 dias consecutivos. Amostras foram aplicadas do primeiro ao vigésimo terceiro dia, nos dois dias seguintes os animais não foram submetidos a nenhum procedimento e no vigésimo sexto dia foram sacrificados.

O número de animais em cada grupo foi definido tendo como base estudos semelhantes de outros grupos (Traversa *et al.*, 2007; Garros *et al.*, 2006) e, também, seguindo as recomendações da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development, 2002). Os experimentos foram conduzidos de acordo com a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei N. 11.794 de 08 de Outubro de 2010 e somente após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS.

Os animais foram divididos em quatro grupos com dez animais em cada, onde em três grupos foram utilizadas diferentes formulações e o quarto grupo foi o controle, onde nenhum produto foi utilizado. As amostras aplicadas e suas características estão na tabela 6.

Tabela 6. Grupos de animais ensaiados *in vivo* e a formulação teste correspondente.

Grupo	Fórmula teste	Características
Enzima	Gelcreme Enzimático: Sepigel [®] 2%, Germall II [®] 0,25%, Propilenoglicol 3% e EE q.s.p. 100%.	Gelcreme opaco, de cor marrom, odor característico; viscosidade baixa, pH 6,5.
Papaína	Gelcreme Papaína: Sepigel [®] 2%, Germall II [®] 0,25%, Propilenoglicol 3%, Papaína 1% e água deionizada q.s.p. 100%.	Gelcreme opaco, de cor esbranquiçado, inodoro; viscosidade média, pH 5,5.
Veículo	Gelcreme Veículo: Sepigel [®] 2%, Germall II [®] 0,25%, Propilenoglicol 3% e água deionizada q.s.p. 100%.	Gelcreme opaco, de cor esbranquiçado, inodoro; viscosidade média, pH 6,5.
Controle	Não houve aplicação de nenhum produto.	

Os animais foram anestesiados diariamente para a aplicação da amostra, exceto o grupo controle, o qual era anestesiado somente em dias de fotografia. A anestesia consistia na aplicação intraperitoneal de uma solução combinada composta de 9% de cloridrato de cetamina a 10% com 30% de cloridrato de xilazina a 2% em q.s. de salina fisiológica. A quantidade média usada dessa solução por animal era de 0,2 mL ao dia.

No primeiro dia todos os animais foram anestesiados e tiveram parte do dorso depilado (6 cm²) com cortador de cabelo em nível “zero” seguido do uso de creme depilatório comercial Veet[®] para a remoção dos pêlos remanescentes, inclusive o grupo controle. A seguir, 1 g da formulação foi espalhada delicadamente sobre o lado direito da região dorsal de cada animal. O lado esquerdo foi mantido como controle individual. As formulações foram aplicadas uma vez por dia por um total de 23 dias, com anestesia prévia diária, sendo aplicadas pela mestranda durante todo o experimento. As formulações estavam enfrascadas em embalagens *airless pump* calibradas que dispensam 1 g de produto por jato.

No 26^o dia do experimento, os camundongos foram anestesiados, pesados e sacrificados por deslocamento cervical. Após a eutanásia, o tecido cutâneo da região dorsal dos animais foi cortado e removido com o auxílio de bisturi de lâmina 15. A seguir, o tecido foi repartido entre lado direito e esquerdo e fixado com formol tamponado. Os animais também tiveram os órgãos anteriormente citados extraídos e fixados em formol tamponado para posterior análise histológica. Todas as amostras foram encaminhadas para a análise da histologia no Laboratório de Patologia Veterinária da UFRGS, sob orientação do Professor Doutor David Driemeier. Avaliações qualitativa e quantitativa serão realizadas, segundo moldes já descritos, por Traversa *et al.* (2007) para avaliar eventuais alterações causadas nas estruturas da pele na presença das formulações em teste, quando comparadas com os controles.

As carcaças foram acondicionadas em embalagens plásticas brancas e armazenadas em freezer a -20 °C até o recolhimento pela empresa Aborgama do Brasil, a qual faz o recolhimento direto na própria Universidade.

O nível de severidade dos procedimentos envolvidos foi classificado como leve, pois os procedimentos não acarretaram prejuízos no bem-estar ou nas condições gerais dos animais, possuindo método de sacrifício humanizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microrganismos: identificação molecular, crescimento e atividade queratinolítica

Esse trabalho iniciou com a caracterização de 19 bactérias isoladas em meio seletivo contendo farinha de pena, através da coloração de Gram e da comparação com a sequência do gene 16S rRNA.

A seguir, para a avaliação da atividade queratinolítica dos isolados, estabeleceu-se o melhor meio de cultura para os caldos de pré-inóculo, sendo que todos os microrganismos cresceram no meio de cultura LB, enquanto que no meio R2A não houve crescimento para todos os isolados. Desse modo, padronizamos o caldo LB como o meio escolhido para o pré-inóculo durante todo desenvolvimento da pesquisa. O crescimento foi observado através da turvação do meio e confirmado pela leitura da densidade ótica a 600 nm.

A tabela 7 traz os resultados obtidos e a avaliação da atividade queratinolítica do microrganismo utilizando azul de queratina como substrato para a enzima. Cabe ressaltar que a avaliação inicial de atividade queratinolítica foi feita diretamente com o substrato em contato direto com o meio cultivado da bactéria, não com o extrato enzimático / sobrenadante centrifugado (adaptado de Scott e Untereiner, 2004; Yoshioka *et al.*, 2007).

As bactérias do gênero *Bacillus* sp. foram as bactérias de destaque no rastreamento, tanto pelo número de espécies identificadas quanto pelas atividades obtidas, fato que já era esperado pela referência desse gênero na literatura como um grupo muito hábil na degradação de substratos queratinosos (Kojima *et al.*, 2006; Gupta e Ramnani, 2006) e na produção de proteases. Bactérias Gram-positivas são as mais frequentes produtoras de queratinases (Gupta e Ramnani, 2006). Brandelli e Riffel (2006) também relataram bactérias Gram-negativas produtoras de queratinase.

As três cepas de cada grupo com maior atividade queratinolítica foram NP4, NP5, NP9 e FCA6, FCA8 e FCA10. No entanto, no momento da realização desse ensaio não dispúnhamos do sequenciamento do gene 16S rRNA e a escolha final, então, ocorreu face à diferenças morfológicas das colônias. Assim, devido à similaridade entre as colônias de NP4 e NP9; FCA6, FCA8 e FCA10, as cepas elegidas para os ensaios foram NP4, NP5, NP8, FCA1, FCA3 e FCA8.

Tabela 7: Características e identificação dos microrganismos isolados.

Isolado	Gram	Sequenciamento do gene 16S rRNA	Identidade	Atividade* (24h)	Atividade* (48h)	Atividade* (72h)
NP1	Bacillus G+	<i>Kurthia gibsonii</i>	99%	46	63	86
NP2	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	100%	15	69	105
NP3	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	18	99	118
NP4	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	24	92	138
NP5	Bacillus G+	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	76	125	170
NP6	Bacillus G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	6	28	92
NP7	Bacillus G+	<i>Kurthia gibsonii</i>	99%	45	55	63
NP8	Bacillus G+	<i>Kurthia cereus</i>	99%	48	77	115
NP9	Bacillus G+	<i>Bacillus fusiformis</i>	99%	26	96	152
FCA1	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	20	81	86
FCA2	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	98%	42	47	50
FCA3	Bacillus G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	6	32	72
FCA4	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	5	56	95
FCA5	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	38	74	89
FCA6	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	37	92	132
FCA7	Cocos G+	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	99%	52	33	104
FCA8	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	12	98	121
FCA9	Cocos G-	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	99%	52	56	65
FCA10	Bacillus G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	45	89	108

* 1 U.mL⁻¹.h⁻¹ = aumento de 0,01 unidade de absorvância

Produção de queratinase, avaliação da atividade queratinolítica em diferentes meios e seleção do microrganismo mais ativo

Com seis microrganismos pré-selecionados, procedeu-se a análise de qual possuía a maior atividade queratinolítica utilizando diferentes meios de cultivo: fios de cabelo humano (CB), farinha de pena (FP) e LB. A primeira análise foi feita sobre o substrato azoqueratina e os microrganismos de maior destaque nessa análise foram ensaiados frente ao substrato azul de queratina. Os resultados estão apresentados na Tabela 8 e correspondem à atividade obtida pelo extrato enzimático (sobrenadante).

Tabela 8. Avaliação da atividade queratinolítica dos sobrenadantes de FCA1, FCA3, FCA8, NP4, NP5 e NP8 em diferentes meios frente ao substrato azoqueratina.

CEPA – MEIO	Atividade* média – Azoqueratina		
	24h	48h	72h
FCA1 – CB	1,4 ± 0,12	1,7 ± 0,52	1,8 ± 0,18
FCA1 – LB	0	0	0,5 ± 0,08
FCA1 – FP	1,8 ± 0,08	0,8 ± 0,08	2,1 ± 0,14
FCA3 – CB	0	0	0
FCA3 – LB	1,1 ± 0,24	1,9 ± 0,50	0,6 ± 0,60
FCA3 – FP	0,7 ± 0,30	5,4 ± 0,60	0,6 ± 0,20
FCA8 – CB	2,4 ± 0,60	2,8 ± 0,50	1,7 ± 0,40
FCA8 – LB	1,2 ± 0,14	0,8 ± 0,34	0
FCA8 – FP	6,9 ± 1,30	4,5 ± 0,74	3,5 ± 2,64
NP4 – CB	0	0	3,5 ± 0,60
NP4 – LB	0	0	5,4 ± 0,50
NP4 – FP	0	0	8,0 ± 0,60
NP5 – CB	0	0	3,9 ± 2,50
NP5 – LB	0	6,2 ± 0,06	13,9 ± 1,30
NP5 – FP	11,4 ± 0,01	13,6 ± 0,90	21,8 ± 2,60
NP8 – CB	1,4 ± 0,30	3,7 ± 1,00	1,6 ± 0,20
NP8 – LB	1,4 ± 0,56	7,4 ± 0,44	1,2 ± 0,20
NP8 – FP	2,3 ± 0,32	2,9 ± 0,60	1,4 ± 0,20

* 1 U.mL⁻¹.h⁻¹ = aumento de 0,01 unidade de absorvância

A análise global do experimento mostra que o “meio cabelo” não influenciou significativamente a produção de enzimas pelos isolados, não sendo, portanto, um substrato adequado para esses microrganismos. Scott e Untereiner (2004) relacionam diversos estudos que propõem métodos para medir a degradação de cabelos por fungos queratinolíticos. Infelizmente, até hoje, não há um método padronizado e os resultados são contraditórios. Cai *et al.* (2008) cultivou uma cepa mutante de *Bacillus subtilis* KD-N2 utilizando, individualmente, cabelo e pena, ambos a 37 °C, mas com tempos diferentes para cada substrato: 24 horas para o meio com pena e 72 horas para o meio com cabelo. Dentro das condições do experimento por

ele conduzido, a pena, na concentração de 10 g/L, foi a que induziu a melhor produção de queratinase. Mazotto *et al.* (2010) também utilizou cabelo humano como meio de cultura. Inicialmente, como única fonte de carbono e nitrogênio, cultivando por 8 dias. A seguir, associou com extrato de levedura e foi quando obteve resultados satisfatórios a partir de 4 dias de cultivo. Ainda, Xie *et al.* (2010) teve resultado muito semelhante ao nosso, utilizando cabelo humano como substrato para ensaio com quatro tipos de queratinase e não obteve atividade com nenhuma delas.

Os cultivos em meio LB não tiveram resultados expressivos, exceto para os isolados NP4 e NP5, mas ainda assim, com menor expressão do que em meio de farinha de pena.

O meio farinha de pena 20 g/L em tampão fosfato pH 7, 10 mM foi o melhor substrato para a produção de queratinase e os isolados NP4 e NP5 foram os escolhidos para a etapa seguinte de testes por terem sido os que mais se destacaram na atividade queratinolítica. A farinha de pena é relatada como componente de meios para a produção de queratinase por linhagens de *Bacillus* (Yoshioka *et al.*, 2007) e é um dos substratos queratinosos mais utilizados para a produção desse tipo de enzima, tanto quanto cabelo / pelos, unhas, lã e outros fâneros (Gupta e Ramnani, 2006).

O experimento seguinte consistiu no ensaio com azul de queratina, cujo substrato é disponível comercialmente e usado como uma referência em ensaios desta natureza (Scott e Undereiner, 2004). Os isolados NP4 e NP5 foram cultivados individualmente em dois meios: LB e farinha de pena. Como resultado, somente o sobrenadante do isolado NP5, *Bacillus subtilis*, mostrou atividade: $2,85 \pm 0,13 \text{ U.mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para o meio farinha de pena e $1,55 \pm 0,06 \text{ U.mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para o meio LB (cultivo em 72 horas). Desse modo, NP5 foi o isolado escolhido para o prosseguimento dos estudos.

Influência de parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção enzimática

Através do planejamento Plackett-Burmann, avaliou-se a influência de farinha de pena, glicose, extrato de levedura e proteína de soja na produção enzimática do

isolado NP5 e do S14, sendo, o primeiro, o isolado de destaque no nosso rastreamento e o segundo um isolado de referência produtor de queratinase do nosso grupo (Macedo *et al.*, 2005). A farinha de pena e o extrato de levedura foram escolhidos para comporem os meios por serem fontes tradicionais de carbono e nitrogênio nesse tipo de cultivo; a glicose por ser tanto relacionada como um fator de inibição quanto boa fonte de carbono ou mesmo indiferente para a produção de queratinase (Adinarayana *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2006; Scott e Untereiner, 2004; Gupta e Ramnani, 2006) e a proteína de soja por também ser relatada como bom substrato para a produção de queratinases por microrganismos (Gupta e Ramnani, 2006). Os resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Estudo do efeito de diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio na produção de queratinase pelo isolados NP5 (A e B) e S14 (C e D) através da avaliação da atividade queratinolítica dos sobrenadantes frente ao substrato azoqueratina.

A) Ensaio PB para o sobrenadante de NP5 em matriz +/-

Ensaio		Farinha de pena	Glicose	Extrato de levedura	Proteína de soja	B1	B2	B3	Atividade
1	+	+	-	-	+	-1	1	1	19,8
2	+	+	+	-	-	1	-1	1	17,8
3	+	+	+	+	-	-1	1	-1	22,64
4	+	-	+	+	+	-1	-1	1	25,76
5	+	+	-	+	+	1	-1	-1	18,96
6	+	-	+	-	+	1	1	-1	14,6
7	+	-	-	+	-	1	1	1	7,36
8	+	-	-	-	-	-1	-1	-1	5,68
Efeito	16,57	6,45	7,25	4,21	6,41	-3,79	-0,95	2,21	

B) Ensaio PB para o sobrenadante de NP5 em matriz ausência/presença

Ensaio		Farinha de pena	Glicose	Extrato de levedura	Proteína de soja	B1	B2	B3	Atividade
1	+	sim	não	não	sim	Não	sim	sim	2,96
2	+	sim	sim	não	não	Sim	não	sim	6,92
3	+	sim	sim	sim	não	Não	sim	não	6,4
4	+	não	sim	sim	sim	Não	não	sim	2,96
5	+	sim	não	sim	sim	Sim	não	não	3,76
6	+	não	sim	não	sim	Sim	sim	não	6,52
7	+	não	não	sim	não	Sim	sim	sim	2,4
8	+	não	não	não	não	Não	não	não	3,04
Efeito	4,37	1,28	2,66	-0,98	-0,64	1,06	0,40	-1,12	

C) Ensaio PB para o sobrenadante de S14 em matriz +/-.

Ensaio		Farinha de pena	Glicose	Extrato de levedura	Proteína de soja	B1	B2	B3	Atividade
1	+	+	-	-	+	-1	1	1	5,76
2	+	+	+	-	-	1	-1	1	22,96
3	+	+	+	+	-	-1	1	-1	1,88
4	+	-	+	+	+	-1	-1	1	22,48
5	+	+	-	+	+	1	-1	-1	2,16
6	+	-	+	-	+	1	1	-1	17,8
7	+	-	-	+	-	1	1	1	7,4
8	+	-	-	-	-	-1	-1	-1	9,76
Efeito	11,3	-6,17	10,01	-5,59	1,55	2,61	-6,13	6,75	

D) Ensaio PB para o sobrenadante de S14 em matriz ausência/presença.

Ensaio		Farinha de pena	Glicose	Extrato de levedura	Proteína de soja	B1	B2	B3	Atividade
1	+	sim	não	não	sim	não	sim	sim	4,12
2	+	sim	sim	não	não	sim	não	sim	6,68
3	+	sim	sim	sim	não	não	sim	não	3,48
4	+	não	sim	sim	sim	não	não	sim	0,8
5	+	sim	não	sim	sim	sim	não	não	4,76
6	+	não	sim	não	sim	sim	sim	não	3,72
7	+	não	não	sim	não	sim	sim	sim	2,96
8	+	não	não	não	não	não	não	não	0,56
Efeito	3,38	2,75	0,57	-0,77	-0,07	2,29	0,37	0,51	

Para analisarmos os efeitos encontrados, aplicamos o teste *t* e nenhum dos efeitos foi considerado significativo. Porém, há uma tendência da farinha de pena e da glicose em influenciar o processo. Além disso, a variância foi alta, principalmente nos experimentos +/-, onde o erro também foi maior. Isso se deve ao fato de haver componentes insolúveis nos meios, os quais interferiram na precisão dos testes. Todos os meios ficaram leitosos, proporcionalmente à presença dos compostos insolúveis. Pela avaliação visual comparativa entre o meio com o isolado e seu respectivo branco, foi visível o maior consumo da farinha de pena nos frascos com presença do *B. subtilis* NP5.

Assim, como não houve fator significativo de influência, mas visualmente observamos a diminuição das partículas dos componentes insolúveis, optou-se por fazer um terceiro experimento, considerando a farinha de pena como principal substrato da produção de queratinase.

O experimento avaliou não somente a produção de queratinase no meio com farinha de pena associada à proteína de soja, glicose e extrato de levedura, mas também a produção obtida em meio que só continha farinha de pena como fonte de carbono e nitrogênio; bem como testou diferentes tempos de cultivo (24, 28, 32, 48 e 72 horas) com agitação de 150 rpm na temperatura de 30 °C. Os resultados estão na tabela 10.

Na literatura são relatados cultivos com farinha de pena associado à levedura e outros nutrientes (Yoshioka *et al.*, 2007), bem como relatos variados sobre a melhor temperatura e tempo de cultivo para a produção de queratinase: Yoshioka *et al.* (2007) e Adinarayana *et al.* (2003) obtiveram a melhor produção em 48 horas a 37 °C para suas respectivas linhagens de *Bacillus*; Cai *et al.* (2008) em 72 horas a 23 °C para uma linhagem de *Bacillus subtilis* mutante e Kojima *et al.* em 24 horas a 30 °C para *Bacillus pseudofirmus*. Assim, é possível ver que a variação intra-espécie é grande e depende de muitos fatores, sendo necessária a realização de diversos ensaios até encontrar a condição ideal de produção enzimática para cada cepa.

Tabela 10: Atividade queratinolítica dos sobrenadantes de NP5 e S14 em meio com farinha de pena pura e combinada.

Meio*	Atividade** média - azul de queratina				
	NP5				
	24h	28h	32h	48h	72h
1	0	0	0	3,2 ± 1,5	6,5 ± 1,0
2	1,5 ± 1,2	2,6 ± 1,1	1,0 ± 1,0	2,2 ± 0,8	1,3 ± 0,7
3	0	0	1,0 ± 0,9	0	1,5 ± 1,4
4	0	0	0	0	0
S14					
1	0	1,9 ± 1,2	3,4 ± 1,1	3,7 ± 0,9	2,7 ± 1,0
2	0	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,4	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0

* Meio 1: 2% farinha de pena; Meio 2: 0,2% farinha de pena; Meio 3: 2% farinha de pena, 2% glicose, 0,2% ext. de levedura e 0,2% proteína de soja e Meio 4: 0,2% farinha de pena, 2% glicose, 0,2% ext. de levedura e 0,2% proteína de soja. Todos em q.s.p. 100% de tampão fosfato 10 mM pH 7.0.

** 1 U.mL⁻¹.h⁻¹ = aumento de 0,01 unidade de absorvância

O Meio 1, composto por 2% de farinha de pena em tampão fosfato 10 mM pH 7.0, foi o único em que a amostra teve ação relevante sobre o substrato azul de queratina e, mesmo assim, somente após 48 horas de cultivo, com aumento em 72 horas de cultivo. O que serviu para nos orientar que o cultivo em menor tempo não é eficiente para a produção de queratinase pelo isolado NP5 nessas condições e que a farinha de pena pura se mostra um bom substrato para a produção de enzima por esse microrganismo. Tempos menores de cultivo, com sucesso, foram relatados para a produção de queratinase via microrganismo recombinante, com 18 horas de incubação (Radha e Gunasekaran, 2007; Cai *et al.*, 2008).

A cepa S14, microrganismo de referência do nosso laboratório, também demonstrou melhor performance no meio com farinha de pena pura e teve produção de queratinase em tempo menor que o isolado NP5. No entanto, em nenhum momento chegou ao mesmo nível de produção que este. Em virtude dessa capacidade do isolado S14 produzir queratinase em menos tempo, decidiu-se realizar um novo experimento, com a associação de NP5 com S14. Também aumentamos a concentração de farinha de pena no meio, de 2% para 5% e alteramos as condições de temperatura e velocidade de rotação para 37 °C e 180

rpm, respectivamente. As atividades médias obtidas para os diferentes tempos de cultivo (24, 28, 32, 44, 48 e 72 horas) para os isolados e a mistura deles estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11. Atividade queratinolítica dos sobrenadantes de NP5 e S14 isolados e de NP5 + S14 combinados em meio com 5% de farinha de pena.

	Atividade* média - azul de queratina					
	24h	28h	32h	44h	48h	72h
NP5	2,9 ± 0,6	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,3	4,3 ± 1,0	4,0 ± 1,0	9,6 ± 0,3
S14	0	0	1,0 ± 0,05	3,2 ± 1,0	2,8 ± 0,1	7,2 ± 0,1
NP5+S14	0	1,6 ± 0,3	2,7 ± 0,3	5,2 ± 2,0	7,2 ± 2,0	9,0 ± 1,2

* 1 U.mL⁻¹.h⁻¹ = aumento de 0,01 unidade de absorvância

Na natureza os microrganismos se associam em comunidades e agem em conjunto buscando, geralmente, o benefício comum (Arruda, 2010). Baseados nesse fato, pensamos que a associação de S14 com NP5 poderia apresentar uma atividade sinérgica na produção enzimática. No entanto, nesse experimento verificamos que a associação dos dois microrganismos não promove um efeito sinérgico na produção enzimática e, desse modo, optamos por seguir o estudo trabalhando somente com o isolado NP5. O experimento também serviu para demonstrar que os aumentos da temperatura e da velocidade de rotação influenciaram positivamente na produção de enzima pelo isolado NP5, em comparação ao mesmo tempo de cultivo tempo em experimentos anteriores, bem como, a maior porcentagem de farinha de pena no meio.

A influência do pH do meio na produção de queratinase foi avaliada. Neste experimento, testamos o meio com 5% de farinha de pena mais q.s. de tampão fosfato em diferentes pHs: 6, 7 e 8, todos na concentração de 10 mM, para o isolado NP5. O cultivo foi feito a 37 °C e a 180 rpm. Alíquotas foram coletadas em 44, 68, 72 e 96 horas. As atividades resultantes do ensaio com o sobrenadante podem ser vistas na tabela 12 e representam a média de seis ensaios.

Tabela 12. Influência de diferentes pHs na atividade queratinolítica do sobrenadante do isolado NP5.

pHs	Atividade* média - azul de queratina			
	44h	68h	72h	96h
6	11,0 ± 3,1	11,0 ± 1,6	11,3 ± 1,5	6,0 ± 2,6
7	13,0 ± 5,2	9,0 ± 2,0	8,8 ± 1,4	4,0 ± 3,5
8	8,0 ± 2,0	3,0 ± 2,7	10,0 ± 4,8	2,0 ± 2,0

* 1 U.mL⁻¹.h⁻¹ = aumento de 0,01 unidade de absorvância

As atividades queratinolíticas obtidas para os diferentes pHs foram comparadas entre si e com as atividades dos grupos controles através de teste ANOVA multifatorial ($\alpha = 0,05$) e indicaram que não houve diferença estatística entre os grupos. Assim, dentro das nossas condições de cultivo, o experimento demonstrou que o pH do meio entre 6,0 a 8,0 não influencia significativamente na produção de queratinase.

As queratinases são descritas como enzimas resistentes, estáveis e ativas em uma ampla faixa de pH e temperatura (Gupta e Ramnani, 2006). Os efeitos desses parâmetros na atividade das queratinases são muito estudados e apresentam resultados diversos dependendo do microrganismo produtor: pH 8,0 a 10,0 para queratinase produzida por *Streptomyces* sp. (Xie *et al.*, 2010); pH 9,0 a 37 °C para *Bacillus* (Yoshika *et al.*, 2007); pH 8,0 a 9,0 para *Bacillus subtilis* (Macedo *et al.*, 2008), pH 6,0 a 11,5 e temperatura entre 30 a 80 °C (Kojima *et al.*, 2006), pH 7,5 a 23 °C (Cai *et al.*, 2008); pH 9,0 a 50 °C (Mazotto *et al.*, 2010); pH 6,5 a 7,9 em temperatura entre 25 a 47,5 °C (Anbu *et al.*, 2005); pH entre 9,0 a 12,0 e temperatura entre 25 a 55 °C (Tatineni *et al.*, 2007); entre outros. Devido a esta variabilidade, vislumbra-se expandir a faixa de pH em futuros experimentos.

Ainda, dentro desse rastreamento, baseados nas experiências de outros trabalhos realizados em nosso laboratório, foram realizados alguns experimentos variando uma série de fatores. Os melhores resultados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Atividade queratinolítica do sobrenadante de NP5 em diferentes meios de cultivo.

Isolado utilizado e condições dos experimentos (apenas o melhor resultado)	Atividade* média - Azoqueratina
NP5 – meio com 7,5% de farinha de pena + 0,05% de extrato de levedura em qsp água deionizada. Cultivo em 72 horas, a 37 °C e 180 rpm.	4,91 ± 0,30
NP5 – meio com 4% de pena + 0,05% de extrato de levedura em qsp água deionizada. Cultivo em 96 horas, a 37 °C e 180 rpm.	4,56 ± 0,05
NP5 – meio com 1,5% de farinha de pena + 1% de cloreto de cálcio em qsp tampão fosfato 10 mM. Cultivo em 96 horas, a 37 °C e 180 rpm.	2,85 ± 0,12

Seguindo a tendência dos resultados obtidos de que a maior concentração de farinha de pena no meio de cultivo eleva a atividade queratinolítica do sobrenadante, optou-se por aumentar a concentração da mesma para 7,5%. O meio com o íon divalente Ca^{2+} foi testado visto que esse cátion estimula a produção de queratinases em alguns microrganismos (Xie *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2006; Adinarayana *et al.*, 2003). A pena pura foi utilizada (Cai *et al.*, 2008; Tatineni *et al.*, 2007) por representar fonte de nutrição semelhante à farinha de pena. As demais condições de cultivo (temperatura e velocidade de rotação) também foram estipuladas levando em consideração os melhores resultados obtidos nos experimentos anteriores. O extrato de levedura voltou novamente ao cultivo, ainda que em baixa concentração, para ser a fonte inicial de carbono e nitrogênio (Scott e Untereiner, 2004) e estimular o início da produção da biomassa bacteriana. Na literatura, em cultivos semelhantes, o extrato de levedura é utilizado a partir de 0,01% (Yoshioka *et al.*, 2007) e, mesmo nessa pequena concentração, mostrou ser capaz de estimular a produção enzimática por reduzir o tempo de adaptação do microrganismo ao meio (Mazotto *et al.*, 2010).

Assim, com base em todos os experimentos realizados alcançamos a atividade de $4,91 \pm 0,30 \text{ U.mL}^{-1} .\text{h}^{-1}$ em azoqueratina. Visando obter o sobrenadante em maior escala para o prosseguimento do estudo, padronizamos a produção em Erlenmeyer sob agitação e temperatura controladas, nas seguintes condições:

- (i) Cultivo do pré-inóculo m caldo LB a 200 rpm e 30 °C, 18 horas; com inóculo de 10⁸ células de NP5;
- (ii) Produção em meio de cultivo com 7,5% de farinha de pena, 0,05% de extrato de levedura e q.s. de água deionizada, a 180 rpm e 37 °C pelo período de 72 horas;
- (iii) Separação do extrato bruto e sobrenadante por centrifugação por uma hora a 10.000 g seguida de filtração esterilizante do sobrenadante em capela de fluxo laminar com filtro de 0,2 µm;
- (iv) Armazenamento da fração livre de microrganismos a -18 °C. Essa foi a fração utilizada para os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Avaliação da atividade dos sobrenadantes de cultura antes e após incorporação em veículos de uso dermatológico e eleição do veículo

Notadamente, em veículos dermatológicos, as emulsões clássicas são os melhores promotores de absorção (Özgüney *et al.*, 2006), mas, em virtude de serem compostas por muitos itens e necessitarem preparação com a ajuda de alta temperatura foram descartadas para o estudo inicial. Os quatro veículos selecionados para o ensaio tiveram como critério de seleção a simplicidade da formulação e da técnica de preparação, com a preferência por poucos componentes e preparação à temperatura ambiente.

Assim, ensaiamos o sobrenadante do extrato bruto produzido pelo isolado NP5 frente a quatro veículos dermatológicos de uso comum, conforme resultados mostrados na tabela 14.

Tabela 14. Atividade queratinolítica do sobrenadante de NP5 associado a veículos dermatológicos a base de dispersões.

Veículo	Atividade* média - azul de queratina
Gelcreme Sepigel®	25,8 ± 6,4
Gel Aristoflex® AVC	12,2 ± 3,6
Gel Carbopol®	-
Gel Goma xantana®	-

* 1 U.mL⁻¹.h⁻¹ = aumento de 0,01 unidade de absorvância

Dentre as dispersões escolhidas, a de Sepigel® caracteriza-se por ser um agente de caráter não-iônico, espessante, estabilizante e emulsionante, que pode ser usado individualmente para compor formulações do tipo emulsões-géis viscosas ou ser usado como adjuvante em emulsões cremosas. É estável entre os pHs 2,0 a 12,0 (Souza, 2003) e apresenta a característica de ser considerado formador de gelcreme, por conter uma fração lipídica na sua dispersão. A formulação é preparada a frio e apresenta-se opaca e leitosa. A dispersão feita com Aristoflex® AVC também tem caráter não-iônico, sendo estável entre os pHs 4,0 a 9,0, originando géis de toque suave e não pegajoso, brilhantes, transparentes, com bom espalhamento e absorção rápida na pele. É preparado a frio e também pode servir como agente de consistência em emulsões (Souza, 2003). O Carbopol® forma uma dispersão que requer neutralização para a formação de gel e tem caráter iônico. Apesar de amplamente usado, seu caráter iônico o torna incompatível com muitos ativos (Souza, 2003). A goma xantana é usada como agente de controle de reologia em sistemas aquosos ao aumentar a viscosidade e a estabilidade de emulsões e, eventualmente, como único agente suspensor.

Dos quatro veículos, as fórmulas com Sepigel® e Aristoflex® AVC foram as únicas que se mostraram viáveis para incorporarem o EE sem prejuízo da atividade enzimática. Na figura 2 fica evidente que as formulações 2A e 2B nas replicatas de 1 a 4 apresentam uma maior coloração azul quando comparadas com os respectivos controles e os outros veículos (Fig. 2C e 2D). Assim, o gelcreme sepigel® e o gel aristoflex® foram as dispersões escolhidas para compor as novas formulações com o EE para os testes posteriores.

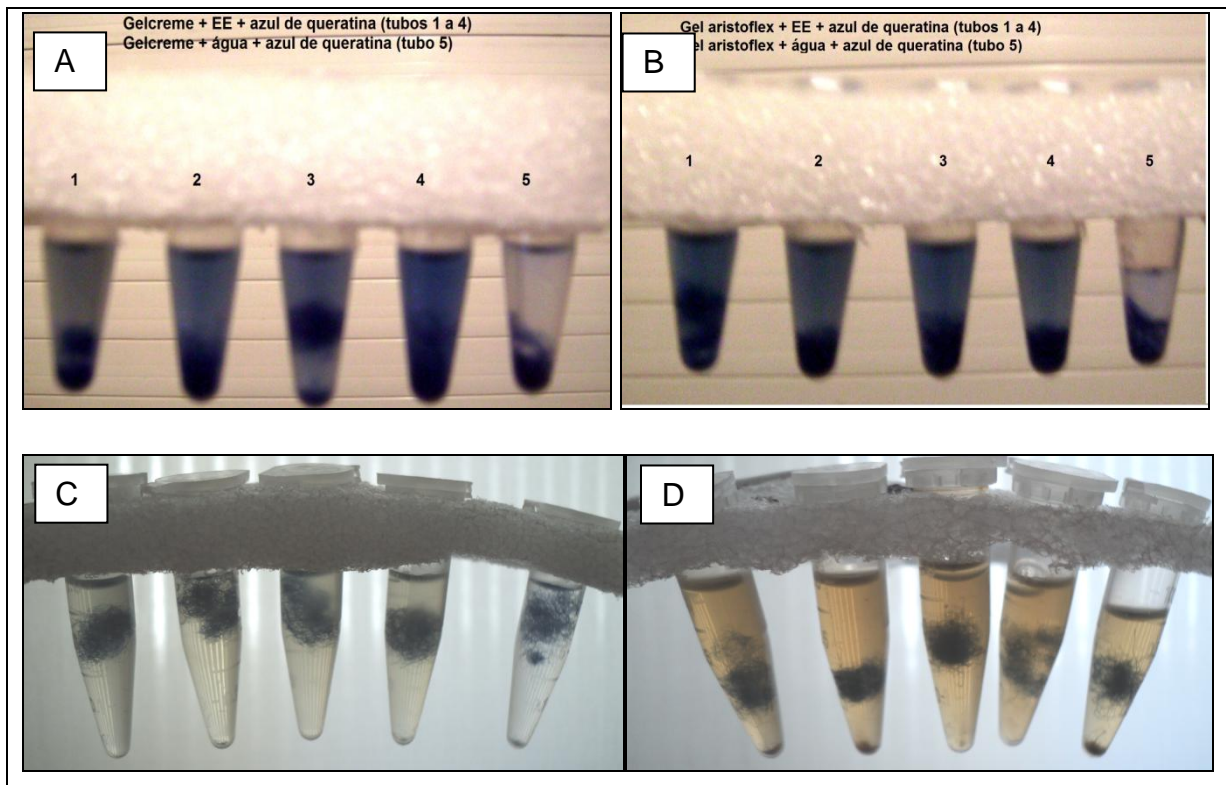


Figura 2. Tubos reacionais de azul de queratina, onde, em cada foto, os quatro primeiros tubos (da esquerda para a direita) são amostras e o quinto é o controle para: (A) Gelcreme + EE, (B) Gel aristoflex + EE, (C) Gel carbopol + EE e (E) Gel goma xantana + EE.

Na tabela 15 estão apresentados os resultados do ensaio de gel e gelcreme frente ao substrato azoqueratina, utilizando o EE no lugar do excipiente original (água deionizada). O uso do q.s.p. 100% de EE é baseado na expectativa da aplicação futura de uma queratinase purificada, que segundo relatos da literatura possuem taxa média de purificação entre 6 a 24% (Macedo *et al.*, 2008; Adinarayana *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2006; Anbu *et al.*, 2004) em relação ao volume do extrato bruto. Assim, se fossemos trabalhar com 5, 10 ou mesmo 20% de EE em vez de q.s.p. 100% teríamos, muito provavelmente, uma concentração muito baixa de enzima na formulação. A desvantagem de se utilizar q.s.p. 100% de um extrato não purificado é o fato de que os todos potenciais componentes tóxicos, inibidores enzimáticos e sensibilizantes podem estar presentes em maior concentração.

Tabela 15. Atividades queratinolíticas do sobrenadante de NP5 incorporado a gelcreme e gel e de substâncias de referência (papaína e proteinase K).

Grupo	Amostra	Atividade* média - Azoqueratina
EE ^b	Azoqueratina + 100 µl de Gel EE	6,38 ^{a,b} ± 0,54
	Azoqueratina + 100 µl de Gelcreme EE	6,47 ^{a,c} ± 0,69
	Azoqueratina + 100 µl EE (amostra pura)	3,59 ^d ± 0,79
Papaína	Azoqueratina + 100 µl de Gel de papaína	0,48 ± 0,17
	Azoqueratina + 100 µl de Gelcreme de papaína	0,47 ^b ± 0,07
	Azoqueratina + 100 µl de solução aquosa de papaína 0,8%	0,80 ± 0,04
Proteinase K	Azoqueratina + 25 µl de solução de Proteinase K 200 µg / mL + 75 µl água	1,97 ^e ± 0,67

^a diferença significativa em relação à EE (amostra pura) ($\alpha = 0,05$)

^b diferença significativa em relação ao gel de papaína ($\alpha = 0,05$)

^c diferença significativa em relação ao gelcreme de papaína ($\alpha = 0,05$)

^d diferença significativa em relação à solução aquosa de papaína ($\alpha = 0,05$)

^e diferença significativa em relação ao grupo EE e Papaína ($\alpha = 0,05$)

Os dados da tabela 15 foram analisados por teste ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Method. Os resultados são discutidos nos próximos parágrafos.

O grupo da papaína não mostrou diferença significativa entre si, o que nos permite inferir que os veículos não interferiram significativamente na atividade da papaína dentro das condições do nosso ensaio. As amostras ensaiadas no grupo EE exibiram diferenças significativas entre os resultados do Gel EE e do Gelcreme EE (6,38±0,54 e 6,47±0,69, respectivamente) quando comparadas com EE (3,59±0,79), mas não foi significativa entre as duas fórmulas. Assim, o EE incorporado ao veículo teve maior atividade que o EE puro. Esta variação pode ser devida a uma maior disponibilização do substrato (azoqueratina) para a ação da enzima. A fim de elucidar que tipo interação ocorreu, novos experimentos ensaiando individualmente os componentes das fórmulas devem ser realizados.

Os grupos EE e papaína foram analisados entre si por teste ANOVA seguido de Holm-Sidak method. Os resultados foram significativamente diferentes quando comparados em relação às suas atividades em cada veículo:

(i) Gel EE ($6,38 \pm 0,54$) e Gel papaína ($0,48 \pm 0,17$);

(ii) Gelcreme EE ($6,47 \pm 0,69$) e Gelcreme papaína ($0,47 \pm 0,07$).

Confirmando, então, que nosso EE mantém sua atividade enzimática quando incorporado à fórmula e que essa se mostrou superior à atividade da papaína nas condições do nosso ensaio. A proteinase K foi ensaiada somente pura, por se tratar de uma referência padrão (Kojima *et al.*, 2006). A atividade da proteinase K foi estatisticamente significativa frente aos dois grupos, sendo mais ativa que a papaína e menos que o EE. Comparando as atividades de EE puro e da solução de papaína, temos uma relação de, aproximadamente, quatro vezes mais atividade para o EE do que para a papaína. Macedo *et al.* (2008) encontrou uma relação similar comparando as atividades queratinolíticas do sobrenadante do *Bacillus subtilis* S14 com papaína frente à azoqueratina (cerca de 3,7 vezes mais atividade para S14).

Com base nas atividades obtidas, o veículo dermatológico escolhido foi o gelcreme sepigel e o mesmo foi utilizado para os testes *in vitro* e *in vivo* com ajustes de formulação quando necessário.

Ensaio biológico *in vitro*

A quantificação do diclofenaco foi realizada por CLAE seguindo método descrito por Ferrante *et al.* (2010). A curva de calibração mostrou-se linear e reprodutível na faixa de 0,05 a 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$, com R^2 acima de 0.9995. A curva de calibração média foi de $y = 108678x + 60947$, sendo “y” a área integrada no cromatograma e “x” a concentração (Figura 3).

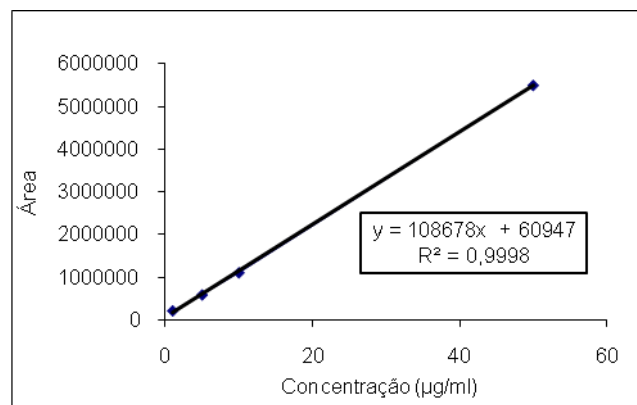


Figura 3: Curva de calibração média da solução padrão de diclofenaco sódico.

Visto que a escolha do líquido receptor tem como objetivo simular a circulação sanguínea *in vivo* e que influencia na penetração cutânea das substâncias, (Sartorelli, *et al.*, 2000) realizamos testes de concentração de saturação do diclofenaco em PBS e salina fisiológica e etanol a 100% (7:3 v/v). Os resultados foram de 0,25 e 10,6 mg/ml para PBS e salina, respectivamente. A fim de cumprir com as condições *sink*, optou-se pela salina. Lopes *et al.* (2003) também utilizaram as mesmas condições.

Na tabela 16 apresentamos as percentagens médias obtidas pela quantificação de diclofenaco sódico na superfície cutânea (equivalente à primeira fita, a qual reteve o fármaco que não penetrou), no estrato córneo e no líquido receptor realizadas para a formulação Gelcreme Diclofenaco e Gelcreme Diclofenaco + EE nos tempos de 15 minutos, 1, 2, 4 e 12 horas.

Tabela 16: Quantificação de diclofenaco na superfície cutânea, estrato córneo e no líquido receptor após a aplicação de formulações contendo 1,5% do fármaco.

Gelcreme Diclofenaco + EE					
% média em Célula de Franz					
	15 mim	1 hora	2 horas	4 horas	12 horas
Pele	35,5 ± 4,6 ^a	24,1 ± 5,0 ^a	23,4 ± 6,8	29,4 ± 3,5	24,3 ± 4,9
Estrato córneo	63,9 ± 4,7 ^a	74,6 ± 4,1	75,8 ± 6,0	70,2 ± 3,4	75,6 ± 4,9
Líquido receptor	0,56 ± 0,1	1,37 ± 1,1	0,77 ± 0,8	0,39 ± 0,2	0,09 ± 0,02
Gelcreme Diclofenaco					
% média em Célula de Franz					
	15 mim	1 hora	2 horas	4 horas	12 horas
Pele	47,4 ± 4,5	35,2 ± 1,3	30,5 ± 1,4	32,6 ± 4,5	19,6 ± 1,0
Estrato córneo	52,2 ± 4,5	64,3 ± 1,4	68,5 ± 0,9	66,4 ± 4,9	79,9 ± 0,7
Líquido receptor	0,38 ± 0,1	0,39 ± 0,06	1,01 ± 1,1	1,02 ± 0,9	0,50 ± 0,3

^a diferença significativa em relação à Gelcreme Diclofenaco ($\alpha = 0,05$)

Preliminarmente, aplicou-se o Teste de Levene aos dados da Tabela 16, onde detectou-se heterogeneidade significativa entre as variâncias. Foram feitas transformações nas variáveis, mas nenhuma resultou em heterogeneidade das mesmas. Assim, aplicamos o teste ANOVA e o de Kruskal-Wallis.

A seguir, na aplicação do teste não-paramétrico a hipótese nula de que não há diferenças significativas entre os grupos foi rejeitada, logo, há diferenças entre os grupos.

A aplicação do teste ANOVA aos dados da tabela 16 resultou nos seguintes resultados:

- (i) Houve uma diferença significativa na retenção de diclofenaco na superfície cutânea na comparação do Gelcreme Diclofenaco + EE com o Gelcreme Diclofenaco tanto para o tempo de 15 minutos ($35,5 \pm 4,6\%$ e $47,4 \pm 4,5\%$, respectivamente) quanto para o tempo de 1 hora ($24,1 \pm 5,0\%$ e $35,2 \pm 1,3\%$, respectivamente). Para os tempos de 2, 4 e 12 horas não foram observadas diferenças significativas na percentagem de retenção na pele entre as duas fórmulas;
- (ii) Na avaliação da penetração no estrato córneo observou-se uma diferença significativa apenas no tempo de 15 minutos: Gelcreme Diclofenaco + EE ($63,9 \pm 4,7\%$) e Gelcreme Diclofenaco ($52,2 \pm 4,5\%$). Para os demais tempos, não houve diferença significativa na percentagem de penetração;
- (iii) A quantidade de diclofenaco encontrada no líquido receptor não mostrou diferença significativa entre as duas fórmulas em nenhum tempo estudado.

O veículo gelcreme (compartimento doador) mostrou-se adequado ao teste, pois foi capaz de exercer seu efeito liberando o fármaco e o fármaco + EE para os mesmos se difundirem através das camadas da pele, conforme esperado (Foldvari, 2000). As queratinases presentes no nosso EE provavelmente seguem o mesmo padrão da maior parte das queratinases já estabelecidas, as quais têm o peso molecular entre 20 e 50 kDa (Mazotto *et al.*, 2010. Essa expectativa está baseada nos dados encontrados na literatura: 26 kDa (Yoshioka *et al.*, 2007), 27 kDa (Macedo *et al.*, 2008), 30 kDa (Radha e Gunasekaran, 2007), 36 kDa (Anbu *et al.*, 2005), 44 kDa (Tatineni *et al.*, 2007).

O estrato córneo é um local de intensa atividade metabólica extracelular, principalmente devido às enzimas e lipídeos liberados por exocitose dos corpos lamelares da camada granulosa (Forestier, 1992; Silva, *et al.*, 2008). Essas enzimas

são, geralmente, hidrolases do tipo glicosidase, fosfolipase, esfingomielinase, fosfatase, estearases, sulfatases e proteases (Forestier, 1992). A epiderme tem mostrado expressar diversas serino proteases, as quais estão envolvidas em múltiplas atividades na pele: proliferação celular, diferenciação, homeostase da barreira lipídica e proteólise do extrato córneo (Voegeli *et al.*, 2007). Pelos dados obtidos, podemos afirmar que, dentro das condições do nosso experimento, as queratinases presentes no sobrenadante estudado foram capazes de agir sobre a pele de porco acelerando a penetração do fármaco no tempo de 15 minutos e 1 hora na superfície cutânea e no tempo de 15 minutos para o estrato córneo. Ao mesmo tempo, pelo fato da quantificação no líquido receptor ficar próxima do erro e do desvio padrão para todos os tempos para as duas formulações, é possível inferir que ela não promove absorção sistêmica.

O estrato córneo é a principal resistência à absorção percutânea de muitos fármacos, portanto, muitas substâncias são testadas visando a verificação da atuação como promotores de absorção (Özgüney *et al.*, 2006). Ferrante *et al.* (2010) testou 10% de uréia, 15 e 20% de ácido oléico e 5 e 10% de d-limoneno como promotores de penetração de diclofenaco dietilamino em preparações veterinárias, obtendo sucesso, em diferentes percentuais, com todos eles. Lee *et al.* (2008) relata que a absorção de fármacos hidro e lipofílicos aumenta em pele humana (pele proveniente de cirurgia) quando a mesma é previamente tratada com creme depilatório a base de tioglicolato. A enzima papaína já foi estudada com esse fim, mostrando um perfil de promotor de absorção (Lopes *et al.*, 2008). Assim, podemos esperar uma ação semelhante para a queratinase do nosso EE, sendo que para a confirmação dessa hipótese mais estudos são necessários. Esses resultados são considerados promissores, visto que o experimento foi conduzido com o sobrenadante e não com a enzima purificada, a qual, quando pura, poderá expressar uma atividade mais acentuada e estar isolada da ação de possíveis interferentes presentes no EE.

Ainda, analisando o fato de a atividade significativa ter ocorrido nos tempos iniciais, a formulação enzimática poderá ser útil quando se necessita a ação de substâncias em curto espaço de tempo. Exemplos para esse uso são: a associação

com peelings químicos e nos casos onde se deseja promover uma rápida absorção de um fármaco.

Ensaio biológico *in vivo*

No experimento em Célula de Franz Modificada verificamos a capacidade do EE em agir sobre o estrato córneo. Assim, passamos para o experimento *in vivo* a fim de avaliar a atividade depilatória e a capacidade de promover alterações na superfície cutânea de três formulações teste: EE, papaína e veículo (Figura 4). O total de quatro grupos foi utilizado no estudo, onde o quarto grupo foi o controle, onde nenhum produto foi utilizado.

É sabido que o uso tópico de enzimas proteolíticas pode induzir esfoliação superficial e, com o uso contínuo, até mesmo alterar propriedades da epiderme e derme, muitas vezes, promovendo resultados semelhantes aos obtidos com o uso de alfa-hidroxiácidos (Traversa *et al.*, 2007; Smith *et al.*; 2007). A papaína foi escolhida como comparativo por ser uma enzima proteolítica já bastante estudada e é usada em produtos cosmeceuticos de uso tópico para aumentar a maciez e acelerar a descamação da pele (Lods *et al.*; 2001), bem como ter a capacidade de produzir depilação progressiva em pH suportável à pele, retardando o crescimento do pelo (Traversa, 2003). A fórmula preparada somente com os componentes do veículo serviu para avaliarmos as ações que este, por si só, causaria na pele. Todas as formulações mostraram-se estáveis à temperatura ambiente pelo período do experimento.



Figura 4. Formulações utilizadas para o teste *in vivo*. Da esquerda para a direita: Gelcreme Veículo, Gelcreme Papaína e Gelcreme EE.

Para o experimento, trabalhamos com quatro grupos de animais, os quais eram observados diariamente quanto ao seu estado geral, manutenção da atividade física, alimentação, recuperação da anestesia e avaliação clínica visual. Durante o período do experimento tivemos os seguintes óbitos: 1 animal do grupo Veículo no 3º dia, 1 animal do grupo Papaína no 10º dia, 1 animal do grupo Controle no 7º dia e 5 animais do grupo Enzima, sendo 1 animal em cada um dos seguintes dias: 9º, 12º, 16º, 19º e 22º. Como o experimento envolveu aplicação diária de anestesia, geralmente, as mortes eram constatadas no dia seguinte. As características apresentadas pelos animais mortos seguiram, aparentemente, dois padrões principais: (i) alguns animais não se recuperaram da anestesia e (ii) perda de peso. Mesmo considerando que a anestesia diária possa ter influenciado no bem-estar de alguns animais, não foi possível trabalhar sem a aplicação da mesma, devido à intensa atividade dos animais, o que dificultava a aplicação homogênea da amostra. Além disso, era necessária uma “janela de tempo” para a amostra ficar em contato com a superfície cutânea dos animais, sem remoção da mesma por atrito e isso só foi possível com a imobilização diária do animal.

Quanto à aplicação da amostra, trabalhamos com a aplicação direta sobre a área, sem oclusão, por se tratar de um experimento prolongado e, também, por se tratar de um estudo que visa obter um futuro produto de uso humano dermatológico, onde a ideia de trabalhar com oclusão diária não é usual.

A análise clínica diária (macroscópica) das regiões depiladas não mostrou sinal de irritação dérmica para nenhum grupo durante todo o experimento (OECD, 2002). Eventuais ferimentos no dorso dos animais ocorreram em virtude de incompatibilidades comportamentais entre os mesmos e, em virtude disso, separamos os animais em mais caixas.

Na Figura 5 é possível acompanhar, através de fotografias, a evolução do crescimento dos pelos dos animais durante o período de aplicação das formulações em 0, 10, 16, 22 e 26 dias: (a) animais do grupo enzima (n = 5); (b) animais do grupo papaína, veículo e controle (n = 1 de cada grupo).

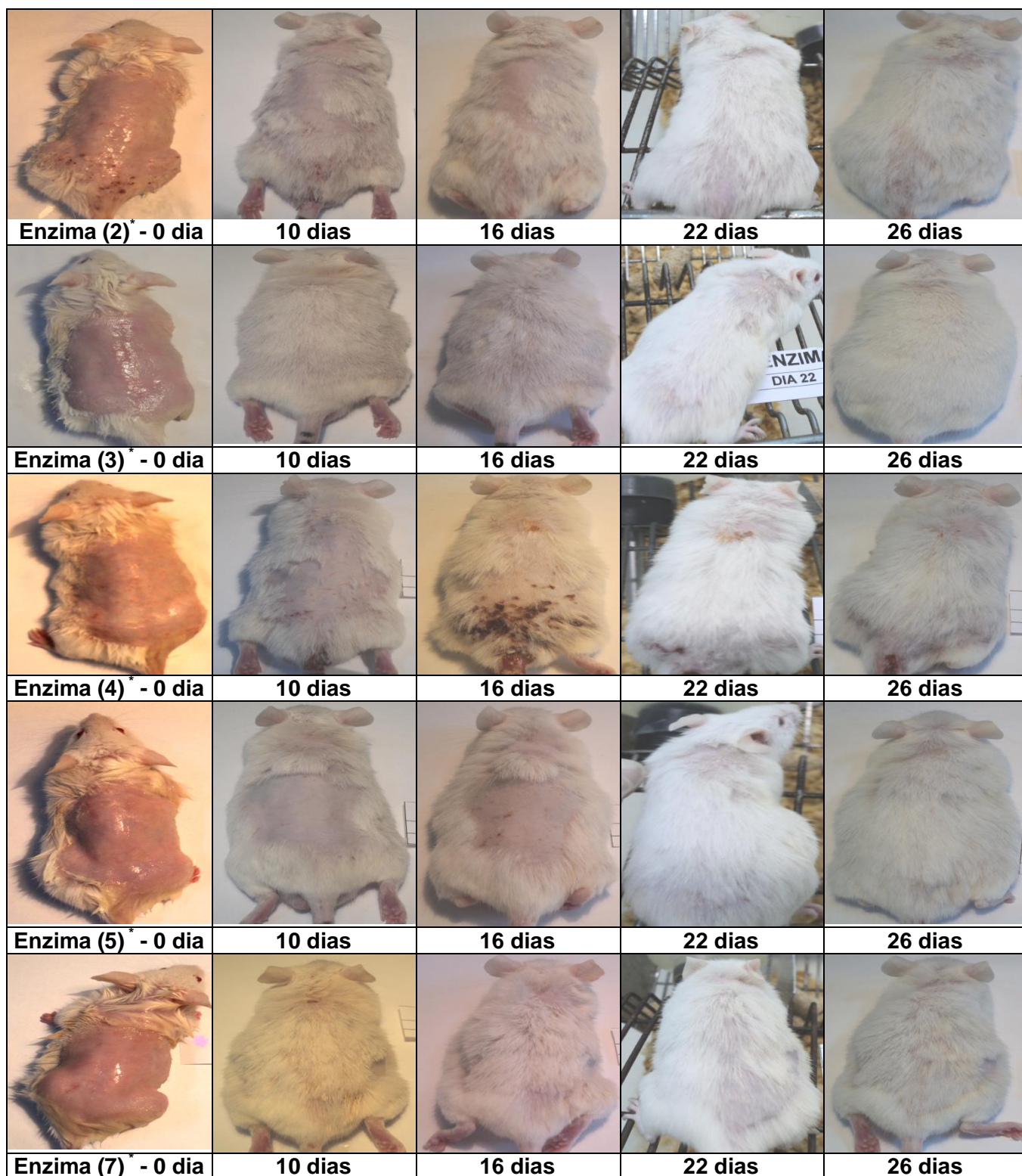


Figura 5 a. Fotos dos animais do grupo enzima em 0, 10, 16, 22 e 26 dias com a evolução do crescimento dos pelos no período do experimento. As fotos do dia 22 e 26 representam o penúltimo dia consecutivo de aplicação da amostra e o último dia do experimento, respectivamente. * Indica a codificação do animal dentro do seu grupo.

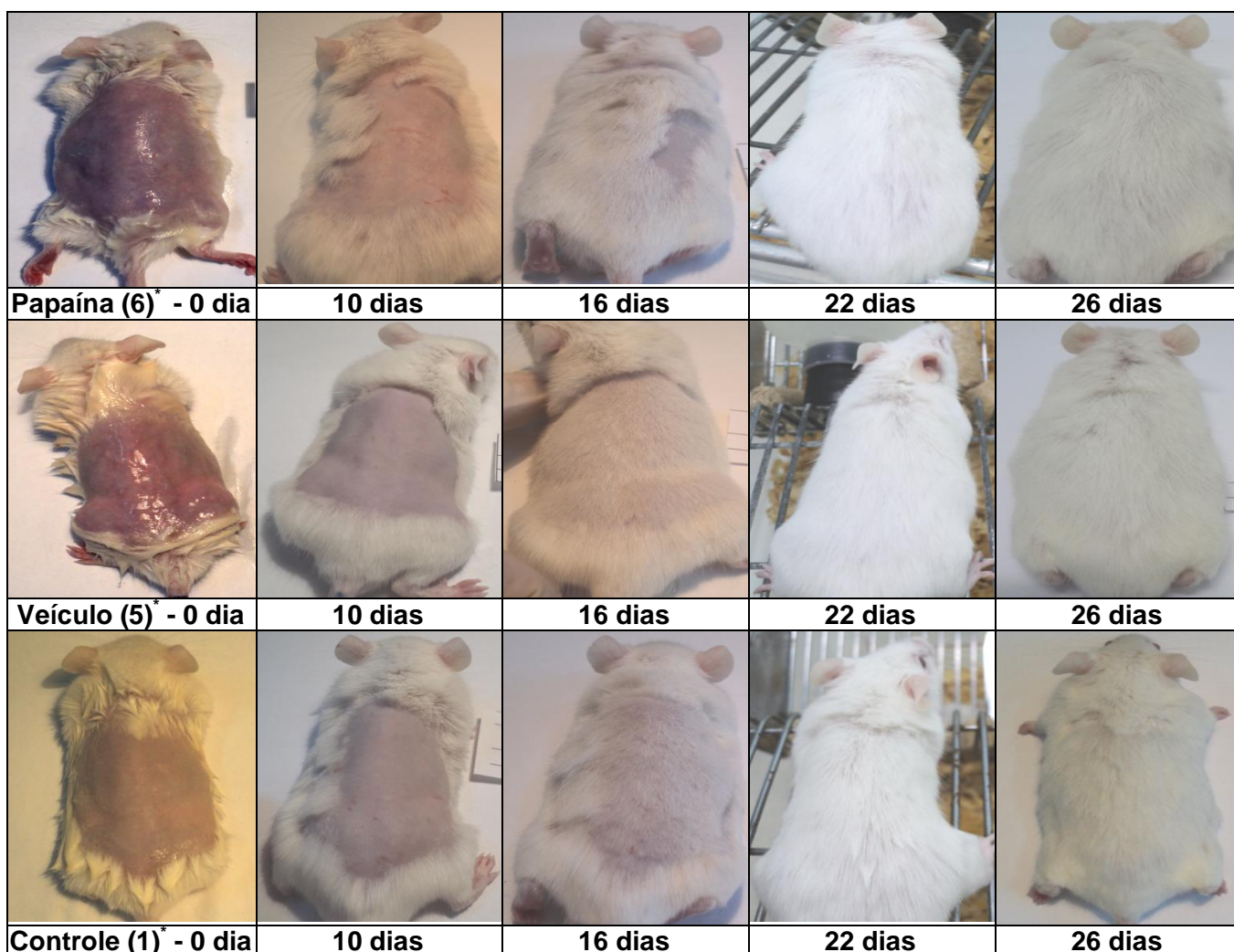


Figura 5 b. Fotos de animais do grupo papaína, veículo e controle em 0, 10, 16, 22 e 26 dias mostrando a evolução do crescimento dos pelos no período do experimento. As fotos do dia 22 e 26 representam o último dia consecutivo de aplicação da amostra e o penúltimo dia do experimento, respectivamente. *Indica a codificação do animal dentro do seu grupo.

Fotos dos grupos dos animais no último dia do experimento podem ser vistas na Figura 6 e foto de estudo semelhante, conduzido por Traversa *et al.* (2007), pode ser vista na Figura 7.

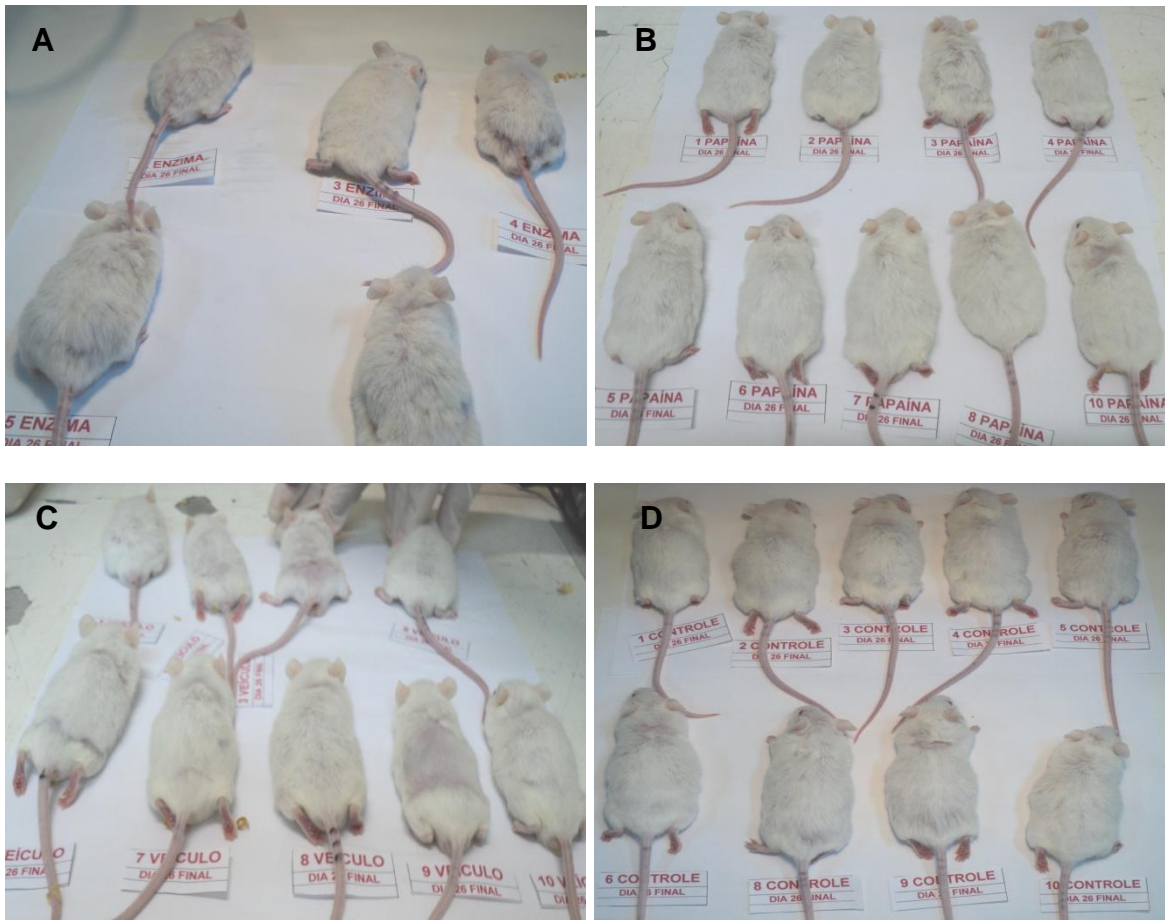


Figura 6. Grupos de animais observados, após o tratamento, no último dia do experimento. A) Enzima, B) Papaína, C) Veículo e D) Controle.



Figura 7. Fotografia do experimento de Traversa *et al.* (2007) em camundongo tratado com creme de papaína 0,8% em 2 cm² do dorso direito. Disponível em: <http://www.usp.br/agen/repgs/2003/pags/118.htm>

Ao final do experimento, dos 5 animais do grupo Enzima, 4 apresentaram visualmente um crescimento irregular dos pelos (amostras Enzimas 2, 4, 5 e 7), mesclando áreas pilosas mais densas com outras mais rareadas. Já a amostra

“Enzima 3” não apresentou uma diferença que pudesse ser observada a olho nu ao final do experimento. O fato de 5 animais terem ido a óbito nesse grupo nos impele a esperar pelos resultados da análise histológica. Com esses resultados poderemos concluir ou levantar hipóteses mais concretas sobre o fato ou, ainda, verificar se foi uma questão aleatória.

No grupo da Papaína, dois animais apresentaram o lado direito levemente menos denso (em pelos) do que o lado esquerdo (controle individual). Esse resultado condiz com o esperado para a papaína, cujos estudos de Traversa *et al.* (2007) mostram que a melhor atividade depilatória da mesma é em veículo à base de emulsão em comparação ao veículo gel, ainda quem em gel ela também apresente atividade depilatória, porém menos intensa.

Para os grupos Veículo e Controle não houve diferenças significativas no crescimento dos pelos que pudessem ser observadas visualmente.

Houve variação, em termos de tempo, para a retomada de crescimento de pelos dos animais, o que nos mostra como as características individuais intra-espécies podem interferir nesse processo. Em média, somente após 15 dias da depilação (início do experimento), os animais começaram a mostrar um crescimento médio mais intenso dos pelos, o que nos permite concluir que o tempo de estudo esteve apropriado (26 dias).

De maneira geral, pode-se inferir que os grupos tratados com enzima e papaína apresentaram áreas pilosas mais falhadas em comparação aos grupos veículo e controle e que, na formulação gelcreme, o EE se mostrou mais eficiente no efeito depilatório do que a papaína. O fato, de cada animal ter o lado esquerdo como controle individual, além do grupo controle, nos fornece evidências adicionais para essa afirmação.

Na Figura 7 podemos observar uma fotografia de camundongo tratado por 30 dias com aplicação diária de 1 g de creme com papaína 0,8% em 2 cm² do dorso direito (experimento de Traversa *et al.*, 2007). Também há um rareamento de pelos na região tratada, destacando que os principais diferenciais do experimento por ele conduzido em relação ao nosso foi a maior aplicação de amostra por cm² (1 g para 6

cm² no nosso experimento e 1g para 2 cm² para Traversa *et al.* (2007)) e o uso do veículo gelcreme no nosso estudo e o uso de creme por ele.

A tabela 17 lista os pesos (g) dos órgãos extraídos dos animais e enviados para a análise histológica. Os dados foram avaliados estatisticamente por teste ANOVA multifatorial.

Tabela 17: Peso médio dos animais e órgãos, por grupo, ao fim do experimento *in vivo*.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS						
	Média do peso (g)						
	Peso do animal	Coração	Cérebro	Baço	Pulmão	Rins	Fígado
Papaína	42,620 ± 3,50	0,192 ± 0,04	0,302 ± 0,02	0,160 ± 0,04	0,210 ± 0,02	0,777 ± 0,06	2,762 ± 0,293
Enzima	43,400 ± 3,91	0,228 ± 0,03	0,331 ± 0,03	0,293 ± 0,09 ^a	0,259 ± 0,01 ^{a,b,c}	0,812 ± 0,06	2,946 ± 0,28
Veículo	42,000 ± 3,57	0,184 ± 0,03	0,289 ± 0,03	0,172 ± 0,04	0,208 ± 0,03	0,735 ± 0,04	2,700 ± 0,26
Controle	40,889 ± 3,95	0,205 ± 0,03	0,322 ± 0,05	0,155 ± 0,03	0,216 ± 0,02	0,823 ± 0,07	2,680 ± 0,307

^a diferença significativa em relação ao grupo controle ($\alpha = 0,05$)

^b diferença significativa em relação ao grupo papaína ($\alpha = 0,05$)

^c diferença significativa em relação ao grupo veículo ($\alpha = 0,05$)

Através dos resultados da tabela 17 é possível observar que houve uma diferença significativa no peso do baço entre o grupo da enzima (0,293 ± 0,09%) e o grupo controle (0,155 ± 0,03%) e, também, para o peso do pulmão entre o grupo da enzima (0,259 ± 0,01%) em relação a todos demais grupos: papaína (0,210 ± 0,02%), veículo (0,208 ± 0,03%) e controle (0,216 ± 0,02%). Para os pesos dos demais órgãos e dos animais não houve diferença significativa entre os grupos.

A análise apenas numérica das diferenças obtidas para o peso do pulmão e baço fica comprometida sem os resultados da análise histológica. Assim, nesse exato momento, estamos no aguardo dos resultados, os quais estão sendo processados pelo laboratório de patologia veterinária da UFRGS. Mesmo sem esses dados, algumas hipóteses são levantadas: um resultado aleatório devido ao número reduzido de animais do grupo Enzima ao final do experimento; também, muitos animais provenientes de biotério já possuem infecções pulmonares; bem como, a esplenomegalia não é relatada como incomum em experimentos animais de toxicologia.

Ao final desse trabalho foi possível concluir que:

- O cultivo em meio seletivo contendo farinha de pena e o teste de atividade enzimática frente a substratos queratinolíticos são ferramentas eficientes no rastreamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas queratinolíticas;
- Para o *Bacillus subtilis* NP5 o melhor meio de cultivo para a produção de queratinase foi em meio com 7,5% de farinha de pena e 0,05% de extrato de levedura em q.s.p. 100% de água deionizada. O cultivo foi em 72 horas, a 37 °C e 180 rpm. A atividade queratinolítica do sobrenadante obtida frente ao substrato azoqueratina foi de $4,91 \pm 0,30$ (atividade média e desvio padrão). A faixa de pH entre 6,0 a 8,0 não mostrou ter influência significativa na produção de queratinase;
- O planejamento experimental PB não se mostra adequado para o cálculo do efeito das variáveis com substratos insolúveis, mas pode ser uma boa ferramenta de planejamento, pelo menos nas fases iniciais;
- A associação entre os isolados NP5 e S14 não se mostrou sinérgica para a produção enzimática;
- O sobrenadante da cultura de NP5 manteve sua atividade enzimática quando ensaiado junto às dispersões formadoras de gel não iônico (aristoflex[®] AVC) e gelcreme não iônico (sepigel[®]);
- Com base nas atividades obtidas, o veículo dermatológico escolhido para compor a fórmula teste com o EE foi o gelcreme sepigel e o mesmo se mostrou adequado para os testes *in vitro* e *in vivo*;
- A fórmula gelcreme com diclofenaco + EE teve diferença significativa no ensaio em Célula de Franz Modificada em comparação com a fórmula gelcreme + diclofenaco nos tempos de 15 minutos e 1 hora para a superfície cutânea e no tempo de 15 minutos para o extrato córneo;
- No experimento *in vivo*, a formulação com EE causou crescimento irregular de pelos e em intensidade superior aos demais grupos.
- O uso de queratinase microbiana em produtos dermatológicos para uso humano continua sendo um campo aberto à pesquisa, contudo, é necessário ampliar o

estudo experimental em animais em outras dosagens ou com a enzima purificada, bem como testar a reversibilidade de ação.

Para a continuidade desse trabalho planejamos os seguintes eventos:

- Análise dos resultados da histologia. Da posse desses dados poderemos inferir se os óbitos do grupo Enzima no experimento *in vivo* foram aleatórias ou com causa específica.
- Ampliar a faixa de pHs testados para o cultivo do microrganismo.
- Purificar o extrato enzimático e produzir novas formulações com a enzima purificada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adinarayana, K.; Ellaiah, P.; Prasad, D. S. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 4, article 56 (<http://www.aapspharmscitech.org>), 2003.

Anbu, P.; *et al.* Purification of keratinase from poultry farm isolated-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 639-647, 2005.

Arruda, D. C. Estudo da Biodegradação de penas de aves por comunidades microbianas. **Dissertação de mestrado**, Porto Alegre: UFRGS, 2010.

Brandelli, A.; Riffel, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 395-399, 2006.

Cai, C.; Lou, B.; Zheng, X. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 1, p.60-76, 2008.

Escobar-Chávez, J.J.; *et al.* The tape stripping technique as a method for drug quantification in skin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science**, v. 11, p. 104-130, 2008.

Ferrante, M.; Andreetta, A.; Landoni, M. F. Effect of different penetration enhancers on diclofenac permeation across horse skin. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 312-315, 2010.

Felippi, C. Nanopartículas contendo isotretinoína: preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação da penetração cutânea. **Dissertação de mestrado**, Porto Alegre: UFRGS, 2008.

Fresno, M.J.C.; Jimenez, M.M.S.; Ramírez, A.D. *In vitro* percutaneous absorption of all-*trans* retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 297, p. 134-145, 2005.

Foldvari, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 417-425, 2000.

Forestier, J.P. Les enzymes de l'espace extra-cellulaire Du stratum corneum. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 14, p.47-63, 1992.

Garros I.C.; *et al.* Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21 Supl 3, p. 55-65, 2006.

Gupta, R.; Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006.

Lboutounne, H.; *et al.* Sustained *ex vivo* skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319-334, 2002.

Kojima, M.; Kanai, M.; Tominaga, M. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v. 10, p. 229-235, 2006.

Lee, J.; *et al.* The effects of depilatory agents as penetration enhancers on human stratum corneum structures. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 2240-2247, 2008.

Lods; Dres; Johson, Scholz, Brooks. The future of enzymes in cosmetics, **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p.85-94, 2001.

Lopes, P. S.; *et al.* Evaluation of *in vitro* percutaneous enhancement effect of papain and pequi oil on diclofenac sodium permeation through human skin. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v.44, n.2, p. 225-231, 2008.

Lopes, P. S.; *et al.* Determination of diclofenaco sodium in Eagle's Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salt Solution. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 4, p.681-684, 2003.

Macedo, A.J.; Silva, W.O.B.; Termignoni, C. Properties of a non collagen-degradin *Bacillus subtilis* Keratinase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 180-188, 2008.

Macedo A.J.; *et al.* Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 594-596, 2005.

Mazotto, A. M.; *et al.* Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. **Letters in Applied Microbioloy**, v. 50, p.89-96, 2010.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **OECD Guide 404** Acute Dermal Irritation-Corrosion, 2002.

Özgüney, I. S.; *et al.* Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from, varios formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 4, article 88 (<http://www.aapspharmscitech.org>), 2006.

Pinkus, H. Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observation on thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 16, p. 383-386, 1951.

Radha, S.; Gunasekaran, P. Clonig and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. **Journal os Applied Microbiology**, v. 103, p. 1301-1310, 2007.

Sartorelli, P.; *et al.* Percutaneous Penetration Studies for Risk Assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 133-152, 2000.

Scott, J.A.; Untereiner, W.A. Determination of Keratin degradation by fungi using Keratin azure. **Medical Mycology**, v. 42, p. 239-246, 2004.

Silva, A. P.; Silva, E. A.; Blazquez, F. J. H. Processo de queratinização no desenvolvimento do sistema tegumentar em mamíferos. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.1, p.201-207, 2008.

Smith, W.P.; *et al.* Topical proteolytic enzymes affect epidermal and dermal properties. **International Journal of Cosmetics Science**, v. 29, p. 15-21, 2007.

Souza, V. M. Ativos Dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos. **Tecnopress**, p.159-163, 2003.

Stowe, R.A.; Mayer, R.P. Efficient Screening of Process Variables. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 58, p. 36-40, 1966.

Tatineni, R.; *et al.* Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1596-1602, 2008.

Traversa, E. Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo papaína e avaliação da sua eficácia depilatória sobre o folículo piloso. **Dissertação de mestrado**. São Paulo: USP, p. 159, 2003.

Traversa, E.; Santelli, G. M. M.; Velasco, M V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papains's depilatory effect. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 335, p. 163-166, 2007.

Voegeli, R.; *et al.* Profiling of serine proteases activities in human stratum corneum. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p.191-200, 2007.

Wagner, H.; *et al.* Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 283-295, 2001.

Xie, F.; *et al.* Purification and characterization of four keratinases produced by *streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v.101, p. 344-350, 2010.

Yoshioka, M.; *et al.* Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, 102, p. 509-515, 2007.

Observações gerais: procedimentos padronizados de segurança foram utilizados em todas as etapas experimentais, e incluíram como medidas de biossegurança, o uso de luva, avental e capela de fluxo laminar. Materiais contaminados e/ou potencialmente tóxicos foram descartados conforme as regras recomendadas para cada caso, seguindo as normas da Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho da Faculdade de Farmácia (COSAT-FAR). O tratamento dos resíduos biológicos foi feito através da esterilização por autoclave e posterior descarte em lixo biológico. Já os resíduos químicos e perfurocortantes foram adequadamente armazenados e encaminhados ao órgão

de coleta responsável. Desse modo, foi assegurada segurança dos pesquisadores e do meio ambiente.
