

DANIELLE LIMA LORENZETTI

**ESTUDOS DE APLICAÇÃO DE LIPASES EM FORMULAÇÕES
COSMÉTICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química – Mestrado Profissional, Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Nadia Krieger

Co-orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles

CURITIBA

2007

DANIELLE LIMA LORENZETTI

**ESTUDOS DE APLICAÇÃO DE LIPASES EM FORMULAÇÕES
COSMÉTICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química – Mestrado Profissional, Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger

Co-orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles

CURITIBA

2007

DEDICATÓRIA

... A meus **Pais**,

Mestres da vida, que guiaram meu caminho
e me ensinaram a acreditar na possibilidade
e na conquista do sucesso.

... A minha **Irmã**,

Pelo apoio, o amor e o carinho sempre
presente entre nós.

AGRADECIMENTOS

... Ao Boticário, mas especialmente ao Israel H. Feferman e ao Richard A. S. Schwarzer, pelo apoio e a oportunidade na realização deste trabalho.

... Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

... A Novozymes Latin América - Araucária, PR.

... A Prof^ª. Dr^ª. Nadia Krieger pela orientação, apoio, acompanhamento e revisão do projeto.

... Ao Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles por proporcionar um maior aprofundamento nos testes realizados na pesquisa.

... Aos grandes amigos, Namie Cristiane Biazus e Fabrício Cunha Motta por todo o apoio, carinho e atenção nas horas mais difíceis.

... Às amigas, Ângela Dakiw Piaceski e Marina, que me ajudaram na realização deste trabalho.

... A minha grande amiga Clarice pelo apoio, incentivo e acima de tudo amizade.

... Às minhas amigas e companheiras de trabalho Mirian, Cecilia e Leila pelo incentivo, apoio e compreensão das minhas ausências.

... A todos os meus amigos do trabalho e laboratório que em todos os momentos foram compreensivos mais acima de tudo, companheiros.

... A meus pais e irmã pelo amor, apoio e compreensão.

... A Deus, que me deu saúde e força nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE MATERIAIS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. LIPASES	3
2.2 APLICAÇÕES DE LIPASES NA INDÚSTRIA	9
2.2.1. Aplicações Gerais	9
2.2.2. Aplicações de lipases (e outras enzimas) em produtos cosméticos	12
2.3. COSMETOLOGIA E FISILOGIA DA PELE	15
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 ENZIMA	24
4.2 FORMULAÇÃO COSMÉTICA	24
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA PALATASE EM MEIO AQUOSO	27
4.3.1 Atividade da Palatase dosada pelo método titulométrico	27
4.3.1.1 <i>Método titulométrico manual</i>	27
4.3.1.2 <i>Método pH-Stat</i>	28
4.3.2 Atividade frente ao pNPP	29
4.3.3 Estudo do efeito do pH na atividade	29
4.3.4 Efeito da temperatura na atividade	29
4.3.5 Estudo de estabilidade da enzima em diferentes temperaturas de armazenamento	30
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA PALATASE FRENTE À FORMULAÇÃO COSMÉTICA	30

4.4.1 Atividade frente a diferentes substratos na formulação cosmética	30
4.4.2 Efeito dos componentes da formulação cosmética na atividade	31
4.4.3 Estudo de estabilidade da enzima aplicada no gel em diferentes temperaturas de armazenamento	31
4.5 TESTES DE SEGURANÇA PARA A APLICAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTENDO A PALATASE	32
4.5.1 Estudo histológico do impacto da aplicação da Palatase na pele.	32
4.5.1.1 <i>Estudo da cinética de degradação histológica da pele</i>	33
4.5.1.2 <i>Estudo histológico do impacto da aplicação da Palatase na pele.</i>	34
4.5.2 Teste de citotoxicidade para fibroblastos de pele humana in vitro	36
4.5.2.1 <i>Preparação das culturas de células</i>	36
4.5.2.2 <i>Preparação de amostra e indução das culturas de células</i>	37
4.5.2.3 <i>Detecção de viabilidade celular pelo ensaio de MTT</i>	38
4.5.2.4 <i>Cálculo CL₅₀</i>	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 FORMULAÇÃO COSMÉTICA	41
5.1.1 Formulação da base cosmética	41
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA PALATASE EM MEIO AQUOSO	43
5.2.1 Efeito do pH na atividade enzimática	44
5.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	45
5.2.3 Estudo da estabilidade da Palatase frente à temperatura	46
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PLATASE FRENTE À FORMULAÇÃO COSMÉTICA	46
5.3.1 Atividade da Palatase no gel base	48
5.3.2 Efeito dos componentes da formulação cosmética sobre a atividade da Palatase	49
5.3.3 Estudo da estabilidade da formulação contendo a Palatase frente à temperatura	51
5.4 TESTES DE SEGURANÇA PARA A APLICAÇÃO DA PALATASE NA PELE	52
5.4.1 Estudo histológico do impacto da aplicação da Palatase na pele	52
5.4.1.1 <i>Estudo da cinética de degradação histológica da pele</i>	52
5.4.1.2 <i>Estudo histológico da aplicação da Palatase</i>	67
5.4.2 Teste de citotoxicidade in vitro para fibroblastos de pele humana	74
6. CONCLUSÕES	76
7. TRABALHOS FUTUROS	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PRODUTOS COSMÉTICOS DE MERCADO QUE POSSUEM ENZIMAS NA SUA COMPOSIÇÃO.	15
TABELA 2. FORMULAÇÃO DA BASE COSMÉTICA.	27
TABELA 3. ATIVIDADE DA PALATASE CONTRA DIFERENTES SUBSTRATOS.	44
TABELA 4. ATIVIDADE DA PALATASE FRENTE AO ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	47
TABELA 5. ATIVIDADE DA PALATASE EM GEL CONTENDO 1% DE HIDROXIETILCELULOSE, pH 6,6.	48
TABELA 6. EFEITO DOS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO COSMÉTICA NA ATIVIDADE DA PALATASE.	50
TABELA 7. ATIVIDADE DO GEL BASE CONTENDO 2% DE PALATASE FRENTE AO ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	51
TABELA 8. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 40 MINUTOS APÓS A MORTE (T_0), 25°C.	59
TABELA 9. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS 40 MINUTOS APÓS A MORTE (T_0), 25°C.	60
TABELA 10. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C.	60
TABELA 11. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C.	61
TABELA 12. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 4 HORAS PÓS A MORTE (T_1), 25°C E 3 HORAS DE INCUBAÇÃO A 35°C.	61
TABELA 13. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS DE INCUBAÇÃO A 35°C.	62

II

TABELA 14. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 16 HORAS DE INCUBAÇÃO A 35°C. 62

TABELA 15. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 16 HORAS DE INCUBAÇÃO A 35°C. 63

TABELA 16. VALORES DE P PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS DE ORELHAS DE PORCO DOMÉSTICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS E AS AMOSTRAS UTILIZANDO O TESTE DE QUI-QUADRADO DE PERSON. 64

TABELA 17. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS EM CONTATO COM UMA SOLUÇÃO A 2% DE PALATASE À 35°C. 68

TABELA 18. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS EM CONTATO COM UMA SOLUÇÃO A 2% DE PALATASE À 35°C. 69

TABELA 19. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS EM CONTATO COM UMA SOLUÇÃO A 5% DE PALATASE À 35°C. 69

TABELA 20. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS EM CONTATO COM UMA SOLUÇÃO A 5% DE PALATASE À 35°C. 70

TABELA 21. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS - 4 H APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 H EM CONTATO COM UMA SOLUÇÃO A 2 % DE HIDROQUINONA À 35°C. 70

TABELA 22. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS EM CONTATO UMA SOLUÇÃO A 2 % DE HIDROQUINONA À 35°C. 71

TABELA 23. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO NORMAIS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS EM CONTATO COM TAMPÃO FOSFATO 0,05 MOL/L pH 7,0 À 35°C. 71

III

TABELA 24. PADRÕES HISTOLÓGICOS ENCONTRADOS NA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO CLASSIFICADO COMO ALTERADOS - 4 HORAS APÓS A MORTE (T_1), 25°C, E 3 HORAS EM CONTATO COM TAMPÃO FOSFATO 0,05 MOL/L pH 7,0 À 35°C. 72

TABELA 25. VALORES DE P PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS DE ORELHAS DE PORCO DOMÉSTICO: COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS I, II, III, IV UTILIZANDO O TESTE DE QUI-QUADRADO DE PERSON. 73

TABELA 26. CONCENTRAÇÃO LETAL A 50% DOS FIBROPLASTOS MANTIDOS EM CULTURA (CL_{50}) E CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO LETAL PARA OS PRODUTOS GEL BASE CONTENDO 2% DE PALATASE E PALATASE PURO. 75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES.	6
FIGURA 2 - ESTRUTURA 3D DA PELE.	17
FIGURA 3 - MECANISMO DE RENOVAÇÃO CELULAR.	18
FIGURA 4 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA PALATASE ® L 20.000 PELO MÉTODO TITULOMÉTRICO MANUAL.	44
FIGURA 5 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA PALATASE ® L 20.000 PELO MÉTODO TITULOMÉTRICO pH-STAT.	45
FIGURA 6 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO. VARIÁVEL ESTRATO CÓRNEO CLASSIFICADO COMO NORMAL. AUMENTO DE 200 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.	53
FIGURA 7 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO. VARIÁVEL ESTRATO CÓRNEO CLASSIFICADO COMO NORMAL. AUMENTO DE 200 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.	54
FIGURA 8 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO. VARIÁVEL CITOPLASMA DA CAMADA ESPINHOSA CLASSIFICADA COMO NORMAL. AUMENTO DE 1000 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.	54
FIGURA 9 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO. VARIÁVEL CITOPLASMA DA CAMADA ESPINHOSA CLASSIFICADA COMO ALTERADA. AUMENTO DE 1000 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.	55
FIGURA 10 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO. VARIÁVEL FENDA INTRA-EPIDERMICA CLASSIFICADO COMO ALTERADA. AUMENTO DE 400 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.	55
FIGURA 11 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO. VARIÁVEL JUNÇÃO DERME-EPIDERME CLASSIFICADA COMO ALTERADA. AUMENTO DE 200 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.	56
FIGURA 12 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO DOMÉSTICO. VARIÁVEL GLÂNDULA SUDORÍPARA CLASSIFICADA COMO NORMAL. AUMENTO DE 400 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA.	56

FIGURA 13 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO 57
DOMÉSTICO. VARIÁVEL GLÂNDULA SUDORÍPARA CLASSIFICADA COMO
ALTERADA. AUMENTO DE 400 VEZES. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-
EOSINA.

FIGURA 14 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO 57
DOMÉSTICO. VARIÁVEL BACTÉRIA DE PUTREFAÇÃO CLASSIFICADO
COMO ALTERADA. AUMENTO DE 1000 VEZES. COLORAÇÃO
HEMATOXILINA-EOSINA.

FIGURA 15 - CORTE HISTOLÓGICO DA PELE DE ORELHA DE PORCO 58
DOMÉSTICO. VARIÁVEL BACTÉRIA DE PUTREFAÇÃO CLASSIFICADO
COMO ALTERADA. AUMENTO DE 400 VEZES. COLORAÇÃO
HEMATOXILINA-EOSINA.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

GRAS	Generally Recognized As Safe
FDA	Food and Drugs Administration
LTED	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise –UFPR
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CTFA	Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association
INCI	International Nomenclature Cosmetic Ingredients
pNPP	Palmitato de p-nitrofenila
DMEM	Meio de Cultura: Dulbecco`s Modified Eagle Medium
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
HEC	Hidroxietilcelulose
CL ₅₀	Concentração letal para 50% dos fibroblastos

LISTA DE MATERIAIS

Acetona	F. MAIA Indústria e Comércio LTDA (SP, BR)
Álcool Etílico	Vetec Química Fina LTDA (SP, BR)
BHT	Polytechno Ind Química BR (SP, BR)
Citrato de Sódio	Synth - Indústria Brasileira (SP, BR)
Decilglucosídeo	Cognis Brasil LTDA (SP, BR)
Edetato Dissódico	Merk S/A (AL)
Eosina	Merck S.A. (RJ, BR)
Feniletil Álcool	Firmenich (SP, BR)
Formaldeído	Vetec Química Fina LTDA (SP, BR)
Fosfato de Sódio Bibásico	Merk S/A (AL)
Fosfato de Sódio Monobásico	Vetec Química Fina LTDA (SP, BR)
Hematoxilina	Merck S.A. (RJ, BR)
Hexilenoglicol	Brenntag Química BR LTDA (SP, BR)
Hidroxietilcelulose	Denver Cotia Ind Com LTDA (SP, BR)
Hidróxido de Sódio	Brenntag Química BR LTDA (SP, BR)
Metilcloroisotiazolinona/ Metilisotiazolinona (sol 1,2%)	Daltomar Química LTDA (BR)
Palatase® L20.000	Novozymes Latin América LTDA (PR, BR)
Palmitato de p-Nitrofenila	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Propilenoglicol	Quimisa S/A (SC, BR)
Tributirina	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Trioleína	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
Triton X-100	Vetec Química Fina LTDA (SP, BR)

RESUMO

Foi realizado o estudo da aplicação de lipases (E.C. 3.1.1.3) em cosméticos de limpeza facial para peles oleosas. Foram avaliadas as propriedades da enzima em meio aquoso e na base cosmética e a segurança da aplicação desta enzima na pele. Foi escolhida a enzima Palatase[®]20.000, (Novozymes Latin América, Araucária, PR) por ter uso recomendado em alimentos e ser qualificada como GRAS (Generally Recognized as Safe). Foram realizados estudos para investigar o comportamento cinético e de estabilidade da lipase em meio aquoso, usando o método titulométrico para dosagem da atividade enzimática e tributirina como substrato. A enzima apresentou atividade máxima (170 U/mg) em pH 7,5 e faixa de temperatura para a máxima atividade de 45°C a 50 °C. A enzima foi bastante estável (96% de atividade residual) quando incubada na sua forma líquida a 40°C e 50°C por até 15 dias de armazenamento. A atividade da Palatase no gel base foi maior do que em meio de tampão (179,6 U/mg e 148,5 U/mg, respectivamente). Entretanto, quando incubada a 40 e 50°C no gel base, a atividade residual foi reduzida para 25%. Para avaliação dos efeitos fisiológicos da aplicação do produto contendo a lipase foi desenvolvido um novo método para avaliação “in vitro” do potencial de alteração histológica da pele, utilizando técnicas histológicas e análises microscópicas, além da realização de testes de citotoxicidade utilizando cultivo celular. Os resultados indicaram que a Palatase é um ativo promissor para a indústria cosmética, levando-se em consideração suas atividades frente a matérias-primas cosméticas e aos testes preliminares de segurança. A Palatase não desencadeou alterações histológicas quando realizado uma aplicação única (por 3 h de 2mg da solução enzimática a 5% por cm² de pele de orelha de porco doméstico). Entretanto, a concentração máxima de gel base contendo 2% de Palatase e de Palatase pura sem que ocorra nenhuma morte celular dos fibroblastos da derme é de respectivamente 0,17 e 0,78 % (v/v). Este trabalho representa um avanço na Enzimologia aplicada a cosméticos, tanto do ponto de vista de aplicação de lipases nas formulações, como do desenvolvimento de técnicas de avaliação de seus efeitos na pele.

ABSTRACT

The objective of this dissertation was to study the application of lipases (E.C. 3.1.1.3) in cosmetics for cleaning of facial skin. The properties of the enzyme were evaluated in aqueous media and in a cosmetic base. In addition, the safety of application of the enzyme on skin was evaluated. The lipase preparation chosen for this work was Palatase[®]20.000, (Novozymes Latin America, Araucária, PR), based on the fact that this preparation is recommended for use in foods and has been classified as GRAS (Generally Recognized as Safe). The kinetics and stability of the enzyme in aqueous media were studied using the titrimetric method for activity determination, with tributyrin as the substrate. The optimal pH for enzyme activity was 7.5 while the enzyme had high activity between 45°C and 50°C. The enzyme had a good thermal stability, retaining 96% of its original activity after incubation in its liquid form at 45 and 50°C for up to 15 days. The activity of Palatase in a gel cosmetic base was higher than in buffered aqueous medium (179.6 U/mg and 148.5 U/mg, respectively). However, when the enzyme was incubated for 15 days in the cosmetic gel base at 40 and 50°C, the residual activity was only 25%. In order to evaluate the physiological effects of application of the lipase-containing gel, a method was developed for *in vitro* evaluation of the potential for histological alteration of skin, using histological techniques and microscopic analyses. Tests for cytotoxicity were also undertaken, using cell cultures. The results of the study indicate that Palatase is a promising active ingredient for the cosmetic industry, taking into account its activity against and the preliminary safety tests. Palatase did not trigger histological changes after a single application (3 h, 2 mg of enzyme solution per 5%/cm² of domestic pig ear skin). However, the maximum allowable concentrations of gel-base containing either 2% Palatase or pure Palatase are 0.17 or 0.78 % (v/v), if fibroblast death is to be avoided completely. The present work represents an advance in the application of enzymes in cosmetics, not only from the point of view of the application of lipases in formulations, but also from the point of view of the development of techniques for the evaluation of these formulations on skin.

1. INTRODUÇÃO

A utilização da Biotecnologia na indústria cosmética é uma tendência que cresce cada vez mais. A indústria cosmética se defronta com duas premissas essenciais, que andam, porém, em direções opostas: a busca incessante por inovação e a agilidade de sua implantação, de maneira a garantir manutenção da indústria no cenário mercadológico como pioneira e deste modo, conquistar a credibilidade de seus consumidores. Uma vez que tanto os consumidores quanto os órgãos regulatórios estão cada vez mais exigentes, faz-se necessário um estudo detalhado dos novos ativos para comprovação da sua eficácia e segurança quando aplicados em produtos cosméticos.

Os estudos de aplicações de enzimas em produtos cosméticos são escassamente reportados na literatura, sendo constituídos na maioria por patentes que praticamente não mostram resultados, e por alguns trabalhos que não têm qualquer embasamento científico, e que nem mesmo constam na literatura científica especializada. Entretanto, existem evidências que enzimas podem atuar de modo benéfico em alguns casos, especialmente as hidrolases, dentre as quais as proteases, que hidrolisam ligações peptídicas e podem ser utilizadas em produtos cosméticos destinados à remoção de camadas superficiais da pele (*peelings*) e as lipases, capazes de hidrolisar gorduras, com uso indicado em formulações de xampus e sabonetes de limpeza de peles oleosas, dentre outros usos.

Dentro deste contexto, o presente trabalho pretendeu realizar testes preliminares que pudessem auxiliar no desenvolvimento de aplicações de enzimas lipolíticas em produtos cosméticos, tanto sob os aspectos de atividade e estabilidade da enzima na formulação cosmética, como sob os aspectos de eficácia e segurança de sua aplicação. Para tanto, foi elaborada uma plataforma de testes com o intuito de apontar evidências que pudessem demonstrar de forma científica a viabilidade de aplicação de lipases para fins cosméticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LIPASES

As lipases [triacilglicerol éster hidrolases, (E.C. 3.1.1.3)], ao lado de esterases e proteases, são enzimas bastante estudadas e que possuem inúmeras aplicações industriais, variando desde aplicações em detergentes até a resolução de misturas racêmicas para a produção de fármacos quirais, com grande importância na indústria farmacêutica (Lin *et al.*, 2007; Chaubey *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Krieger *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1995).

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases e são classificadas como serina hidrolases, constituídas pela tríade catalítica G-X₁-S-X₂-G, onde G= glicina; S= serina; X₁= histidina e X₂= ácido glutâmico ou aspártico. A massa molar das lipases se encontra normalmente entre 30 kDa a 69 kDa. Atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, acilgliceróis preferencialmente de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono). Além desses compostos, considerados seus substratos naturais, atuam sobre uma grande diversidade de outros substratos naturais ou sintéticos e são também capazes de catalisar reações de síntese, em ambientes aquo-restritos. As esterases (E.C. 3.1.1.1), por sua vez, também são hidrolases, enzimas largamente distribuídas na natureza, mas sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações ésteres em substratos solúveis em água (Wilson *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2004; Fernandes, 2002; Bornscheuer e Kazlauskas, 2002; Bandmann *et al.*,

2000; Alvarez-Macarie, 1999; Dharmsthiti e Luchai, 1999; Nagao *et al.*, 1996; Jaeger *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1993).

A diferenciação entre lipases e esterases, entretanto, ainda não está completamente definida. As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeias com menos de 10 carbonos são tidas como esterases (Kang *et al.*, 2006; Cajal *et al.*, 2000 a, b; Jaeger, *et al.*, 1999; Verger, 1997; Egloff *et al.*, 1995; Jaeger *et al.*, 1994).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras que contém ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar. Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Tomic, S., 2006; Bornscheuer *et al.* 2002; Nini *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999; Bier, 1955; Brockman, 1984).

Com relação à estrutura das lipases, estudos por difração de raios-X mostram que as estruturas tridimensionais das lipases apresentam um padrão conformacional comum, denominado de conformação α/β hidrolase, composto de uma seqüência de α -hélices e folhas β -pregueadas. O mecanismo catalítico para a hidrólise de um éster por lipases (Figura 1) segue o modelo proposto para a

quimotripsina, uma protease, devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo de lipases e proteases. A histidina da “tampa hidrofóbica” aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio ativo catalítico. O oxigênio da hidroxila serínica provoca um ataque nucleofílico no carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O intermediário tetraédrico expulsa o íon alcóxido, e a partir da transferência de um próton de moléculas de água um dos produtos, o álcool, é formado. O íon hidróxido formado na etapa anterior ataca novamente o carbono carbonílico do resíduo ácido, originando outro intermediário tetraédrico (acil enzima). Este complexo por sua vez libera o ácido carboxílico e a enzima é regenerada (Bornscheuer *et al.*, 2002; Carjal *et al.*, 2000 a,b; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999; Jaeger e Reetz, 1998; Jaeger *et al.*, 1994).

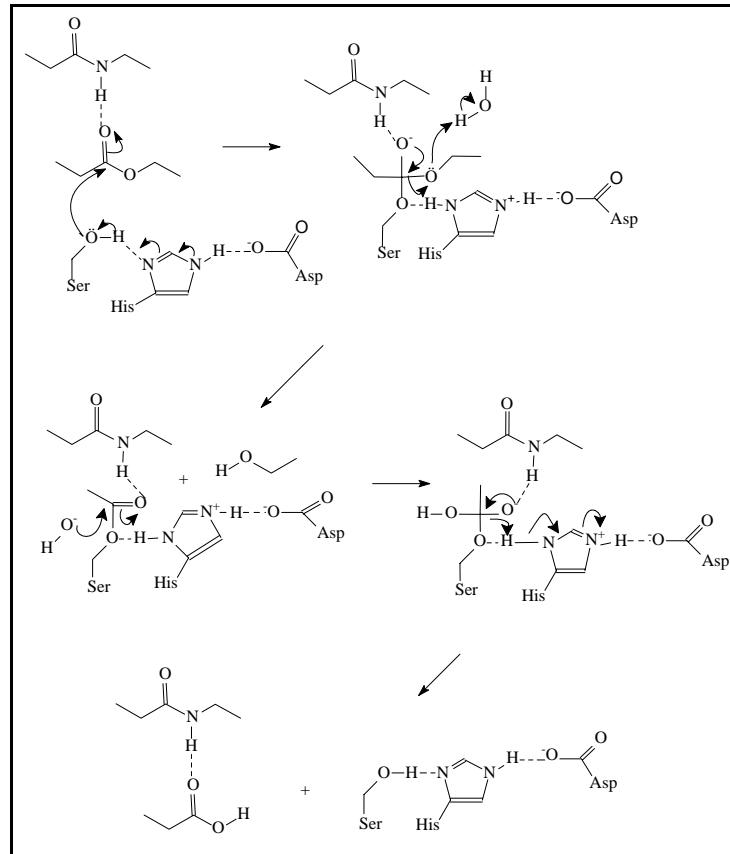


Figura 1. Mecanismo catalítico de lipases. **Fonte:** Jaeger *et al.* (1994).

A utilização de lipases como catalisadores em nível industrial apresenta diversas vantagens relativamente à catálise química e aos biocatalisadores em geral. Dentre elas, pode-se citar a elevada especificidade; a diminuição de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentar; os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Entretanto, sua atividade catalítica, como para todas as enzimas, é freqüentemente muito sensível a condições experimentais, como variações bruscas de temperatura, de pH e de força iônica. Contudo, um estudo otimizado na obtenção de condições apropriadas, possibilita a catálise de forma

eficiente. Além disso, um dos métodos que pode melhorar o desempenho das enzimas em biocatálise é a imobilização dos biocatalisadores sobre suportes sólidos ou por encapsulamento (Wilson *et al.*, 2006; Krieger *et al.* 2004; Watanabe *et al.*, 1995).

As lipases apresentam uma grande diversidade de propriedades moleculares (massas molares e pontos isoelétricos) e físico-químicas, como o pH e temperaturas ótimas para a atividade, estabilidade frente ao pH e à temperatura e especificidade frente a vários substratos. Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo (Wilson *et al.*, 2006; Hasan *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2001; Frost e Moss, 1987; Iwai e Tsujisaka, 1984).

Lipases microbianas de modo geral apresentam atividade máxima em pH entre 6 e 8. Lipases com atividade máxima em valores ácidos de pH têm sido muito pouco freqüentemente encontradas. Entre as exceções de lipases com alta atividade em pH ácido, a maioria é produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, com alta atividade entre pH 2,5 e 5. Entre lipases produzidas por leveduras há apenas duas exceções que apresentam atividade máxima em pH ácido: a lipase de *Ophiostoma piceae*, em pH 5 e a de *Kurtzmanomyces* sp. I-11, com atividade máxima na faixa impressionante de pH entre 1,9 e 7,2 (Mahadick *et al.*, 2002; Van Heerden *et al.*, 2002; Namboodiri e Chattopadhyaya, 2000; Gao e Breuil, 1998).

A temperatura para a atividade máxima varia muito entre lipases microbianas. Entre lipases fúngicas, a grande maioria é ativa na faixa de 37 a 40 °C. As lipases de *Penicillium aurantiogriseum* e de *Rhizomucor miehei* constituem exceções, com atividade a 60 e 65 °C, respectivamente. Lipases de leveduras e

bactérias, entretanto, freqüentemente apresentam atividade em temperaturas mais elevadas (entre 40 e 70 °C), sendo inclusive encontrados exemplos com atividade acima de 70 °C, como as de *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus sp.* H-27, *B. stearothermophilus*, *B. thermocatenulatus* e *Kurtzmanomyces sp.* I-11, com atividade a 75 °C e *Pyrobaculum calidifontis* VA1 e *Archaeoglobus. fulgidus*, com atividade a 90 e 80 °C, respectivamente (Niu *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2004 b; Kambourova *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2000; Imamura e Kitaura, 2000; Manco *et al.*, 1994; Uvarani *et al.*, 1998).

A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial como lipases, uma vez que muitos processos industriais usam temperaturas em torno de 50 °C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade. Entretanto, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. Há vários exemplos de lipases estáveis em temperaturas acima de 70 °C, como as lipases de *Bacillus circulans*, *Pseudomonas cepacia*, *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus fulgidus*, *Candida rugosa* LIP4, *Kurtzmanomyces sp.* I-11, *A. niger* e *A. carneus* (Niu *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Mahadik *et al.*, 2002; Manco *et al.*, 1994).

A enzima Palatase L 20.000, utilizada no presente projeto, é produzida por fermentação submersa de microrganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*), é purificada, e comercializada pela Novozymes. *A. oryzae* é um microrganismo GRAS reconhecido pelo FDA (Food and Drugs Administration)

como por não levar risco à saúde humana. Esta enzima possui sua atividade ótima em pH e em temperatura de 7,5 e 40 °C, respectivamente, e é utilizada na indústria de alimentos para desenvolvimento de aromas em queijo (<http://www.novozymes.com.br>).

As lipases de *A. oryzae* são utilizadas também na indústria de detergentes, sendo que estas não apresentam evidências de irritação ocular, sensibilidade na pele, potencial mutagênico e não são patogênicas. Por este motivo as lipases deste microorganismo podem ser aplicadas com segurança em produtos de consumo sem qualquer precaução especial de uso ou de impacto no meio ambiente (Greenough *et al.*,1996).

2.2 APLICAÇÕES DE LIPASES NA INDÚSTRIA

2.2.1. Aplicações Gerais

Desde o início do século XX, as enzimas lipolíticas são utilizadas no processamento industrial de gorduras e outros lipídeos, sendo que suas aplicações industriais estão relacionadas especialmente com o emprego em detergentes. Além disso, são aplicadas nas indústrias alimentícias, papelreira e oleoquímica; na síntese de fármacos e produtos de química fina; na produção de cosméticos, recuperação e manutenção do meio ambiente e na resolução de misturas racêmicas. As razões para o enorme potencial biotecnológico das lipases microbianas incluem o fato de que elas são estáveis em solventes orgânicos, não

requerem cofatores, possuem ampla especificidade de substrato e exibem alta enantioseletividade. Alguns exemplos de alta enantioseletividade, são as lipases oriundas da bactéria *Burkholderia cepacia*, das leveduras *Candida antarctica* e *C. cylindracea*, que são utilizadas na indústria para a resolução de misturas racêmicas (Tomic, 2006; Isaksson *et al.*, 2006; Gultekin *et al.*, 2004).

A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se principalmente à enantioseletividade exibida por muitas destas enzimas. A catálise enantioseletiva permite a obtenção de produtos opticamente puros, o que é extremamente vantajoso, já que em muitos casos normalmente apenas um dos enantiômeros apresenta atividade terapêutica. Como exemplo, pode-se citar o ácido 2-fenil-propanóico, utilizado na síntese de drogas anti-inflamatórias não esteróides (Ibuprofeno e Naxopreno) e que pode ser obtido através da reação de transesterificação ou de hidrólise do éster correspondente catalisadas por lipases. Um outro exemplo trata-se da utilização da lipase de *C. antarctica* em uma resolução racêmica dos derivados do ácido tiotetrônico, para a obtenção do composto (R)-triolactomicina, que possui um átomo de carbono quaternário quiral em C5, com elevado excesso enantiomérico, (Isaksson *et al.*, 2006; Toyama *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 1999). Outro exemplo é a resolução racêmica de álcoois, realizada na Bend Research Inc. (USA) com a lipase de *C. cylindracea*, com vistas à obtenção de prostaglandinas e compostos esteróides (Gultekin *et al.*, 2004).

As lipases são utilizadas na indústria de detergentes para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, conseqüentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido. Alguns exemplos de enzimas utilizadas em detergentes são a Lipolase® (Novozymes), obtida do fungo *Thermomyces*

lanuginosa e expressa em *A. oryzae*; a Lumafast® (Genencor, USA) e a Lipomax® (Gist-Brocades, Holanda), lipases bacterianas oriundas de *Pseudomonas mendocina* e *P. alcaligenes* (Jaeger e Reetz, 1998).

Na indústria de alimentos, as lipases são intensamente utilizadas, principalmente na hidrólise da gordura do leite, na intensificação do sabor dos queijos e na aceleração do processo de maturação, na fabricação de derivados de queijo e na hidrólise de gorduras e óleos (Hasan *et al.*, 2006; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999).

Na indústria de papel e polpa, os componentes hidrofóbicos denominados “Pitch” (triglicerídeos e ceras encontradas na madeira), causam sérios problemas na manufatura do papel, tais como redução da produção, aumento do custo de manutenção e operação e redução da qualidade. Enzimas têm sido utilizadas para remover estes componentes da polpa, sendo que lipases de *C. rugosa*, empregadas em uma indústria japonesa, chegam a hidrolisar 90% dos triglicerídeos encontrados na madeira (Kontkanen *et al.*, 2006; Jaeger e Reetz, 1998).

O uso de lipases na indústria oleoquímica, ou seja, em processos que envolvem reações de alcólise, acidólise, hidrólise e glicerólise, economiza energia e minimiza degradações térmicas de produtos e reagentes. As reações de hidrólise na indústria geralmente são realizadas quimicamente, em condições drásticas, através de tratamento com vapor a altas temperaturas (240 a 260 °C) e elevadas pressões. Mediante estas condições, os ácidos graxos instaurados se decompõem e se polimerizam, formando muitas vezes produtos indesejados. Quando se realiza a hidrólise catalisada por lipases, o processo fica isento de tais

problemas; mas, devido ao elevado custo destas enzimas, a hidrólise lipolítica ainda é menos econômica do que a convencional. O processo torna-se economicamente viável para casos específicos, como produtos de química fina, pois possuem um alto valor agregado (Hasan, *et al.*, 2006; Lima e Angnes, 1999; Patel *et al.* 1996).

Na área ambiental, as lipases podem ser utilizadas para remoção de óleos presentes nas águas residuais de fábricas, restaurantes ou residências, ou provenientes de indústrias de refinação de óleos e que poluem solos e água. Além disso, também podem ser utilizadas na remoção de depósitos de gorduras que se formam em sistemas de tubulação de água quente, bebidas e alimentos líquidos. A aplicação de microrganismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo é sugerida como uma alternativa de biorremediação (Hasan, *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 1999; Reetz, 1998).

2.2.2. Aplicações de lipases (e outras enzimas) em produtos cosméticos

Na indústria cosmética, campo de atuação deste projeto, a utilização das enzimas vem se intensificando, não apenas na síntese de matérias-primas que são utilizadas em cosméticos, mas também como ingredientes ativos nas formulações cosméticas. As lipases, pela sua atividade biológica, que é a hidrólise de triacilgliceróis, potencialmente possuem uma grande área de aplicação, principalmente no tratamento da pele e cabelos oleosos, através da sua utilização

em produtos para limpeza, como géis e xampus, assim como ativos que auxiliam no tratamento de celulite, através da lipólise dos adipócitos.

Algumas patentes que utilizam enzimas na indústria farmacêutica e cosmética já foram depositadas. As enzimas mais utilizadas nas patentes são as proteases, lipases, oxidases e melanases, tanto para clareamento da pele, como para remoção das camadas superficiais da pele. Por exemplo, a patente U.S. 6514506 B1, descreve uma composição clareadora contendo um extrato enzimático (contendo melanase) para a retirada de manchas na pele. Este extrato enzimático pode ser derivado de *Aspergillus fumigatus* ou de *Saccharomyces cerevisiae* e possui uma ação duas vezes maior que o ácido kójico (amplamente utilizado pelas farmácias de manipulação no efeito de clareamento de manchas da pele); a patente WO 2006/018048 A1 relata a estabilidade de sistemas de liberação enzimáticos aquosos (como ciclodextrinas) e não aquosos em produtos cosméticos contendo lipases, proteases e oxidases. Estes sistemas de liberação mantêm estas enzimas estáveis em produtos para hidratação da pele, controle da oleosidade (lipase), esfoliantes (proteases) e cremes para clarear a pele (oxidases). A patente U.S 20030026794 A1, descreve um método de tratamento da pele contendo enzimas seletivas (proteases) que removem uma camada específica da pele. Uma outra patente (U.S 5578296 A) relata a decomposição da melanina utilizando cultura de *Basidiomicetos* (macrofungos), que pode ser utilizada em produtos cosméticos para clareamento de manchas (Guth e Lentner, 2006; Fein *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2002; Mammone *et al.*, 2003; Kashimo *et al.*, 1996).

Pode-se ainda citar a patente WO 0076458 A3, que descreve a aplicação de lipase, protease e peroxidase em produtos cosméticos com intensa ação na pele, especificamente efeito regenerativos. Outra patente de interesse é a CN1316500-A, que descreve um sabonete alcalino com lipase para limpeza da pele com as principais vantagens de não ser irritante, custo mais baixo e baixa concentração de detergente na formulação. Além disto, a patente JP2004244355-A descreve uma formulação cosmética para prevenir e tratar a obesidade localizada contendo cafeína e lipase. A patente EP 0710478 B1 descreve uma composição tópica contendo lipases e ativos precursores para o tratamento da pele (Garrido e Quimibel, 2004; Xinmin e YU, 2001; Golz-Berner e Zastrow, 2000; De Salvert *et al.*, 1997).

Além das patentes citadas acima, podemos relacionar alguns produtos cosméticos que estão no mercado e que possuem enzimas na sua composição (Tabela 1). Verifica-se que a enzima mais utilizada é a protease, cuja finalidade biológica é a hidrólise de proteínas. Quando utilizada em cosméticos, pode promover a remoção superficial das camadas da pele (“*peeling*”). Em seguida, aparece a utilização de glicose-oxidases (EC 1.1.3.4.), que biologicamente têm a função de catalisar a reação de oxidação da (β)-D-glicose em D-ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. É altamente específica para (β)-D-glicose e não atua na (α)-D-glicose. Em Cosmetologia, a glicose-oxidase é adicionada para promover a esfoliação da pele através da formação de um poliidroxiácido (ácido glucônico) e, em cabelos combate a caspa através da esfoliação e dá brilho aos fios. Neste caso, conjuntamente é utilizada também a lactoperoxidase (EC1.11.1.7.), que catalisa a reação de oxidação do peróxido de hidrogênio formado pela glicose-

oxidase. Além disso, em cosméticos, a glicose-oxidase é utilizada como anti-radical livre na pele (<http://www.gnpd.com/>).

Tabela 1. Produtos cosméticos de mercado que possuem enzimas na sua composição.

FABRICANTE	PRODUTOS / FABRICANTE	ENZIMA ADICIONADA	FINALIDADE
Burt's Bees	Lemon Poppy seed Facial Cleanser®	Glicose oxidase e lactoperoxidase	"peeling" e anti radicais livres
Burt's Bees	Shea Butter Hand Repair Creme®	Glicose oxidase e lactoperoxidase	"peeling" e anti radicais livres
Cosmetique Asia	Green Papayna Soap®	Papaína	Ajuda a eliminar as células mortas as pele
Carica Herbal Health Products	Deep Clean Face and Body Soap®	Papaína	Ajuda a eliminar as células mortas as pele
Burt's Bees	Herbal Treatment Shampoo®	Glicose oxidase e lactoperoxidase	"peeling" e anti radicais livres
Avalon Natural Products	Alba Hawaiian Passion Fruit Body Wash®	Bromelaina	Ajuda a eliminar as células mortas as pele
Laboratorium Kosmetyczne Kabeno	Peeling Enzymatyczny Exfoliating Cream®	Enzimas queratolíticas	Ajuda a eliminar as células mortas as pele
Kabeno	Cleanse Soap C®	Dextran solidified protease	Ajuda a eliminar as células mortas as pele
Avon	Dramatic Soother Facial Mask®	Protease	Ajuda a eliminar as células mortas as pele

Fonte: <http://www.gnpd.com/>

2.3. COSMETOLOGIA E FISIOLOGIA DA PELE

Devido à importância dos materiais secretados pela pele neste trabalho, a seguir serão descritos alguns tópicos relevantes para o entendimento dos mecanismos de ação de um produto cosmético.

Por definição, cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, com objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado. A

função de um cosmético na derme não é terapêutica, mas sim profilática, ou seja, ajuda a manter a homeostase (o equilíbrio) da pele. Os cosméticos, portanto, são limitados à aplicação tópica, na pele integra e nunca lesada, como hidratante da pele, corretores de imperfeições visíveis, ou produtos para limpeza e desinfecção da pele (<http://anvisa.gov.br>; De Polo, 1998).

A pele é o principal órgão do corpo humano de comunicação com o exterior (meio ambiente), que serve como proteção para o organismo. A pele forma uma eficiente barreira permeável, que é constantemente renovada através de um processo biológico chamado queratinização. É o maior órgão do corpo humano e compreende aproximadamente 5% do seu peso total. O seu nível de registro de grande precisão dos sintomas de dores, tato, calor e frio, alertam o organismo para elaborar uma resposta correspondente (De Pólo, 1998; Rubin e Viglioglia, 1989).

Além das funções de proteção contra agressões físicas, à temperatura e radiação ultravioleta a pele tem a função de prevenir a penetração de agentes materiais nocivos, incluindo a água e microrganismos. Possui também a função de excretar materiais sebáceos e suor através da glândula sebácea e sudorípara e controlar a perda de fluidos, sais, hormônios e outros materiais endógenos; promover termoregulação do corpo através da evaporação de água pela glândula sudorípara (De Pólo, 1998).

A pele humana está constituída por três camadas em corte perpendicular: epiderme, derme e hipoderme (Figura 2) (Rubin e Viglioglia, 1989).

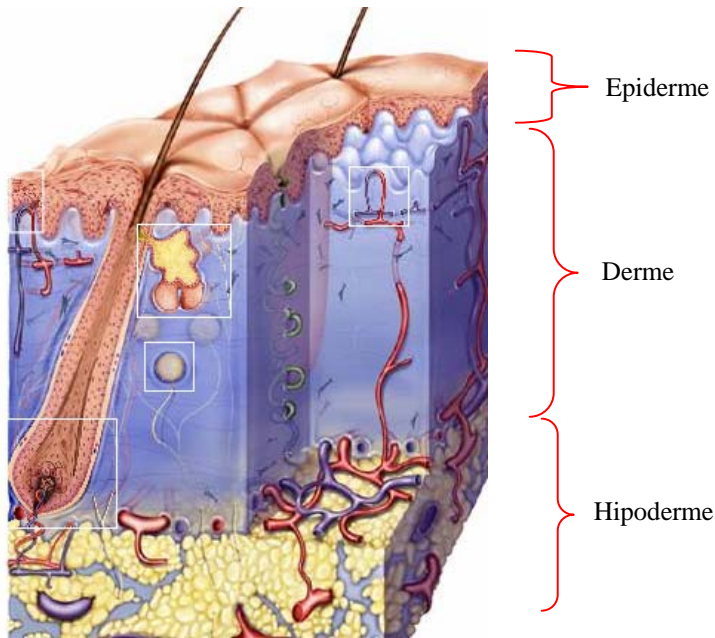


Figura 2. Estrutura tridimensional da pele. **Fonte.** <http://www.skin-science.com>

A epiderme consiste em um número de camadas que se renovam periodicamente. A estratificação é o resultado da mudança nos queratinócitos da camada basal até a mais superficial (queratinização), que é continuamente formada por mitose celular (Figura 3). Três outras células estão presentes na pele: melanócitos ou células de pigmentos; células de Langerhans, que são incolores e em forma dendrítica, e células Merkel, que promovem as sensações. A epiderme tem a sua função protetora através da queratina, uma proteína que cornifica a superfície da pele, através da síntese do pigmento chamado melanina. Além disto, é esta camada que serve como uma membrana permeável para as substâncias sólidas, líquidas e gasosas (Rubin e Viglioglia, 1989; Wilkinson e Moore, 1982). A epiderme é formada por estrato córneo, estrato lúcido, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal ou germinativa (Souza, 2003).

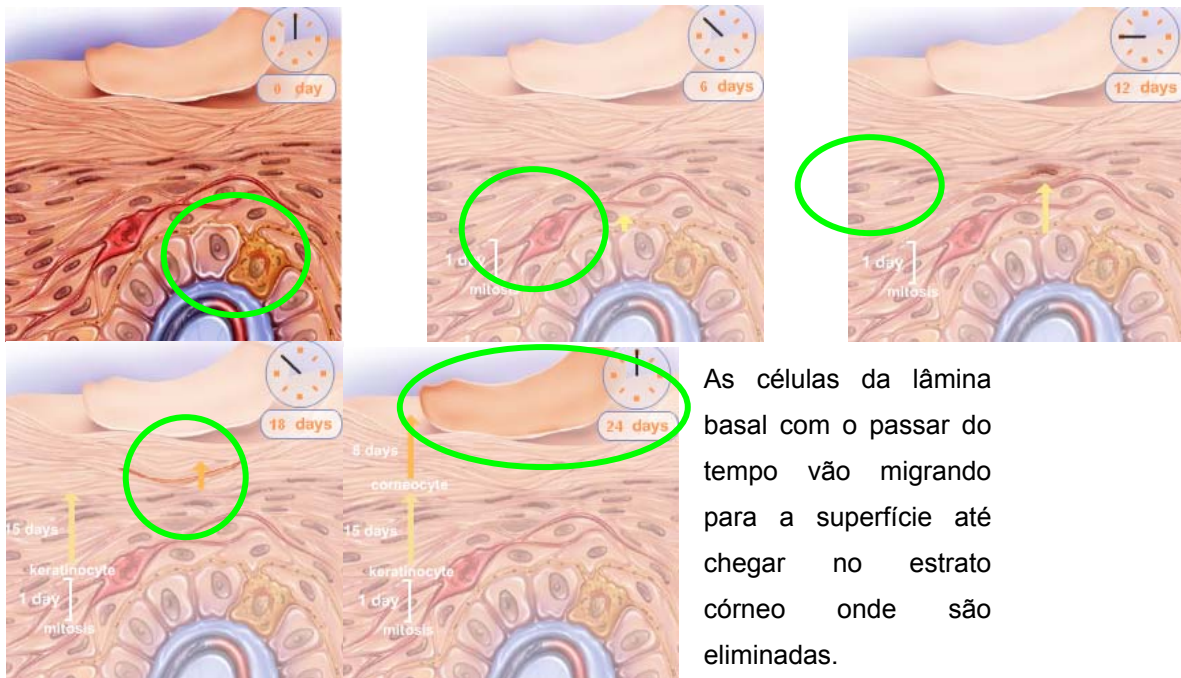


Figura 3. Mecanismo de renovação celular. **Fonte.** <http://www.skin-science.com>

O estrato córneo é a camada mais externa formada por fileiras de células mortas, anucleadas e constituídas por queratina. As fileiras mais superficiais estão em processo de descamação contínua. O estrato lúcido é encontrado onde a pele é mais grossa, como a palma das mãos e a planta dos pés. É a camada mais profunda da camada córnea. É acidófila e compacta. Já a camada granulosa é rica em enzimas e é constituída por grânulos de queratoialina. Suas células não têm capacidade de divisão celular e tem a função de sintetizar queratina. A camada espinhosa é constituída de várias fileiras de células que se unem entre si, através de desmossomas. Os desmossomas são espessamentos da membrana celular e se unem entre si, pelo cimento intercelular. Entre as células espinhosas, encontram-se células de Langerhans, que apresentam em sua superfície receptores para imunoglobina E (IgE), que capta antígenos exteriores. A última

camada da epiderme é a camada basal ou germinativa, é a camada responsável por dar suporte à epiderme e que estabelece a união com a derme. A camada germinativa dá origem às camadas epidérmicas por reprodução continuada. Nesta camada estão os melanócitos, células que formam a melanina são transferidas para os queratinócitos através das dendritas (Souza, 2003).

A junção derme – epiderme não é formada por um plano liso, e sim por uma região ondulada composta por papilas que aumentam a superfície de contato entre a derme e a epiderme. Nesta região, há uma facilidade de difusão de nutrientes, fatores de crescimento e xenobióticos (composto químico que não é produzido e tampouco pode ser degradado por organismos vivos). No envelhecimento natural da pele existe uma redução desta superfície de contato, tornando mais difícil a difusão de nutrientes. Esta junção derme-epiderme é feita por quatro camadas que podem ser vistas pelo microscópio eletrônico. Nesta junção, está presente grande quantidade de proteínas tais como, laminina, colágeno IV, V e VII, glicoproteínas, além de antígenos I e II e os hemidesmosomos. Os hemidesmosomos são regiões especializadas que ocorrem nas membranas adjacentes que formam uma ponte entre duas células vizinhas, por onde se conectam os filamentos intermediários, formando uma estrutura de grande força (Schaefer e Redelmeier, 1996).

A derme é um tecido eminentemente fibroso (fibras colágenas, elásticas e reticulinas) e é mais espessa que a epiderme. Contém os apêndices de anexos cutâneos do tipo: córneos (pêlos e unhas) e glandulares (glândulas sebáceas e sudoríparas). A derme também desempenha a função protetora, o que representa a segunda linha de defesa contra traumatismos e contém as vias necessárias para

o sistema vascular cutâneo. A epiderme, que é um tecido avascular, depende totalmente da irrigação sanguínea dérmica. A derme constitui um enorme depósito potencial de sangue, eletrólitos e água. A hipoderme está situada abaixo da derme e desempenha várias funções. Antes de tudo ela serve como isolante do calor, que conserva a temperatura corporal. A hipoderme se comporta como uma verdadeira “almofada” que atua como amortecedor de traumas. Por fim, a hipoderme serve como reserva energética através do depósito de substâncias graxas (Rubin e Viglioglia, 1989; Wilkinson e Moore, 1982).

É estimado que existam cerca de 2.380.000 glândulas sudoríparas por toda a superfície do corpo. Estas glândulas são divididas em dois tipos: écrinas e apócrinas. As glândulas do tipo écrinas são mais numerosas e sua função é de regular o equilíbrio térmico do organismo. São controladas pelo sistema nervoso simpático e sua origem é na derme ou hipoderme com a abertura da via do ducto na superfície da pele. A composição e o volume da excreção écrina depende da atividade física, alimentação, emoção, dentre outros, é uma mistura hipotônica em média de 99% de água, com eletrólitos tais como cloreto de sódio e bicarbonato, uréia e ácido úrico, aminoácidos, ácidos graxos voláteis como ácido fórmico e butírico, colesterol e outros esteróis, açúcares e lipídeos, com pH de 4,2 a 7,0 (Rubin e Viglioglia, 1989; Wilkinson e Moore, 1982).

As glândulas sudoríparas apócrinas são de tamanhos superiores às écrinas, localizadas seletivamente nas axilas, mamas e zona anoperineogenital. A excreção apócrina é leitosa, viscosa e inodora, que contém proteínas, açúcares redutores, amônia e esteróis. Tanto a excreção apócrina como a écrina são inodoras ao serem liberadas. O desenvolvimento do odor desagradável do suor é

o resultado da ação de bactérias anaeróbias sobre a excreção apócrina, rica em substâncias orgânicas que são substratos ideais para o crescimento de bactéria (Rubin e Viglioglia, 1989; Wilkinson e Moore, 1982).

Glândulas sebáceas existentes na pele, estimuladas por testosterona e inibidas por estrógeno, são formações anexas a um folículo piloso, no qual desembocam e vertem sua secreção, o sebo, constituído por acumulação de múltiplas gotas de lipídeos e restos celulares. A função fundamental do sebo é de lubrificar a pele, formando com a secreção sudorípara uma emulsão perfeita que recobre a superfície da pele formando o manto hidrolipídico (Rubin e Viglioglia, 1989).

O sebo humano é constituído por aproximadamente 60% de glicerídeos e ácidos graxos, 25% de ésteres de ceras, 12% de esqualeno, 2% de ésteres de colesterol e 1% de colesterol. Foram identificados no sebo humano mais de 200 diferentes ácidos graxos. No entanto as células da epiderme, os queratinócitos, possuem em geral 6,6% de fosfolipídeos, 18,9% de colesterol, 2,0% de ácidos graxos livres, 24,4% de ceramidas, 2,0% de sulfato de colesterol e traços de glicosilceramida (Wilkinson e Moore, 1982).

A pele oleosa não é uma doença por si, mas o seu aspecto desagradável favorece o desenvolvimento de problemas. Em geral, a pele oleosa é densa, com poros dilatados, aspecto engordurado e brilhante, devidos à produção exagerada de sebo (sem alterar a sua composição). Estas condições favorecem o aparecimento de espinhas e comedões (pontos pretos da oxidação do sebo). Diferente de uma pele oleosa, a seborréia é uma alteração qualitativa e quantitativa da secreção sebácea (aumento na concentração de ácidos graxos

livres), que pode gerar uma modificação morfológica e funcional da unidade pilosebácea, desencadeando a acne. A acne é o resultado de um processo inflamatório desencadeado pela obstrução da unidade pilosebácea pelos ácidos graxos livres em excesso em uma pele seborréica; com esta obstrução há um ambiente de anaerobiose e os microrganismos produzem substâncias tóxicas que degradam a queratina, agredindo mais as células (processo inflamatório) (Fabre, 1999; Guiraud, 1997).

Devido à semelhança com a pele humana em termos de densidade de folículos pilosos, a pele de porco, principalmente quando jovem, tem sido utilizada como modelo de membrana para estudos de permeação “*in vitro*” e “*in vivo*”. Sua permeabilidade tem sido amplamente estudada e tem provado ser um bom modelo animal para simular a pele humana. A permeação cutânea do nicorandil, utilizado para prevenir e tratar angina, é semelhante quando utilizadas peles humanas e peles da orelha de porco. A pele de porco e a pele humana têm superfície lipídica espessura de barreira e aspectos morfológicos similares. Então, sugere-se a utilização de pele de porco para a estimar o comportamento da pele humana *in vitro* (Lopes e Kaneko, 2000; Sato *et al.*, 1991).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o estudo da viabilidade da aplicação de lipases em cosméticos de limpeza facial para peles oleosas. Para isto, leva em consideração a atividade, a estabilidade destas enzimas, segundo o *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*, descrito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Objetivos específicos:

- Caracterização cinética e de estabilidade da enzima Palatase: efeito do pH, da temperatura na atividade e na estabilidade.
- Caracterização da enzima Palatase frente a uma formulação cosmética definida para limpeza facial;
- Realização de testes de segurança para a aplicação Palatase na pele;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Departamento de Química, no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB), da Universidade Federal do Paraná; no laboratório de Pesquisa e Inovação de O Boticário; no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.1 ENZIMA

A enzima escolhida para o presente trabalho foi a Palatase[®] L 20.000 da Novozymes Latin America Ltda (Araucária, PR), de uso indicado na indústria alimentícia, sendo proveniente de *Aspergillus oryzae*, um microrganismo geneticamente modificado e não-patogênico, reconhecido como GRAS, segura para o uso em produtos cosméticos. Além disso, também foram levadas em conta as suas propriedades cinéticas, principalmente – pH e temperatura ótima para a atividade (7,5 e 40 °C, respectivamente citados pelo fabricante).

4.2 FORMULAÇÃO COSMÉTICA

A formulação está descrita na Tabela 2 com seus constituintes, concentrações e funções.

A base cosmética foi formulada por um agente de reologia ou agente geleificante derivado da celulose, como a hidroxietilcelulose, que possui alta eficiência como agente de viscosidade, pois é compatível com grande variedade de matérias-primas cosméticas, incluindo tensoativos aniônicos e catiônicos, eletrólitos e materiais não iônicos. Em sistemas detergentes a hidroxietilcelulose promove uma boa espalhabilidade na superfície aplicada. A hidroxietilcelulose, é estável em uma larga faixa de pH (4-10) e pode proporcionar uma faixa variável de viscosidade para o produto, mudando-se apenas a sua concentração (Knowlton, 1996).

Foi utilizado um sistema conservante com ação bactericida e fungicida (metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona ou 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona/2-metil-4-isotiazolin-3-ona), e um sistema sequestrante que se complexa com muitos íons metálicos em solução (edetato dissódico ou disódico N,N`- 1,2-etanodibis[N- (carboximetil)Glicina], removendo a disponibilidade de formação e precipitação de sais insolúveis na formulação (Knowlton, 1996).

O decil glicosídeo (Decil- β -D-glicopiranosídeo) está presente na formulação como agente tensoativo não iônico e não irritante auxiliando na limpeza e formação de espuma na hora da aplicação (Knowlton, 1996).

Substâncias como o propilenoglicol (1,2-propanodiol), butilenoglicol (1,3-butanodiol) e hexilenoglicol (2-metil-2,4-pentanodiol) são classificados como umectantes em Cosmetologia por que possuem capacidade de reter água superficial e auxiliam na hidratação da pele. O propilenoglicol é um líquido viscoso incolor e completamente solúvel em água e seu efeito umectante e condicionante é obtido em concentração a partir de 5% na formulação. No entanto, seu efeito

solvente necessita de concentrações baixas, usualmente a partir de 1%, até 5%, dependendo do soluto utilizado. O butilenoglicol possui propriedades cosméticas similares ao propilenoglicol (umectante e solvente), mas é mais higroscópico e viscoso do que este. O hexilenoglicol é um bom solvente, mas possui propriedades umectantes moderadas se comparado com o propilenoglicol e o butilenoglicol (Hunting, 1987).

Fragrâncias cosméticas são associações de muitos, possivelmente centenas, de diferentes materiais, muitos possuem função química reativas, como grupos aldeídos, cetonas e duplas ligações, além de óleos essenciais. São constituídos de compostos perfumados para mascarar o odor original da base cosmética e tornar o produto final mais agradável ao usuário (Hunting, 1987).

BHT (hidróxitolueno butilado ou 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) é um antioxidante para a formulação cosmética, é utilizado como estabilizante químico impedindo com que o produto se oxide e ocorra alterações físicas e químicas. É um pó cristalino branco insolúvel em água, mas solúvel em álcool, óleo mineral e óleos vegetais. (Hunting, 1987).

A Palatase[®] foi utilizada na concentração de 2% (v/v) na formulação cosmética para os presentes ensaios.

Tabela 2. Formulação da base cosmética.

MATÉRIA-PRIMA (INCI* NAME TRADUZIDO)	CONCENTRAÇÃO (% P/P)	FUNÇÃO
Hidroxietilcelulose	1,0	Agente geleificante
Metilcloroisotiazolinona/Metilisotiazolinona (sol. 1,2%)	0,05	Conservante
Edetato dissódico	0,05	Seqüestrante
Decilglucosídeo	6,0	Tensoativo
Água Destilada	q.s.p.100,0	Veículo
Propilenoglicol	5,0	Umectante
Butilenoglicol	3,0	Umectante
Hexilenoglicol	2,0	Umectante
BHT	0,05	Antioxidante
Feniletil álcool	0,2	Perfume

* INCI name: International Nomenclature Cosmetic Ingredients; **Fonte:**<http://www.ctfa.org>

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA PALATASE EM MEIO AQUOSO

4.3.1 Atividade lipolítica da Palatase dosada pelo método titulométrico

4.3.1.1 Método titulométrico manual

A determinação de lipases por titulometria é o método ideal para determinar a atividade lipolítica durante a sua produção ou para estudar a cinética de uma lipase em meio aquoso, pois propicia a existência de uma interface e pode utilizar substratos naturais destas lípases, comprovando a atividade lipolítica dita “verdadeira”. O método utilizado neste trabalho baseia-se naquele proposto por Stuer *et al* (1986), com modificações, envolvendo a titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre triacilgliceróis. O meio reacional consiste de 0,2 mol/L de substrato (trioleína ou tributirina) emulsionado com 6%

(m/v) de Triton X-100 e 74% (v/v) de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. Adicionou-se 1,0 mL de enzima a 5,0 mL de meio de reação e incubou-se por 30 minutos a 37°C, sob agitação. Após a incubação, 16,0 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol foram adicionados a esta solução que foi titulada com NaOH 0,05 mol/L. Uma unidade de atividade enzimática é equivalente a 1 mol de ácido graxo produzido na unidade de tempo.

4.3.1.2 Método pH-Stat

O meio reacional consiste de 0,2 mol/L de substrato emulsionado com 6% (m/v) de Triton X-100 e 74% (v/v) de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. Adicionou-se 1,0 mL de enzima ou solução enzimática a 15,0 mL de meio de reação e incubou-se por 5 minutos a 37 °C, sob agitação. Durante os 5 minutos da reação o pH é mantido em 7,0 através da titulação com NaOH 0,01 mol/L. Uma unidade de atividade enzimática é equivalente a 1µmol de ácido graxo produzido na unidade de tempo.

As determinações das atividades neste trabalho foram utilizadas como substrato a trioleína, utilizando-se o titulador automático pH-Stat Metrohm 718. Sendo que foram utilizando 1 mL da solução enzimática (1:500 em tampão fosfato pH 7,0; 0,05 mol/L).

4.3.2 Atividade frente ao pNPP

Foi realizado o ensaio em triplicata da atividade frente ao pNPP (palmitato de *p*-nitrofenila) com três diluições do extrato enzimático, 1:300, 1:400 e 1:500, cada diluição foi realizada em triplicata. O método utilizado foi o método do pNPP descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado conforme Krieger, (1995).

4.3.3 Estudo do efeito do pH na atividade enzimática

Para determinar o efeito do pH em 30 min de reação na atividade, os ensaios foram realizados pelo método titulométrico manual variando-se o pH do meio reacional entre 5,0 a 8,0. Os ensaios com tampão fosfato 0,05 mol/L foram realizados entre pH de 6,0 a 8,0, e para o tampão fosfato-citrato 0,05 mol/L entre pH 5,0 a 6,0. O substrato utilizado foi a trioleína (0,2 mol/L). Foi utilizado 1,0 mL da solução enzimática (1:500 nos tampões especificados acima).

4.3.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para determinar o efeito da temperatura na atividade enzimática, os ensaios foram realizados pelo método titulométrico através do pH-Stat Metrohm 718, variando-se a temperatura dos ensaios entre 25 e 60 °C. Foram utilizados 15,0 mL

do meio reacional e 1,0 mL da solução enzimática (1:500 em tampão fosfato pH 7,0; 0,05 mol/L). O substrato utilizado foi a trioleína (0,2 mol/L).

4.3.5 Estudo de estabilidade da enzima em diferentes temperaturas de armazenamento

Para determinar o efeito do armazenamento na atividade, a Palatase[®] foi armazenada em estufas controladas nas temperaturas de - 4 °C, 25 °C, 37 °C, 45 °C e 50 °C, seguindo o *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*, descrito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. As determinações das atividades foram realizadas após 7 dias e após 15 dias e comparadas com um branco (T₀, sem incubação). Os ensaios foram realizados pelo método titulométrico utilizando o pH-Stat Metrohm 718 a temperatura de 37 °C. Foram utilizados 15,0 mL do meio reacional e 1,0 mL da solução enzimática com diluição 1:500 em tampão fosfato pH 7,0, 0,05 mol/L. O substrato utilizado foi a trioleína (0,2 mol/L).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA PALATASE FRENTE À FORMULAÇÃO COSMÉTICA

4.4.1 Atividade frente a diferentes substratos na formulação cosmética

Ensaio de atividades foram realizados utilizando 0,2 mol/L de tributirina e trioleína como substratos, usando como meio reacional gel a 1% de

hidroxietilcelulose com pH 6,6. A determinação da atividade da lipase foi baseada no método titulométrico utilizando 30 min como tempo da reação; os substratos foram emulsionados no meio reacional com 6% (m/v) de Triton X-100 e a titulação foi realizada usando uma solução 0,05 mol/L de NaOH.

4.4.2 Efeito dos componentes da formulação cosmética na atividade

Para estudar o efeito dos componentes da formulação foram realizados ensaios de determinação da atividade lipolítica frente à trioleína (0,2 mol/L), pelo método titulométrico manual (conforme item 4.3.1.1) utilizando-se como meio reacional diferentes preparações do gel: (1) gel com 1% de hidroxietilcelulose; (2) gel de hidroxietilcelulose adicionado de cada componente da formulação isoladamente com suas devidas concentrações; (3) formulação completa.

4.4.3 Estudo de estabilidade da enzima aplicada na formulação base em diferentes temperaturas de armazenamento

Para determinar o efeito da temperatura de armazenamento na atividade, a enzima foi armazenada nas temperaturas de - 4 °C, 25 °C, 37 °C, 45 °C e 50 °C. As determinações de atividade foram realizadas após 3, 7 e 15 dias e comparadas com um branco (T_0 , sem incubação). Os ensaios foram realizados pelo método titulométrico através do pH-Stat Metrohm 718 a temperatura de 37 °C. Foram

utilizados 15,0 mL do meio reacional e 0,5 mL da formulação base contendo 2% da enzima. O substrato utilizado foi a trioleína (0,2 mol/L).

4.5 TESTES DE SEGURANÇA PARA A APLICAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTENDO A PALATASE

4.5.1 Estudo histológico do impacto da aplicação da Palatase na pele.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o impacto de uma determinada matéria-prima ou ativo sobre a pele, analisando as possíveis alterações histológicas das estruturas da pele sob a influencia da Palatase pura. Para esta parte do trabalho, foi realizado um treinamento prévio com o professor e patologista, Dr José Ederaldo Queiroz Telles, para a padronização das análises histológicas da pele, e assim garantir a qualidade na interpretação dos resultados.

O estudo da cinética de degradação da pele foi realizado preliminarmente para avaliar o tempo necessário de aplicação da Palatase na pele, de modo que se tenha certeza que os resultados possam ser atribuídos apenas aos ativos, e não ao processo de degradação natural da pele pós-morte.

Após a determinação das melhores condições experimentais, foi realizado um segundo estudo com o intuito de estudar os efeitos da aplicação propriamente dita da Palatase na pele em comparação a um ensaio em branco (tampão fosfato 0,05 mol/L e pH 7,0).

4.5.1.1 Estudo da cinética de degradação histológica da pele de porco

Este estudo foi realizado com fragmentos de pele provenientes da orelha de porco doméstico obtida 40 min após a morte do animal. Diferentes temperaturas e tempos de incubação foram estudados: (1) tempo inicial, sem incubação, (T_0); (2) 4 h após a morte do animal, com fragmentos mantidos em temperatura ambiente (T_1); (3) 4 h após a morte do animal à temperatura ambiente, mais 3 h de incubação em estufa a 35 °C (mais próximo a temperatura natural da pele humana) (T_2); (4) 4 h após a morte do animal à temperatura ambiente, mais 17 h de incubação em estufa a 35 °C (T_3). A derme dos fragmentos de pele foi mantida em contato com uma solução tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, para manter uma maior viabilidade celular e evitar o ressecamento dos fragmentos incubados a 35 °C. Ao término de cada tempo estipulado os fragmentos foram retirados e lavados em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. Após a lavagem, os fragmentos foram fixados em solução aquosa de formol 10% (v/v) e em seguida coloridos com hematoxilina-eosina (Junqueira e Carneiro, 1995).

É importante ressaltar que o tempo de 40 min após a morte do animal a 25 °C é considerado no presente trabalho como o tempo onde ainda não há alterações histológicas (branco). O tempo de 4 h após a morte do animal a 25 °C é o tempo médio de preparo de todos os materiais para o início do teste com incubação sendo, deste modo, um tempo obrigatório para estudar a integridade destas peles. Com relação ao tempo de incubação, foram testados 3 h a 35° C,

sendo considerado um teste drástico, mas necessário, para análise de produtos utilizados com enxágüe. Foi testado o tempo de 16 h em incubação a 35 ° C para uma análise de produtos sem enxágüe.

Foram utilizadas 4 orelhas de porco, sendo cada uma dividida em 20 fragmentos de 1cm². Os ensaios foram aleatorizados com os 4 tempos nas 4 orelhas, resultando em 20 repetições para cada ensaio de tempo. Foi utilizado como ferramenta estatística o teste de Qui-quadrado e o teste de diferença de proporções (Siegel, 1975). O primeiro permite saber se há ou não diferença significativa entre os tratamentos, mas sem determinar em qual o tratamento é apresentada esta diferença. No teste de diferença de proporções, comparam-se os tratamentos dois a dois para identificar e quantificar as diferenças apresentadas, e verificar em qual tratamento elas estão presentes.

As amostras receberam as seguintes codificações: lâminas D1 até D20 são as amostras do tempo t_0 ; lâminas D21 até D40 são as amostras do tempo t_1 ; lâminas D41 até D60 são as amostras do tempo t_2 e as lâminas D61 até D80 são as amostras do tempo t_3 .

4.5.1.2 Estudo histológico do impacto da aplicação da Palatase na pele da orelha de porco.

O presente estudo foi realizado para avaliar o impacto da aplicação da Palatase na estrutura da pele da orlha de porco, de modo a identificar alguma possível degradação ou alterações desta estrutura. Este estudo foi realizado com

fragmentos de peles provenientes da orelha de porco doméstico utilizando a melhor condição experimental obtida no item 4.5.1.1 (4 h após a morte do animal mais 3 h de incubação na estufa 35 °C).

Nos fragmentos de pele foram aplicadas 5 soluções aquosas: ensaio I) solução a 2% de Palatase em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0; ensaio II) solução aquosa a 5% de Palatase em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0; ensaio III) solução tampão 0,05 mol/L pH 7,0 (padrão negativo); ensaio IV) solução aquosa a 2% de hidroquinona em solução tampão 0,05mol/L. Estas solução foram aplicadas diretamente sobre o estrato córneo na concentração de 2 mg/cm² de pele (estipulada como a dose média de utilização pelos usuários pelo International SPF Test Method Guideline 2003). A derme dos fragmentos de pele foi mantida em contato com uma solução tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, para manter uma maior viabilidade celular e evitar o ressecamento dos fragmentos. Estes fragmentos foram levados a uma incuba a 35 °C por 3 h para mimetizar a aplicação de um produto rinsável, uma vez que a temperatura da pele é em torno de 35 °C e 3 hs representam uma situação extrema de contato para este tipo de produto (produto rinsável). Após as 3 h de incubação os fragmentos foram retirados e lavados em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0. Após a lavagem, os fragmentos foram fixados em solução aquosa de formol 10% (v/v) e em seguida coloridos com hematoxilina-eosina (Junqueira e Carneiro,1995).

Foram utilizadas 3 orelhas de porco, sendo cada uma dividida nos 4 ensaios aleatoriamente, resultando em 10 repetições para cada ensaio. Foi utilizado como ferramenta estatística o teste de Qui-quadrado e o teste de diferença de proporções (Siegel, 1975). O primeiro permite saber se existe ou não

diferenças estatisticamente significativa entre os tratamentos, mas sem determinar em qual o tratamento é apresentada esta diferença. Já no teste de diferença de proporções, comparam-se os tratamentos dois a dois para identificar e quantificar as diferenças apresentadas, e verificar em qual tratamento elas estão presentes.

As amostras receberam as seguintes codificações: amostras do ensaio I: lâminas A3, A8, A13, B1, B6, B11, B16, C4, C9, C14; amostras do ensaio II: A4, A9, A14, B2, B7, B12, B17, C5, C10, C15; amostras do ensaio III: A5, A10, A15, B3, B8, B13, C1, C6, C11, C16 e amostras do ensaio IV: A1, A6, A11, A16, B4, B9, B14, C2, C7, C12.

4.5.2 Teste de citotoxicidade para fibroblastos de pele humana in vitro

O teste de citotoxicidade foi realizado para determinar a quantidade máxima de Palatase e do gel contendo 2% da mesma que não promova morte das células de fibroblastos em cultivo celular. Este teste foi realizado pelo laboratório LASA – Laboratório de Química Ltda em Campinas/ SP.

4.5.2.1 Preparação das culturas de células

As culturas de fibroblastos de pele humanas mantidas em garrafas T-75 foram tripsinizadas. A suspensão celular obtida foi usada para semear culturas de células em placas de 96 poços. Cada poço recebeu cerca de 5×10^3 células. As

culturas de células foram mantidas em meio DMEM/10%SFB incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C. Depois de inoculadas, as culturas permaneceram incubadas por 18 horas para que as células aderissem a superfície da placa.

4.5.2.2 Preparação de amostra e indução das culturas de células

A amostra Gel base contendo 2% de Palatase se mostrou solúvel em meio aquoso. Foi feita uma solução diluindo 0,48 mL da amostra para um volume final de 4 mL usando meio de cultura DMEM/10%SFB. A solução estoque obtida (12% v/v) foi usada para montar 10 diluições seriadas de 1,78 vezes a cada diluição em meio DMEM/10%SFB. As 11 soluções obtidas após a diluição seriada foram adicionados ao meio de cultura o que resultou em mais uma diluição de 4 vezes para as concentrações de amostras testadas.

A amostra enzima Palatase se mostrou solúvel em meio aquoso. Foi feita uma solução estoque diluindo 2 mL da amostra para um volume final de 4 mL usando meio de cultura DMEM/10%SFB. A solução estoque obtida (50% v/v) foi usada para montar 10 diluições seriadas de 2 vezes a cada diluição em meio DMEM/10%SFB. As 11 soluções obtidas após a diluição seriada foram adicionadas ao meio. Esse passo não representou diluição adicional para as concentrações de amostras testadas.

As diversas concentrações das amostras foram testadas em triplicatas. Foram feitos brancos para todas as diluições de amostra testadas. Foi realizado

também um controle onde não houve indução das culturas com amostras, sendo adicionado apenas meio.

A placa foi então incubada por 72 h em estufa de CO₂. Passado este tempo, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com solução de Hanks. Em seguida, foi adicionado meio DMEM/10%SFB novas às culturas. A placa foi incubada novamente por mais 24 h em estufa de CO₂ antes da determinação da quantidade de células pelo ensaio de MTT.

4.5.2.3 Detecção de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

O ensaio de MTT foi realizado após indução das culturas com diferentes concentrações de amostra. Este foi feito no intuito de determinar o número de células presentes em cada cultura. Primeiro, o meio de cultura foi retirado e adicionado meio DMEM/10%SFB novo contendo 0,5mg/mL de MTT. A placa foi então incubada por 4 h em estufa CO₂ protegida da luz. Passando este período, o meio foi retirado e então adicionado DMSO para solubilização dos cristais de formazana. A absorbância a 570 nm de cada poço da placa foi determinada usando um de espectrofotômetro do tipo ELISA.

Nesta técnica o sal de tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium, MTT), que é um composto hidrossolúvel, é facilmente incorporado por células viáveis. Dentro das células, este composto é então reduzido nas mitocôndrias pelas desidrogenase gerando a formazana. Este composto, por sua vez, não é solúvel em água e fica armazenado no citoplasma

celular. A formazana pode ser solubilizada por solvente como DMSO. Ao contrário do MTT, que apresenta coloração amarelada pálido, a formazana tem coloração azul-escuro e, quando solubilizada em DMSO, apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 570 nm.

O ensaio colorimétrico com MTT mede a quantidade de formazana formada pela determinação da absorbância a 570 nm usando um espectrofotômetro. O valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis, uma vez que quando maior o número de células mais formazana é produzida pelo metabolismo celular. Assim ensaios de MTT podem determinar efeitos de substâncias que resultem em alteração no número de células em uma cultura, permitindo medir morte ou proliferação celular.

4.5.2.4 Cálculo CL_{50}

A determinação da concentração letal para 50% dos fibroplastos presentes em cultura (CL_{50}) foi realizada usando o software Sigma plot para Windows, versão 9.01 (Systat Inc.). Os pontos experimentais obtidos foram plotados em um gráfico semi-logaritmo da concentração versus absorbâncias a 570 nm. A CL_{50} e seu desvio padrão foram calculados através do ajuste de uma curva logística de quatro parâmetros, seguindo a seguinte equação:

$$R = R_{\min} + \frac{(R_{\max} - R_{\min})}{[1 + (C/CL_{50})^n]}$$

Onde: R é a resposta em cada concentração de amostra; R_{\min} é a resposta mínima; R_{\max} é a resposta máxima; C é a concentração de produto no meio; CL_{50} é a concentração de produto que leva a metade da resposta; e n é a inclinação de Hill.

A determinação da concentração máxima onde não se observa morte celular (Max) foi feita através da comparação de determinação de MTT para as diversas concentrações testadas com o valor do R_{\max} obtido. Para isso foi usada a análise comparativa de ANOVA (análise de variância) seguida do teste de média de Dunnett (Box *et al.*, 1978; Cochran e Cox, 1958). Foi usada a hipótese bilateral para a variável resposta absorbância. O nível de confiança utilizado nas análises foi 99%. Caso constatada a diferença significativa, a concentração foi denominada de citotóxica.

Para os cálculos estatísticos foi usado o software XLSTAT para Windows versão 7.5.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FORMULAÇÃO COSMÉTICA

A base cosmética para a aplicação da lipase deve ser o mais simples possível, para que se tenha a observação apenas das características da enzima sem que haja interação de outras matérias-primas em sua atividade. Além disso, a formulação não deve conter componentes oleosos ou que possam sofrer hidrólise pela enzima, não deve ser irritante a pele do rosto e deve ter um pH adequado para esta região (pH 5,5-6,0). Sendo assim, o gel aquoso (ver composição no item 4.3.1) foi selecionado como o mais adequado para este tipo de aplicação.

As matérias-primas utilizadas para desenvolver a base cosmética estão todas em concentrações permitidas para o uso cosmético e regulamentadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e descritas no CTFA (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association) (<http://www.ctfa.org>; <http://www.anvisa.gov.br>).

5.1.1 Formulação da base cosmética

A base cosmética foi formulada por um agente de reologia ou agente geleificante derivado da celulose, como a hidroxietilcelulose, que possui uma alta eficiência como agente de viscosidade, pois é compatível com grande variedade

de matérias-primas cosméticas, incluindo tensoativos aniônicos e catiônicos, eletrólitos e materiais não-iônicos. Em sistemas detergentes, promove uma boa espalhabilidade na superfície. A hidroxietilcelulose é estável em larga faixa de pH e pode proporcionar uma faixa variável de viscosidade para o produto, mudando-se apenas a sua concentração (Knowlton, 1996).

Foi utilizado um sistema conservante com ação antimicrobiana (Metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona ou 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona/2-metil-4-isotiazolin-3-ona), e um sistema sequestrante que se complexa com muitos íons metálicos em solução (edetato dissódico ou dosódio N,N'-1,2-etanodibis [N-(carboximetil) Glicina]), removendo a disponibilidade de formação e precipitação de sais insolúveis na formulação (Knowlton, 1996).

O decil glucosídeo (Decil- β -D-glucopiranosídeo) está presente na formulação como agente tensoativo leve e não irritante para ajudar na limpeza e fazer espuma na hora da aplicação (Knowlton, 1996).

Substâncias como o propileno glicol (1,2-propanodiol), butileno glicol (1,3-butanodiol) e hexileno glicol (2-metil-2,4-pentanodiol) são classificados como umectantes em cosmetologia por que possuem uma capacidade de reter água e auxiliam na hidratação da pele. O propileno glicol é um líquido viscoso incolor e completamente solúvel em água, seu efeito umectante e condicionante é obtido em concentrações a partir de 10% na formulação. No entanto, seu efeito solvente necessita de concentração baixa, usualmente 1 a 5%, dependendo do soluto utilizado. O butileno glicol possui propriedades cosméticas similares ao propileno glicol (umectante e solvente), mas é mais higroscópico e viscoso do que

este. Já o hexilenoglicol é um bom solvente, mas possui propriedades umectantes moderadas se comparado com o propilenoglicol e o butilenoglicol (Hunting, 1987).

Fragrâncias cosméticas são associações de muitos, possivelmente centenas, de diferentes materiais, muitos possuem funções químicas reativas, como grupos aldeídos, cetonas e duplas ligações, além de óleos essenciais. São constituídos por compostos perfumados para mascarar o odor original da base cosmética e tornar o produto final mais agradável ao usuário (Hunting, 1987).

BHT (hidróxitolueno butilado ou 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) é um antioxidante para a formulação cosmética, é utilizado como preservativo impedindo com que o produto se oxide e sofra alterações físicas e químicas. É um pó cristalino branco insolúvel em água, mas solúvel em álcool, óleo mineral e óleo vegetal (Hunting, 1987).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA PALATASE EM MEIO AQUOSO

As atividades específicas e volumétricas da Palatase contra diferentes substratos estão mostradas na Tabela 3. Observou-se que, com relação aos valores reportados pela Novozymes, os resultados obtidos no presente trabalho não são possíveis de comparação uma vez que estão descritos em unidades padrões diferentes e as emulsões formadas pelo substrato são diferentes (com goma arábica para a Novozymes e Triton X-100 no presente trabalho). Pode-se concluir, a partir da alta atividade encontrada para a trioleína, que se trata de uma lipase dita “verdadeira” (Cajal *et al.*, 2000 a, b).

Tabela 3. Atividade da Palatase contra diferentes substratos.

Substrato	Atividade volumétrica U/mL	Atividade ^{a)} específica (u/mg)
pNPP	405,2	31,4
Trioleína (C-18)	1753,0 ± 60,4	135,9 ^b
Tributirina (C-4)	1915,8 ± 153,1	148,5 ^b
Novozymes (tributirina C-4)	Não consta	20000 LU-MM/g ^c

a) Proteína dosada por Bradford (1976): 12,9 mg/mL

b) uma unidade de atividade é equivalente a 1 µmol de ácido graxo formado por minuto a 37 °C pH 8,0, por mg de proteína. Método titulométrico manual.

c) 1 LU equivale a 1 µmol de ácido butírico formado por minuto a 30 °C pH 7,0, por g de proteína. Método pH-Stat.

5.2.1 Efeito do pH na atividade enzimática

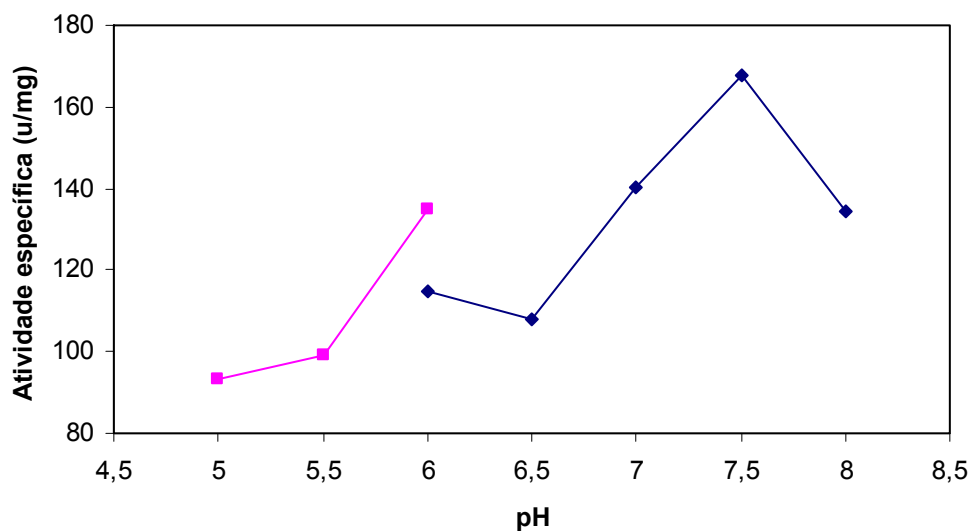


Figura 4. Efeito do pH sobre a atividade da Palatase® L 20.000 pelo método titulométrico manual. Tampões: (-■-) tampão fosfato 0,05 mol/L; (-■-) tampão citrato 0,05 mol/L. Condições: substrato – trioleína 1 mM em emulsão com Triton X-100, 37°C, 30 min de reação. Proteína dosada por Bradford (1976): 12,9 mg/mL. Desvio padrão de no máximo 10%.

A Palatase apresentou uma melhor atividade em pH 7,5 (Figura 4), valor este semelhante ao fornecido pela Novozymes (7,0). Além disto, apresenta atividade específica relativamente alta (90 a 170 U/mg) na faixa de pH de 5,0 a 8,0, sendo desta maneira uma enzima adequada para se trabalhar em formulações cosméticas, onde se deseja uma faixa de pH de 5,5 a 6,5. Esta ampla faixa de pH de atuação não é comum para a maioria da lipases, cujos valores de pH ótimo para a atividade normalmente situam-se em torno de 8,0. Em valores ácidos de pH há uma grande queda nas atividades, exceto para algumas enzimas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, que possuem altas atividades entre pH 2,5 a 5,0 (Mahadik et al., 2002).

5.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

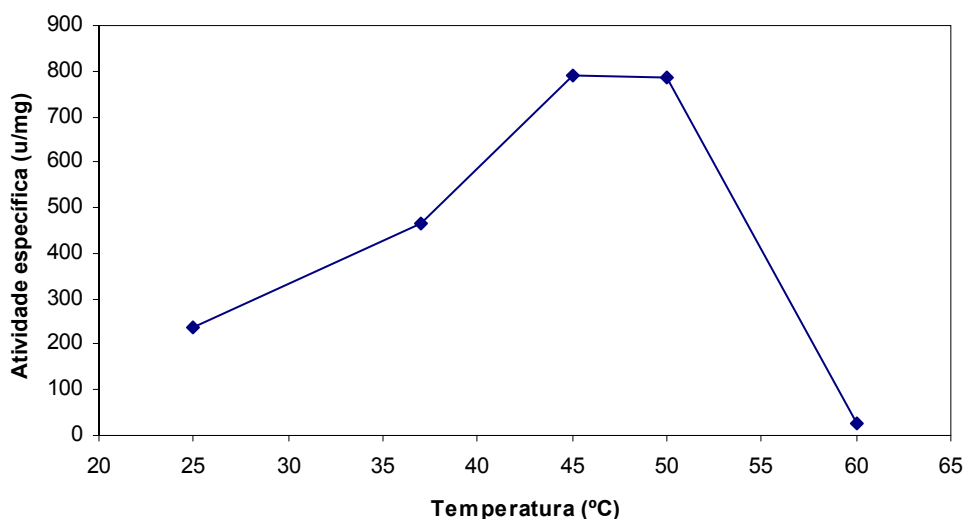


Figura 5. Efeito da temperatura sobre a atividade da Palatase® L 20.000 pelo método titulométrico pH-Stat. Condições: substrato – 3 mM de trioleína em emulsão com Triton X-100 em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0, 5min de reação. Proteína doseada por Bradford (1976): 12,9 mg/mL. Desvio padrão de no máximo 10%.

A Palatase apresentou uma maior atividade específica na faixa de temperatura de 45°C a 50°C (790 U/mg). Ressalta-se que, neste caso, as atividades foram medidas no pH Stat, com pH controlado em 7,0 e atividade medida nos cinco primeiros minutos (portanto, inicial), o que explica os maiores valores aqui obtidos em relação aos da Figura 4. Segundo as informações do fornecedor, a enzima apresenta uma melhor atividade na temperatura de 40°C. Esta diferença é provavelmente devido às diferenças na metodologia de preparo da emulsão, uma vez que em ambos os casos foram usados o pH Stat: no caso da Novozymes, a emulsão é preparada com goma arábica, enquanto no presente trabalho foi utilizado o detergente Triton X-100 como agente emulsificante. Mesmo havendo um decréscimo na atividade específica em temperaturas abaixo de 45 °C e acima de 50 °C, as atividades obtidas são relativamente altas (no mínimo 230 U/mg nos extremos), o que mostra que a Palatase é adequada para se trabalhar com temperaturas variadas. A faixa de temperatura ótima para a atividade da maioria das lipases de fungos situa-se em valores menores, e em muitos casos, não há atividade significativa em temperaturas acima de 40 °C (Mahadik *et al.*, 2002).

5.2.3 Estudo da estabilidade da Palatase frente à temperatura

Estes experimentos foram realizados por incubação da solução enzimática original em geladeira ou em estufas com temperaturas controladas. Este ensaio

chama-se, na indústria de cosméticos e de alimentos, de avaliação acelerada da estabilidade, e permite prever o comportamento da enzima ao longo do tempo de armazenamento. Na Tabela 4 estão os resultados para cada temperatura em diferentes tempos.

Tabela 4. Atividade^a da Palatase frente ao armazenamento em diferentes temperaturas.

TEMPOS	GELADEIRA(-4 °C)	AMBIENTE (25 °C)	37 °C	45 °C	50 °C
0		528,1			
7 DIAS	392,7	436,6	410,8	435,4	525,8
15 DIAS	487,1	488,4	472,8	506,4	472,5

a) Atividade específica (U/mg) dosada em pH Stat usando trioleína 3 mM como substrato em emulsão com Triton X-100 em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 e 37 °C, 5min de reação. Proteína dosada por Bradford (1976): 12,9 mg/mL.

Pelos resultados apresentados, pode-se observar uma queda de atividade entre 17 e 25% após 7 dias de armazenamento para todas as temperaturas, exceto para 50 °C, onde ocorreu aproximadamente a redução de 1% da atividade. Após incubação de 15 dias, as atividades voltam em geral a subir (entre 4 a 7% em relação ao tempo inicial) para temperaturas até 45 °C, obtendo-se um efeito contrário para 50 °C, quando houve um decréscimo de aproximadamente 10%. De fato, torna-se difícil a explicação destes estes efeitos, especialmente da queda seguida do aumento da atividade, uma vez que nada está descrito na literatura sobre ensaios e resultados semelhantes, e que permita o melhor esclarecimento do comportamento desta enzima frente à temperatura de armazenamento. Pode-se sugerir que este comportamento seria devido uma formação de agregados

durante os tempos de exposição às temperaturas, que poderiam causar uma barreira de difusão do substrato, e que são desfeitos com o tempo.

Visto que a termoestabilidade é uma condição essencial para a utilização de enzimas em produtos cosméticos, os resultados apresentados fazem da Palatase uma enzima promissora para o mercado cosmético.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PALATASE FRENTE À FORMULAÇÃO COSMÉTICA

5.3.1 Atividade da Palatase no gel base

Os valores das atividades lipolíticas em meio reacional gel a 1% de hidroxietilcelulose pH 6,6 estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade da Palatase em gel contendo 1% de hidroxietilcelulose, pH 6,6. Condições reacionais: substrato 1 mM de trioleína e 1 mM de tributirina, 37 °C, 0,129 mg de proteína, método titulométrico manual, reação em 30 min.

SUBSTRATOS	ATIVIDADES (U/mg)
Tributirina	179,6
Trioleína	139,3

Comparando-se os valores da atividade frente à tributirina obtidos no gel com aqueles obtidos em tampão (Tabela 3), é observado um aumento da atividade de 17% no gel. Isto pode ser devido aos efeitos difusionais no gel, ou seja, a difusão do substrato no gel pode ser maior do que no tampão fosfato,

fazendo com que a emulsão formada facilite o contato entre o substrato e a enzima, resultando em um aumento da atividade enzimática. Em contrapartida, este mesmo efeito, não foi observado com a trioleína, provavelmente porque esta possui uma cadeia carbônica maior que a tributirina, dificultando a permeação deste substrato no gel, não havendo interferência da emulsão formada pelo gel.

5.3.2 Efeito dos componentes da formulação cosmética sobre a atividade da Palatase

Estes ensaios foram realizados utilizando-se pelo método titulométrico e trioleína como substrato. Os resultados obtidos para as atividades específicas estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito dos componentes da formulação cosmética na atividade da Palatase.

ENSAIO	MEIO REACIONAL	ATIVIDADE (U/mg)
A	Gel de HEC	139,3
B	Gel de HEC e 5% de Propilenoglicol	126,1
C	Gel de HEC e 0,05% de EDTA dissódico	126,0
D	Gel de HEC e 0,05% de Metilcloroisotiazolinona/Metilisotiazolinona	125,9
E	Gel de HEC e 6% de Decilpoliglucose	129,3
F	Gel de HEC e 2 % de Hexilenoglicol	170,0
G	Formulação cosmética completa sem a Fragrância e BHT	178,3
H	Gel de HEC e 3% Butilenoglicol	118,5
I	Gel de HEC e 0,2%Fragrância + 0,05% BHT	119,1
J	Formulação cosmética completa	175,3

HEC – Hidroxietilcelulose

Condições: substrato trioleína 1 mM em emulsão com Triton X-100 no método titulométrico manual, 37 °C e 0,129 mg de proteína no meio reacional.

Observando os resultados obtidos, conclui-se que a adição separadamente de 5% de propilenoglicol, 0,05% de EDTA dissódico, 0,05% de Metilcloroisotiazolinona/Metilisotiazolinona e 6% de Decilpoliglucose (ensaios B, C, D e E) não influencia na atividade catalítica da Palatase, quando utilizado como meio reacional o gel com 2% de HEC. Em contrapartida, a adição de 2% de hexilenoglicol (ensaio F) no meio reacional aumenta a atividade específica da enzima de 139,3 para 170,0 U/mg (aproximadamente 20%). Isto provavelmente ocorre devido ao grande poder solvente do hexilenoglicol, fazendo com que na emulsão formada a enzima fique mais solúvel e conseqüentemente melhor distribuída na fase aquosa, facilitando, deste modo, o contato entre o substrato e a enzima na interface da emulsão e resultando em um aumento da atividade enzimática.

Quando utilizada a formulação completa sem a fragrância e BHT no meio reacional (ensaio G), e a formulação completa (ensaio J), os resultados também foram de um aumento da atividade da enzima (aproximadamente 28 e 25% respectivamente). Provavelmente há um efeito sinérgico entre as matérias-primas da formulação, fazendo com que a formulação completa com o meio reacional facilite a interação entre o substrato e a enzima. Entretanto, observou-se que a adição tanto de 0,2% da fragrância e 0,05% do BHT (ensaio I), quanto de 3% de butilenoglicol (ensaio H) no meio reacional causou redução da atividade da Palatase (aproximadamente 15%). Esta queda da atividade pode ser devido a interações entre a enzima e estas matérias-primas de modo a diminuir o contato da enzima com o substrato.

5.3.3 Estudo da estabilidade da formulação contendo a Palatase frente à temperatura

O experimento foi realizado em triplicata das amostras do gel base contendo 2% da enzima em diferentes temperaturas e tempos de exposição a estas temperaturas. Na Tabela 7 estão os resultados para cada temperatura no diferentes tempos com seus devidos desvios padrão.

Tabela 7. Atividade^a do gel base contendo 2% de Palatase frente ao armazenamento em diferentes temperaturas.

TEMPOS	GELADEIRA (-4 °C)	AMBIENTE (25 °C)	37 °C	45 °C	50 °C
0		190,0			
3 DIAS	X ^B	X ^B	X ^B	47,3	7,3
7 DIAS	192,5	191,1	177,0	26,4	9,7
15 DIAS	150,6	142,6	136,9	X ^B	X ^B

a) Atividade específica (U/mg) dosada em pH Stat usando trioleína 3 mM como substrato em emulsão com Triton X-100 em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 e 37°C, 5min de reação. Concentração de proteína: 0,129mg no meio reacional. b) X = não realizadas.

O gel contendo 2% da Palatase não apresentou estabilidade em temperatura de 45 °C e 50 °C, uma vez que há uma grande queda (70% e 96% respectivamente) das suas atividades nestas temperaturas em 3 dias de estudo quando comparados ao tempo inicial, e uma queda de 86% e 94% para 7 dias. Em contrapartida, a sua atividade permaneceu mais estável nas temperaturas de -4 °C; 25 °C e 37 °C, tendo-se uma pequena variação (uma queda máxima de 28% a 37 °C) em 15 dias de estudo.

Levando em consideração o propósito deste trabalho, a aplicação de enzimas em cosméticos, esta formulação contendo a enzima não é considerada estável frente à temperatura quando comparada com formulações contendo ativos normalmente utilizados na indústria cosmética. Cabe ressaltar que a maioria dos ativos, são compostos orgânicos muito mais estáveis do que enzimas, e que a avaliação destes resultados, bem como os testes de estabilidade, deverão ser modificados para contemplar a estabilidade enzimática nos produtos. Finalmente, pode-se concluir que os tempos de armazenagem para produtos que contenham ativos biológicos lábeis como enzimas devem ser diminuídos e/ou armazenados em condições especiais para permitir a sua efetiva aplicação em cosmetologia.

5.4 TESTES DE SEGURANÇA PARA A APLICAÇÃO DA PALATASE NA PELE

5.4.1 Estudo histológico do impacto da aplicação da Palatase na pele

5.4.1.1 Estudo da cinética de degradação histológica da pele

Foram realizadas as análises microscópicas das lâminas de amostras obtidas em diferentes tempos: (1) tempo inicial, sem incubação (T_0); (2) 4 h após a morte do animal, com fragmentos mantidos em temperatura ambiente (T_1); (3) 4 h após a morte do animal à temperatura ambiente, mais 3 h de incubação em estufa a 35 °C (T_2). Em cada lâmina foram avaliados os seguintes parâmetros

relacionados à integridade histológica: estrato córneo; características da camada granulosa - espaço intercelular, núcleo e citoplasma, presença de fendas intra-dérmicas; presença de separação da junção derme-epiderme; camada basal; células dendríticas do sistema imunológico na camada granulosa; células melânicas intra-epidérmicas; folículo piloso; glândulas sebáceas; glândulas sudoríparas; vasos; filetes nervosos; colágeno dérmico; presença de infiltrado inflamatório; eosinófilos; bactérias de putrefação.

Para um melhor entendimento destas análises, as Figuras 6 a 15 apresentam a microscopia dos principais parâmetros utilizados na classificação “normais e alterados” encontrados no presente estudo.

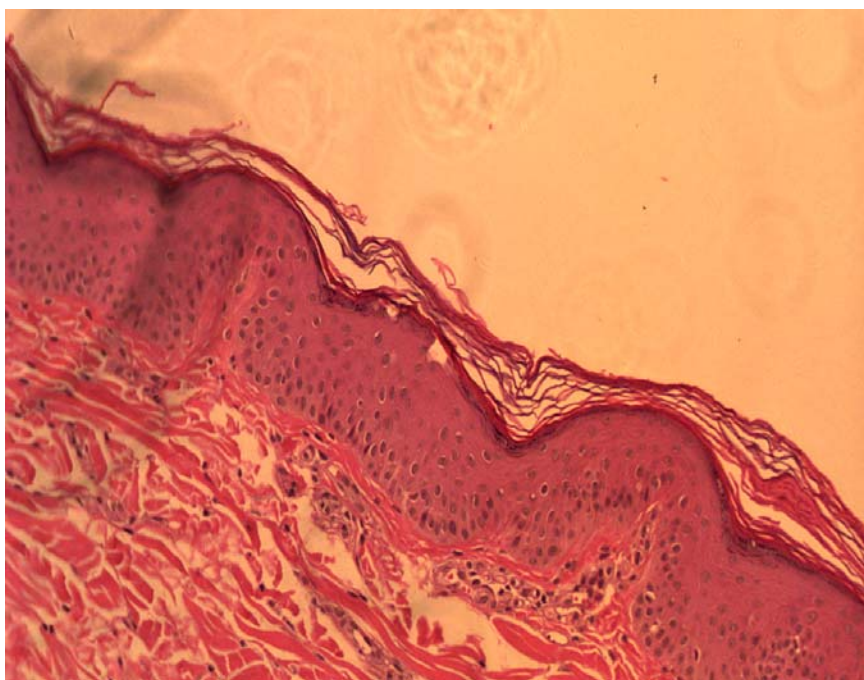


Figura 6. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Estrato córneo classificado como normal. Aumento de 200 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

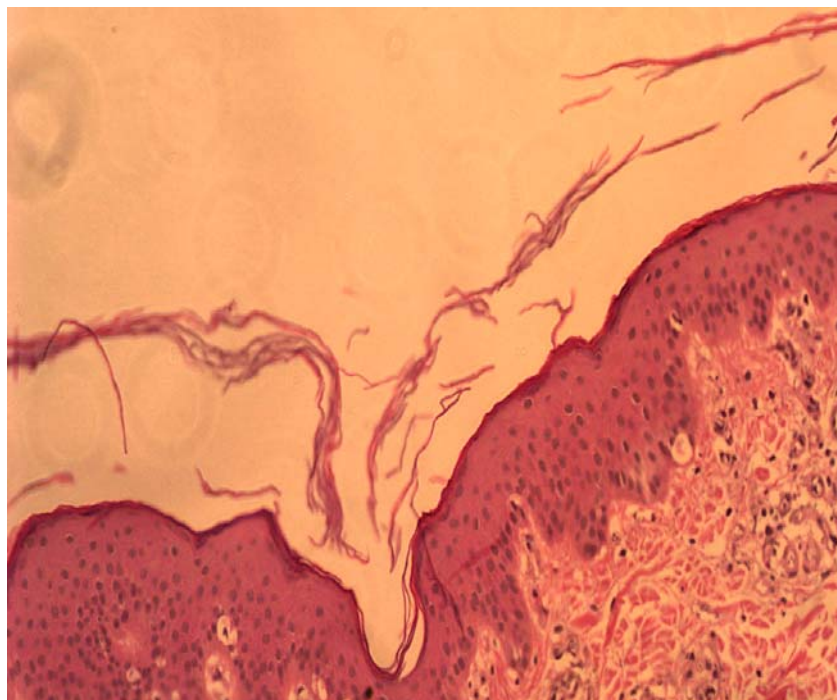


Figura 7. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Estrato córneo classificado como normal. Aumento de 200 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

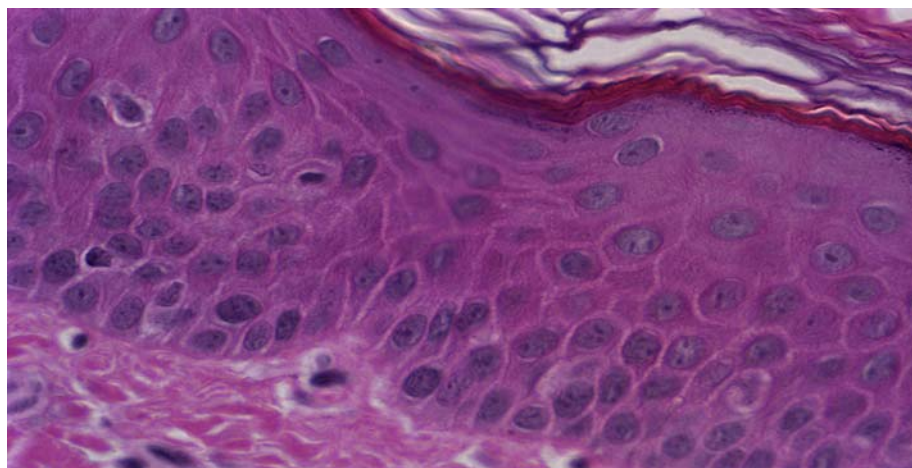


Figura 8. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Citoplasma da camada espinhosa classificado como **normal**. Aumento de 1000 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

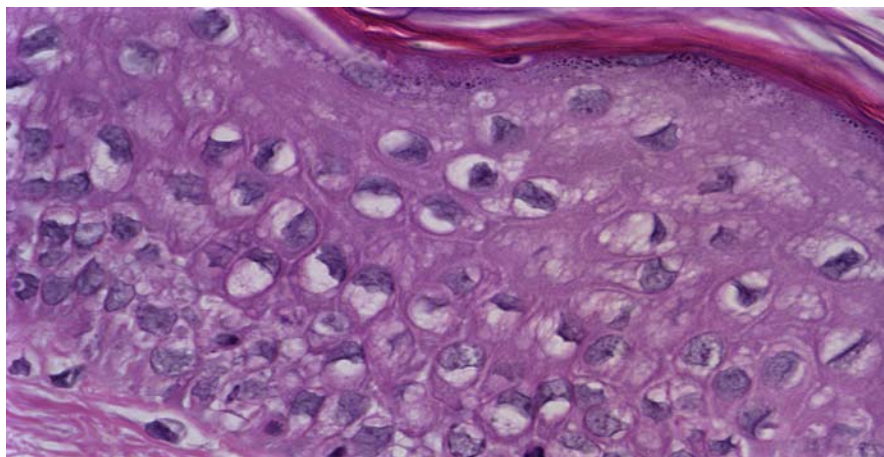


Figura 9. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Citoplasma da camada espinhosa classificado como **alterado**. Aumento de 1000 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

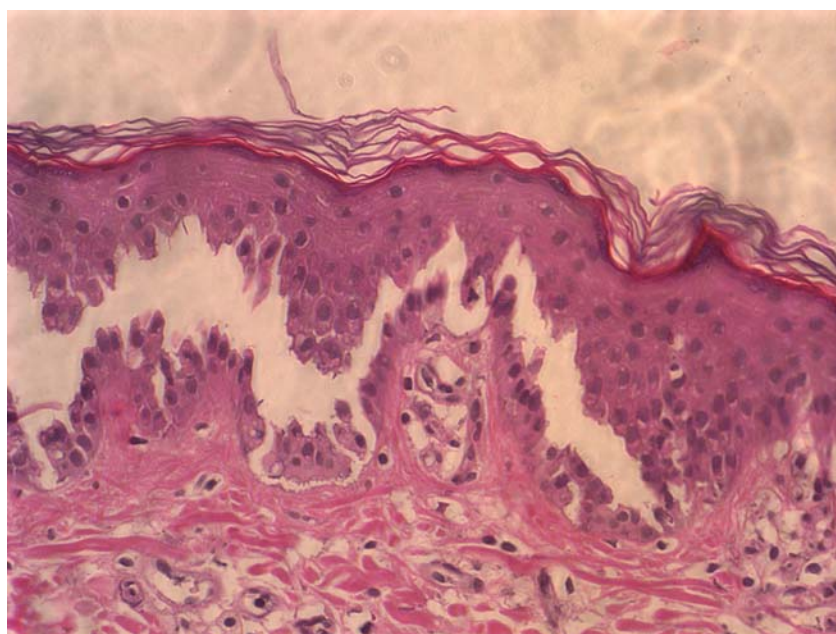


Figura 10. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Fenda intra-epidermica classificado como **alterada**. Aumento de 400 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

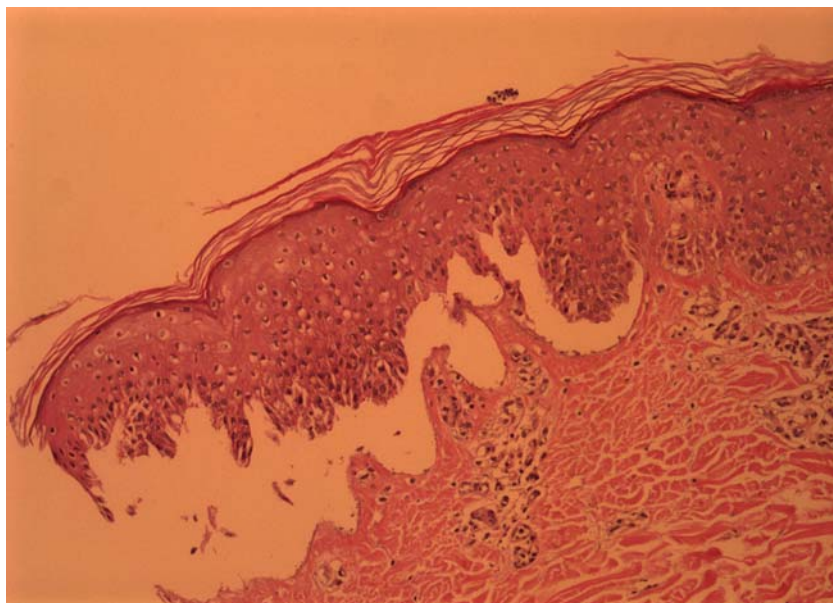


Figura 11. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Junção derme-epiderme classificada como alterada. Aumento de 200 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

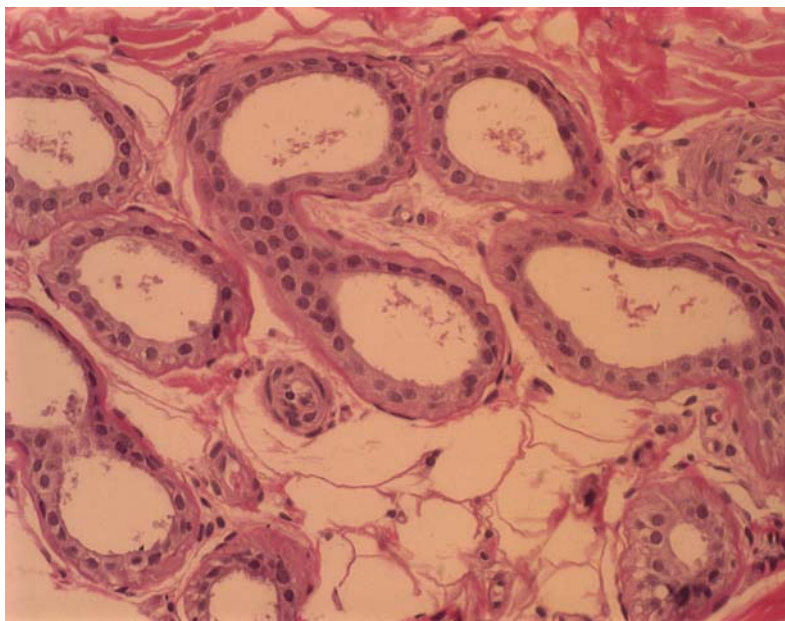


Figura 12. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Glândula sudorípara classificada como normal. Aumento de 400 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

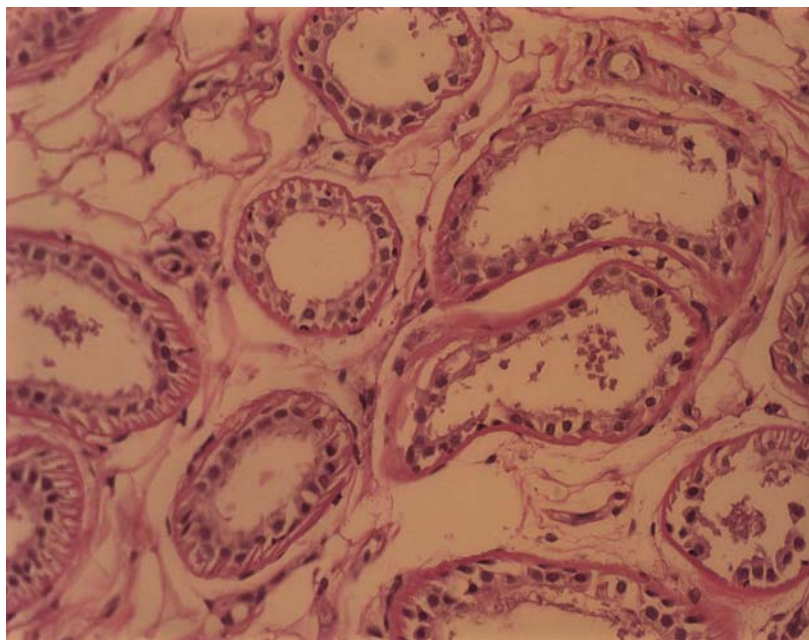


Figura 13. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Glândula sudorípara classificada como alterada. Aumento de 400 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

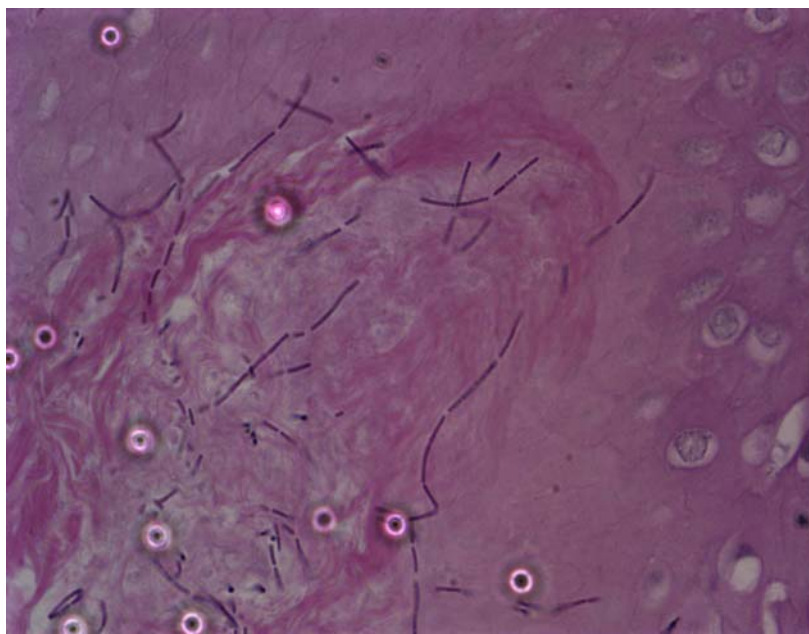


Figura 14. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Presença de bactérias de putrefação, material classificado como alterado. Aumento de 1000 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

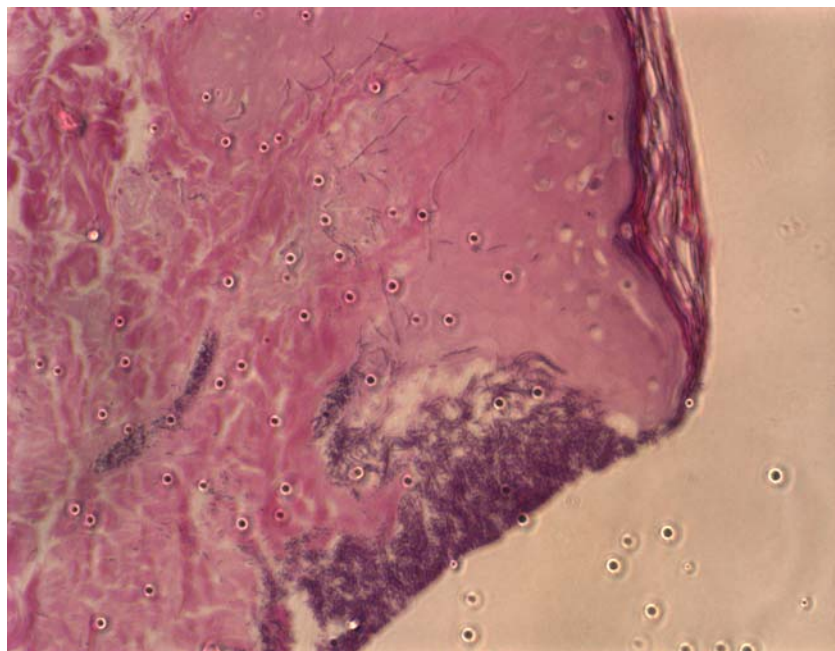


Figura 15. Corte histológico da pele de orelha de porco doméstico. Presença de bactérias de putrefação, material classificado como alterado. Aumento de 400 vezes. Coloração hematoxilina-eosina.

Como se pode observar nas fotos, os padrões foram considerados normais quando apresentaram estratos córneos com pouco desprendimento; núcleo e citoplasmas bem definidos sem vacúolos ou lise; glândulas sudoríparas integras sem a presença de vacúolos ou desprendimento das células; a ausência de fendas intra-epidérmicas; a junção derme-epiderme integra sem separação das duas camadas e ausência de bactérias de putrefação. Encontra partida, observou-se para os padrões considerados negativos o estrato córneo com grande desprendimento, o citoplasma da camada espinhosa com halos perinucleares ou vacúolos; glândulas sudoríparas com lise celular e

desprendimento das células; presença de fenda intra-epidérmica; separação da junção derme-epiderme e a presença de bactérias de putrefação.

As Tabelas 8 a 15 apresentam os resultados obtidos em diferentes tempos de incubação para os parâmetros acima citados. A descrição dos padrões está relacionada nas tabelas de acordo com a classificação “normais ou alterados”. A constatação de estado “normal” para todas as características foi baseada na observação das lâminas referente ao tempo t_0 , excluindo artefatos da técnica tais como acúmulo de corantes, rasgos nos cortes etc... Toda e qualquer variação do estado “normal” foi considerado como “alterado”.

Tabela 8. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 40 minutos após a morte (t_0), 25 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Estrato Córneo	Ortoqueratose lamelar e delgado com pouco desprendimento
Camada granulosa	Unicelular
Espaçamento intercelular da camada espinhosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Integro sem halos ou vacúolos
Fenda intra-epiderme	Ausente
Junção derme epiderme	Ausente
Camada Basal	Imperceptível
Células dendríticas intra-epidérmicas	Presentes sem alterações
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptíveis
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Ausente
Vacúolos citoplasmáticos do folículo piloso	Ausente
Glândula Sebácea	Presente sem alteração
Vasos com desprendimento do endotélio	Ausente
Filete nervoso	Presente sem alteração
Espaçamento das fibras de colágeno dérmico	Ausente
Núcleos presentes no colágeno dérmico	Presentes
Eosinófilos	Presentes sem alterações

Tabela 9. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 40 minutos após a morte(t_0), 25 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 20 AMOSTRAS
Vacúolos citoplasmáticos da camada espinhosa	Presente e de tamanhos pequenos	2
Halo citoplasmático da camada espinhosa	Presente e de tamanhos pequenos	17
Fenda no folículo piloso	Presente	1
Halo citoplasmático no folículo piloso	Presente	1
Glândula sudorípara	Lise acentuada	1
Vacurização da túnica média dos vasos	Presente	1
Lise das fibras de colágeno dérmico	Presente e discreto	2
Infiltrado inflamatório	Presente	20
Plexo capilar dérmico	Lise discreta	1
Bactérias de putrefação	Presentes	1

Tabela 10. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 4 horas após a morte (t_1), 25 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Espaçamento intercelular da camada espinhosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Integro sem halo ou vacúolo
Vacúolos citoplasmáticos da camada espinhosa	Ausente
Fenda intra-epiderme	Ausente
Junção derme epiderme	Ausente
Camada Basal	Imperceptível
Células dendríticas intra-epidérmicas	Presentes sem alterações
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptíveis
Fenda no folículo piloso	Ausente
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Ausente
Vacúolos citoplasmáticos do folículo piloso	Ausente
Glândula Sebácea	Presente sem alteração
Vasos com desprendimento do endotélio	Ausente
Filete nervoso	Presente sem alteração
Plexo capilar dérmico	Integro
Eosinófilos	Presente sem alteração
Bactérias de putrefação	Ausente

Tabela 11. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 4 horas após a morte (t_1), 25 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 20 AMOSTRAS
Estrato córneo	Com muito despreendimento	1
Camada granulosa	Com mais de uma camada	3
Halo citoplasmático da camada espinhosa	Presente e de tamanhos pequenos	13
Halo citoplasmático do folículo piloso	Presente	1
Glândula sudorípara	Lise discreta	1
Vacurização da túnica média dos vasos	Presente	1
Espaçamento das fibras de colágeno dérmico	Acentuado	1
Lise das fibras de colágeno dérmico	Presente e discreto	2
Núcleos presentes no colágeno dérmico	Aparecimento acentuado	1
Infiltrado inflamatório	Presente	20

Tabela 12. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 4 h-após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h de incubação a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Espaçamento intercelular da camada granulosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Integro sem halo ou vacúolo
Fenda intra-epiderme	Ausente
Junção derme epiderme	Sem alteração
Camada Basal	Imperceptível
Células dendríticas intra-epidérmicas	Presente sem alteração
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptível
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Normal: ausente
Vasos com despreendimento do endotélio	Normal: ausente
Filete nervoso	Normal: presente sem alteração
Espaçamento das fibras de colágeno dérmico	Normal: ausente
Bactérias de putrefação	Normal: ausente

Tabela 13. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C e 3 h de incubação a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 20 AMOSTRAS
Etrato córneo alterado	Com muito desprendimento	3
Camada granulosa	Com mais de uma camada	2
Vacúolos citoplasmáticos da camada Espinhosa	Presente e de tamanhos pequenos e grandes	3
Halo citoplasmático da camada granulosa	Presente e de tamanhos pequeno	15
Fenda no folículo piloso	Presente	1
Vacúolos citoplasmáticos do folículo piloso	Presente	3
Halo citoplasmático no folículo piloso	Presente	4
Glândula Sebácea	Lise	1
Glândula sudorípara	Lise discreta	1
Vacurização da túnica média dos vasos	Presente	1
Lise das fibras de colágeno dérmico	Presente discreto a acentuado	3
Núcleos presentes no colágeno dérmico	Desaparecimento discreto	2
Infiltrado inflamatório	Presente	20
Eosinófilos	Ausente	1

Tabela 14. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 16 h de incubação a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Camada granulosa	Unicelular
Espaçamento intercelular da camada espinhosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Integro sem halos ou vacúolos
Camada Basal	Imperceptível
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptíveis
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Normal: ausente

Tabela 15. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 16 h de incubação a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 20 AMOSTRAS
	Com muito	
Estrato córneo alterado	desprendimento	10
	Presente e de tamanhos	18
Vacúolos citoplasmático da camada espinhosa	pequenos e grandes	
	Presente e de tamanhos	11
Halo citoplasmático da camada espinhosa	pequenos	
	Presente de discreta a	
Fenda intra-epidérmica	acentuada	9
	Separação da derme e	
Junção derme epiderme	epiderme	10
Células dendríticas intra-epidérmicas	Ausente	9
Fenda no folículo piloso	Presente	9
Vacúolos citoplasmáticos no folículo piloso	Presente	16
Halo citoplasmático no folículo piloso	Presente	11
Glândula sebácea	Lise	15
Glândula sudorípara	Lise discreta a acentuada	18
Vacurização da túnica média de vasos	Presente	15
Vasos com desprendimento do endotélio	Presente	3
Filete nervoso	Ausente	2
Espaçamento das fibras de colágeno dérmico	Alterado: discreto	2
Lise das fibras de colágeno dérmico	Alterado: presente discreto a acentuado	11
	Alterado: desaparecimento	
Núcleos no colágeno dérmico	discreto a acentuado	15
Infiltrado inflamatório	Alterado: presente	20
Plexo capilar dérmico	Alterado: lise	15
Eosinófilos	Alterados: ausente	3
Bactérias de putrefação	Alterado: presente	13

Os resultados das Tabelas 8 a 15 foram analisados estatisticamente, exceto para os parâmetros que se mantiveram constantes em todas as amostras (espaçamento intercelular da camada espinhosa; núcleo da camada espinhosa; camada basal; células melânicas; espaçamento intercelular do folículo piloso e núcleo do folículo piloso). Estes parâmetros constantes apresentaram características histológicas normais. Para os demais parâmetros histológicos foi

realizado o teste Qui-quadrado de Person (Siegel, 1975) entre os tratamentos e entre as amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando p -valor foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$). A Tabela 16 apresenta os p -valores para os diferentes tratamentos e as diferentes amostras.

Analisando-se os p -valores da Tabela 16, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% entre as quatro amostras de orelhas provenientes de diferentes animais, pois nenhum valor de p da coluna “Amostras” foi menor do que 0,05. Com relação aos valores de p para os diferentes tratamentos, foram encontrados seis variáveis histológicas que não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), e que foram então consideradas como normais (sem alteração): camada granulosa; halo perinuclear citoplasmático da camada espinhosa; despreendimento do endotélio dos vasos; filete nervoso; espaçamento entre as fibras de colágeno e os eosinófilos. As demais variáveis histológicas analisadas - Estrato córneo; citoplasma da camada espinhosa, vacúolos no citoplasma da camada espinhosa, fenda intra-epidêmica, junção derme-epiderme, células dendríticas, folículo piloso, fenda no folículo piloso, vacúolo no citoplasma do folículo piloso, halo no citoplasma do folículo piloso, glândula sebácea, glândula sudorípara, vasos sanguíneos, vacurização da túnica média dos vasos, colágeno dérmico, lise das fibras de colágeno dérmico, desaparecimento do núcleo do colágeno dérmico, infiltrado inflamatório, plexo capilar dérmico e bactérias de putrefação.- obtiveram p -valor menor que 0,05 indicando que há uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos realizados.

Tabela 16. Valores de p para a análise estatística dos parâmetros histológicos de orelhas de porco doméstico: comparação entre os tratamentos (diferentes tempos de incubação a 37°C) e as amostras utilizando o teste de Qui-quadrado de Person; $p < 0,05$ evidencia de diferença significativa entre os tratamentos.

PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	AMOSTRAS	TRATAMENTOS
	p -valor	p -valor
Estrato córneo	0,0620	0,0001
Camada granulosa	0,6266	0,1852
Citoplasma da camada espinhosa	0,6523	0
Vacúolos no citoplasma da camada espinhosa	0,6083	0
Halo perinuclear no citoplasma da camada espinhosa	0,2292	0,2159
Fenda intra-epidêmica	0,1517	0
Junção derme-epiderme	0,7367	0
Células dendríticas	0,3821	0
Folículo piloso	0,0958	0
Fenda no folículo piloso	1	0,0001
Vacúolo no citoplasma do folículo piloso	0,4798	0
Halo no citoplasma do folículo piloso	0,5704	0,0003
Glândula sebácea	0,5952	0
Glândula sudorípara	0,6193	0
Vasos sanguíneos normais	0,9817	0
Desprendimento do endotélio dos vasos	0,2332	0,0555
Vacurização da túnica média dos vasos	0,9817	0
Filete nervoso	0,8022	0,2405
Colágeno dérmico	0,7363	0
Espaçamento entre as fibras de colágeno dérmico	0,8783	0,2405
Lise das fibras de colágeno dérmico	0,175	0,0074
Desaparecimento do núcleo no colágeno dérmico	0,3029	0
Infiltrado inflamatório	0,8772	0
Plexo capilar dérmico	1	0
Eosinófilos	1	0,1852
Bactérias de putrefação	0,978	0

Com o teste de diferença de proporções, conclui-se que as variáveis histológicas que obtiveram diferença significativa (nível de 5% de significância) apresentaram esta diferença entre o tempo t_3 e os demais tempos. Os tempos t_0 , t_1 e t_2 não apresentam diferença estatisticamente significativa (5% de significância) entre eles, exceto para variável folículo piloso, que apresenta uma diferença significativa (5% de significância) entre o t_2 com relação a t_0 e t_1 , sendo que t_0 e t_1 não apresentaram diferenças entre eles. Conclui-se que, não há alterações

histológicas estatisticamente significativas após 4 h da morte do animal a 25 °C. A partir destas 4 h acrescidas de mais 3 h de incubação a 35 °C, há uma alteração significativa (5% de significância) no folículo piloso, sendo esta, uma alteração discreta e de pouco impacto na integridade geral da pele. No entanto, as peles expostas por 4 h a 25 °C e incubadas por 16 h a 35 °C apresentaram grandes alterações histológicas (entre elas a vacurização do citoplasma da camada espinhosa; separação da junção derme-epiderme; presença de fendas intra-epidérmicas; degradação das glândulas sudoríparas; a lise das células do folículo piloso e das glândulas sebáceas; desaparecimento dos núcleos dos fibroplastos da derme e a presença de bactérias de putrefação) que prejudicam a integridade da pele. Estas alterações são devidas ao processo natural de autólise das células após a morte do animal.

Com base nos resultados obtidos da cinética de degradação da pele da orelha de porco pós-morte, concluiu-se que os testes podem ser realizados até o tempo t_2 (4 h após a morte do animal em 25 °C e 3 h de incubação a 35 °C), pois não há alterações histológicas drásticas da pele. Já com relação ao tempo t_3 (4 h após a morte do animal em 25 °C e mais 16 h 35 °C) observou-se uma degradação intensa do material, tornando-o inviável para fazer qualquer teste de influência de um material ou ativo sobre esta pele. O tempo t_2 foi utilizado na continuação deste trabalho, para o estudo histológico do efeito da aplicação da Palatase sobre a pele da orelha de porco.

5.4.1.2 Estudo histológico da aplicação da Palatase

Foram realizadas as análises microscópicas das lâminas de amostras obtidas após 4 h da morte do animal à temperatura ambiente, mais 3 h de incubação em estufa 35 °C com as soluções a serem pesquisadas (2 e 5% de Palatase, 2% de Hidroquinona e tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0). Em cada lâmina foram avaliados os seguintes parâmetros relacionados à integridade histológica: estrato córneo; características da camada granulosa - espaço intercelular, núcleo e citoplasma, presença de fendas intra-dérmicas; presença de separação da junção derme-epiderme; camada basal; células dendríticas do sistema imunológico na camada granulosa; células melânicas intra-epidérmicas; folículo piloso; glândulas sebáceas; glândulas sudoríparas; vasos; filetes nervosos; colágeno dérmico; presença de infiltrado inflamatório; eosinófilos e bactérias de putrefação.

A solução a 2% de hidroquinona foi utilizada como um padrão positivo de alteração histológica, uma vez que esta é reconhecida como um ativo não GRAS pelo FDA por levar risco à saúde humana quando aplicado em cremes na concentração de acima de 2%. O FDA recomenda a utilização deste ativo acima de 1% com o acompanhamento médico e os reais riscos destas aplicações estão sendo estudados (Federal register FDA; 2006). Os estudos utilizados como base pelo FDA foram realizados "in vivo" com cobaias (ratos) e com aplicações dérmicas de no mínimo quatro semanas, sendo estas aplicações realizadas diariamente e em diferentes concentrações do ativo em questão. No presente

estudo a solução de hidroquinona a 2% não serviu como um padrão positivo de alteração histológica.

As Tabelas 17 a 24 apresentam os resultados obtidos na aplicação dos diferentes ativos na pele para os parâmetros acima citados. A descrição dos padrões está relacionada nas tabelas de acordo com a classificação “normais ou alterados”. A constatação de estado “normal” para todas as características foi baseada na observação da lâmina referente ao ensaio IV (padrão negativo – tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0), excluindo artefatos da técnica. Toda e qualquer variação do estado “normal” foi considerado como “alterado”.

Tabela 17. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com uma solução a 2% de Palatase a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 10 AMOSTRAS
Etrato córneo alterado	Com desprendimento	3
Vacúolos citoplasmáticos da camada espinhosa	Presentes e de tamanhos pequenos	1
Halo citoplasmático da camada espinhosa	Presentes e de tamanhos pequenos	4

Tabela 18. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com uma solução a 2% de Palatase a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Camada granulosa	Unicelular
Espaçamento intercelular da camada espinhosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Íntegro sem halos ou vacúolos
Fenda intra-epiderme	Ausente
Camada Basal	Imperceptível
Células dendríticas intra-epidérmicas	Presentes sem alterações
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptíveis
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Ausente
Vacúolos citoplasmáticos do folículo piloso	Ausente
Fenda no folículo piloso	Ausente
Glândula Sebácea	Presente sem alteração
Vasos	Íntegros sem vacurização e desprendimentos
Filete nervoso	Presente sem alteração
Colágeno dérmico	Íntegro
Infiltrado inflamatório	Presente sem alteração
Eosinófilos	Presentes sem alterações
Glândulas sudoríparas apócrinas	Presentes e íntegras
Plexo capilar dérmico	Presente e íntegro
Bactérias de putrefação	Ausentes

Tabela 19. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com uma solução a 5% de Palatase a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Camada Granulosa	Unicelular
Espaçamento intercelular da camada espinhosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Íntegro sem halos ou vacúolos
Camada Basal	Imperceptível
Células dendríticas intra-epidérmicas	Presentes sem alterações
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptíveis
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Ausente
Glândulas sudoríparas	Íntegras
Glândula Sebácea	Presente sem alteração
Vasos com desprendimento do endotélio	Ausente
Filete nervoso	Presente sem alteração
Espaçamento das fibras de colágeno dérmico	Ausente
Núcleos presentes no colágeno dérmico	Presentes
Eosinófilos	Presentes sem alterações
Infiltrado inflamatório	Presente e íntegro
Plexo capilar dérmica	Presente
Bactérias de putrefação	Ausentes

Tabela 20. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com uma solução a 5% de Palatase a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 10 AMOSTRAS
Estrato córneo alterado	Com desprendimento	2
Halo citoplasmático da camada espinhosa	Presente e de tamanhos pequenos	3
Fenda intra-epidérmica	Presente e moderada	1
Junção derme epiderme	Separação da derme e epiderme	1
Vacúolos citoplasmáticos no folículo piloso	Presente	2
Vacurização da túnica média de vasos	Presente	1

Tabela 21. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com uma solução a 2 % de Hidroquinona a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 10 AMOSTRAS
Estrato córneo alterado	Com desprendimento	2
Camada granulosa	Mais de uma camada	1
Vacúolos no citoplasma da camada espinhosa	Presentes e grandes	2
Halo citoplasmático da camada espinhosa	Presente e de tamanhos pequenos	4
Junção derme epiderme	Separação da derme e epiderme	1
Vacurização da túnica média de vasos	Presente	1

Tabela 22. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com uma solução a 2% de Hidroquinona a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Fenda intra-epidérmica	Ausente
Espaçamento intercelular da camada espinhosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Integro sem halos ou vacúolos
Camada Basal	Imperceptível
Células dendríticas intra-epidérmicas	Presentes sem alterações
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptíveis
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Ausente
Glândulas sudoríparas	Integras
Glândula Sebácea	Presente sem alteração
Vasos com desprendimento do endotélio	Ausente
Filete nervoso	Presente sem alteração
Espaçamento das fibras de colágeno dérmico	Ausente
Núcleos presentes no colágeno dérmico	Presentes
Eosinófilos	Presentes sem alterações
Infiltrado inflamatório	Presente e integro
Plexo capilar dérmica	Presente
Bactérias de putrefação	Ausentes

Tabela 23. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **normais** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO
Fenda intra-epidérmica	Ausente
Espaçamento intercelular da camada espinhosa	Discreto
Núcleo da camada espinhosa	Integro sem halos ou vacúolos
Camada Basal	Imperceptível
Células dendríticas intra-epidérmicas	Presentes sem alterações
Células melânicas intra-epidérmica	Imperceptíveis
Espaçamento intercelular do folículo piloso	Discreto
Vacúolos nucleares do folículo piloso	Ausente
Glândulas sudoríparas	Integras
Glândula Sebácea	Presente sem alteração
Vasos	Íntegros
Filete nervoso	Presente sem alteração
Espaçamento das fibras de colágeno dérmico	Ausente
Núcleos presentes no colágeno dérmico	Presentes
Eosinófilos	Presentes sem alterações
Infiltrado inflamatório	Presente e integro
Plexo capilar dérmica	Presente
Bactérias de putrefação	Ausentes

Tabela 24. Padrões histológicos encontrados na pele de orelha de porco doméstico classificados como **alterados** - 4 h após a morte (t_1), 25 °C, e 3 h em contato com tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 a 35 °C.

PADRÕES HISTOLÓGICOS	DESCRIÇÃO	INCIDÊNCIA EM 10 AMOSTRAS
Estrato córneo alterado	Com desprendimento	1
Camada granulosa	Mais de uma camada	1
Vacúolos no citoplasma da camada espinhosa	Presentes e grandes	1
Halo citoplasmático da camada espinhosa	Presente e de tamanhos pequenos	6
Junção derme epiderme	Separação da derme e epiderme	1

Os resultados das tabelas acima foram analisados estatisticamente, apenas para os parâmetros que não se mantiveram constantes (mostraram alterações) em todas as amostras (estrato córneo; camada granulosa; vacúolos citoplasmáticos da camada espinhosa; halo citoplasmático da camada espinhosa; fenda intra-epidérmica; junção derme-epiderme; vacúolos citoplasmáticos do folículo piloso e vacurização da túnica média dos vasos). Os parâmetros constantes apresentaram características histológicas normais. Para os demais parâmetros histológicos foi realizado o teste Qui-quadrado de Person (Siegel, 1975) para avaliar as diferenças entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas significativas quando p -valor foi menor do que 5% ($p < 0,05$, intervalo de confiança de 95%). A Tabela 25 apresenta os p -valores calculados para os diferentes tratamentos.

Tabela 25. Valores de p^a para a análise estatística dos parâmetros histológicos de orelhas de porco doméstico: comparação entre os tratamentos: 2% da Palatase; 5% de Palatase; 2% de Hidroquinona e Tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	TRATAMENTOS
	p -valor
Estrato córneo	0,52
Camada granulosa	1,00
Vacúolos no citoplasma da camada espinhosa	0,78
Halo perinuclear no citoplasma da camada espinhosa	0,78
Fenda intra-epidérmica	0,78
Junção derme-epiderme	1,00
Vacúolo no citoplasma do folículo piloso	0,29
Vacurização da túnica média dos vasos	1,00

(a) pelo teste de Qui-quadrado de Person; $p < 0,05$ evidência de diferença significativa entre os tratamentos.

Analisando-se os p -valores da Tabela 26 observa-se que não há diferença estatisticamente significativa (ao nível de 5%) entre os quatro tratamentos em todas as variáveis histológicas analisadas, uma vez que, os p -valores encontrados foram maiores que 0,05. A partir destes resultados, conclui-se que não ocorreram alterações histológicas estatisticamente significativas nas orelhas de porco pela aplicação e incubação (3h) a 35 °C das soluções aquosas de Palatase (2 e 5%) e da solução aquosa de hidroquinona (2%). Para saber o real efeito histológico da aplicação dérmica da hidroquinona e da Palatase seriam necessárias aplicações sucessivas e diárias destas substâncias em teste “in vivo”. Para a realização de testes em humanos é obrigatória a aprovação do teste por um Comitê de Ética. No presente trabalho isto não foi possível devido aos longos prazos para a liberação em Comitê de Ética e o prazo de defesa da dissertação.

5.4.2 Teste de citotoxicidade in vitro para fibroblastos de pele humana

As amostras - gel base com 2% de Palatase e Palatase pura - foram testadas quanto a sua capacidade de induzir a morte em fibroblastos de pele humana mantidos em cultura. Para isso as culturas de células presentes em uma placa de 96 poços foram expostas a concentrações crescentes das amostras e o efeito citotóxico verificado pela técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium).

Os resultados obtidos de citotoxicidade estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Concentração letal a 50% dos fibroplastos^a (CL₅₀) mantidos em cultura e concentração máxima não letal dos produtos gel base com 2% (v/v) de Palatase e Palatase pura.

PRODUTOS	CL ₅₀ (%v/v)	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO LETAL (%v/v)
Palatase	5,0 ± 0,5	0,78
Gel base contendo 2% (v/v) de Palatase	0,36 ± 0,01	0,17

(a) Método do MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium); meio de cultura DMEM/10%SFB.

A partir dos resultados presentes na Tabela 26 conclui-se que as concentrações máximas de gel base contendo 2% de Palatase e da enzima pura, para que não ocorra nenhuma morte celular, são de, respectivamente, 0,17 e 0,78% (v/v). A partir destas concentrações já foi observado um efeito citotóxico

dos produtos testados. A concentração letal para 50% da população dos fibroblastos mantidos em cultura (CL_{50}) para o gel base contendo 2% de Palatase e Palatase pura é de 0,36 e 5,0% (v/v) respectivamente.

A Palatase, quando aplicada pura em um cultivo de fibroblastos, apresentou-se menos citotóxica do que quando aplicada a 2% no gel base definido neste estudo. Isto pode ser devido à ação sinérgica citotóxica das demais matérias-primas presentes no gel base.

É importante ressaltar que o teste de citotoxicidade pelo método de MTT não leva em conta a proteção da barreira cutânea e sim a aplicação direta de um ativo na cultura de fibroblastos. Desta maneira, podemos considerar que o MTT é um teste que não demonstra a real citotoxicidade de uma formulação. Entretanto, a importância deste teste consiste em mostrar o que aconteceria caso 100% da formulação ou do ativo testado ultrapassasse todas as barreiras cutâneas, sem sofrer alterações ou inativações até entrar em contato com os fibroblastos da derme. Entretanto, muitas destas matérias-primas supostamente não permeariam até as camadas mais profundas da pele onde se encontram os fibroblastos da derme. Portanto, este aumento da citotoxicidade do gel contendo a enzima poderia não ocorrer em testes de aplicação real desta formulação na pele (<http://www.FDA.gov/>), mas somente testes de citotoxicidade in vivo poderão confirmar esta hipótese.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões que podem ser obtidas a partir deste trabalho são:

(1) A enzima Palatase apresentou uma alta atividade frente a diferentes substratos (valores, respectivamente para o pNPP, tributirina e trioleína) nos métodos utilizados neste trabalho; possui atividade lipolítica em uma larga faixa de pH (5,0 – 8,5), sendo que a sua atividade máxima (170 U/mg) ocorre em pH 7,5 e temperatura entre 45 °C – 50 °C. Além disto, possui uma excelente estabilidade à temperatura (com uma queda máx. 10% para 50 °C), nos testes de estabilidade acelerada da enzima pura.

(2) A enzima se mostrou ativa quando aplicada em uma formulação cosmética, mantendo atividade na presença de todas as matérias-primas (testadas uma a uma e na formulação completa). Contrariamente à estabilidade da enzima pura, a Palatase não se manteve estável no teste de estabilidade acelerada quando aplicada a 2% na base cosmética, pois perdeu de 86 a 96% de atividade quando incubada acima de 45 °C. Portanto, devem ser sugeridas condições de armazenamento especiais para os produtos.

(3) Com relação aos testes de segurança da Palatase, a condição experimental considerada mais adequada foi 4 h após a morte do animal em temperatura ambiente mais 3 h de incubação a 35 °C. Este estudo mostrou a cinética de degradação histológica de uma pele após a morte do animal, o que não é encontrado na literatura.

(4) A segunda parte do estudo de alterações histológicas demonstrou que não há nenhuma alteração na estrutura da pele quando realizada uma aplicação única de uma solução a 2 e a 5 % (v/v) da Palatase em contato por 3h a 35 °C.

(5) Entretanto, a concentração máxima de gel base contendo 2% de Palatase e de Palatase pura sem que ocorra nenhuma morte celular dos fibroblastos da derme é de respectivamente 0,17 e 0,78 % (v/v). A partir destas concentrações já é observado um efeito citotóxico dos produtos testados. A concentração letal para 50% da população dos fibroblastos mantidos em cultura (CL₅₀) para o gel base contendo 2% de Palatase e Palatase pura é 0,36 e 5,00 % (v/v) respectivamente.

Este trabalho estabeleceu as bases de pesquisa para os efeitos dos produtos cosméticos contendo lipases, tais como verificação das propriedades da enzima na formulação e de métodos para medir seus efeitos indiretos nos testes histológicos e citotóxicos. Trata-se de um trabalho pioneiro que mostra que lipases podem ser ativos promissores para a aplicação em formulações cosméticas, mas que muito ainda deve ser feito até a aprovação do produto final.

7. TRABALHOS FUTUROS

Como ressaltado acima, muito ainda há a ser feito na área de aplicação de lipases em cosméticos, e sugere-se os seguintes experimentos:

- Com relação à estabilidade da enzima na formulação cosmética:
 - desenvolvimento de metodologia específica para enzimas para avaliação do tempo de armazenagem, uma vez que mesmo a Palatase sendo muito mais estável (à temperatura) do que outras lipases conhecidas, não mostrou estabilidade no gel base quando foi aplicada uma metodologia de armazenamento acelerado que é normalmente aplicada a outros ativos.
 - novos ensaios devem ser feitos para definir em que condições o produto contendo a enzima deve ser armazenado.
- Estudo de permeação cutânea da Palatase e de formulações cosméticas contendo a enzima para a avaliação do seu real poder de penetração e eficácia nas diferentes camadas da pele humana.
- Estudo de aplicação *in vivo* em humanos da Palatase para adquirir mais dados sobre a segurança desta em aplicações cosméticas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding in esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 313-319, 1999.

BANDMANN, N.; COLLET, E.; LEIJEN, J.; UHLÉN, M.; VEIDE, A.; NYGREN, P.A. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 161-172, 2000.

BERTO, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternativa brassicicola*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 533-536, 1997.

BIER, M. Lipases. **Methods Enzymology**, v. 1, p. 627-651, 1955.

BORNSCHEUER, T.U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J. Hydrolases in organic synthesis regio and stereoselective biotransformations. Wiley –VCH, Weinheim, 1999

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. New York, John Wiley & Sons, 1978.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROCKMAN, H.L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Borgstrom, B. e Brockman, H.L. (Eds.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. p. 1-46.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; GIRONA, V.; PATKAR, S.A., ALSINA, M.A. Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, p.413-423, 2000 a.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; DE BOLÓS, J.; PATKAR, S.A.; ALSINA, M.A. Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic of a fungal lipase. **Biochimie**, v. 82, p. 1053-1061, 2000 b.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; KOUL, S.; TANEJA, S. C. Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter sp.* Lipase: kinetic resolution of fluoxetine intermediate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 39-44, 2006.

CHO, A. R.; YOO, S.K.; KIM, E. J. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, p. 235-238, 2000.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental design**. 2 Ed. New Uork, John Wiley & Sons, 1957.

DE POLO, K.F. **A Short Textbook of Cosmetology**. H.Ziolkowsky GmbH, Augsburg, 1998, p.19-42.

DE SALVERT, A.; SERA, D.; GUTH, G.; FODOR, P. **Composition for topical application containing a lipase and na active agent precursor**. European Patent Office, 1997, EP 0710478 B1.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 241-246, 1999.

EGLOFF, M. P.; RANSAC, S.; MARGUET, F.; ROGALSKA, E.; VAN TILBEURGH, H.; BUONO, G.; CABBILLAU, C.; VERGER, R. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In: Malcata, F.X. (Ed.). **Engineering of/with lipases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

FABRE, P. **La peau sous influence**. Paris. Bayard Editions. p. 175-182, 1999.

Federal Register, **Skin bleaching drug products for over-the-counter human use; proposed rule**. Department of health and human services, Food and Drugs Administration, v. 71, n. 167, 2006.

FEIN, H. **Selective enzymes treatment of skin conditions**. U.S Patent Application Publication, 2003, US 20030026794 A1.

FERNANDEZ, G. V.; BRIEVA, R.; GOTAU, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.40, p. 111-120, 2006

FERNANDES, M.L.M.; KRIEGER, N.; BARON, A.O; ZAMORA, P.P.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, M.L.M **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistemas de micelas reversas**. Curitiba, 2002. 107 f. Tese (Mestrado

em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

FROST, G.M.; MOSS, D.A. Production of enzymes by fermentation. **Enzyme Technology**, v. 7, p. 112-121, 1987.

GAO, Y.; BREUIL, C. "Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*". **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.14, n. 3, 1998.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic synthesis of fatty esters; Part I. kinetic approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 7, p. 584-590, 1999.

GARRIDO, P. P. ; QUIMIBEL, S. L. **Skin care composition and kit for shape-up use**. JP Patent Publication, 2004, JP 2004244355 A2.

GOLZ-BERNER, K.; ZASTROW, L. **Cosmetic product containing enzymes**. World Intellectual Property Organization, 2000, WO 0076458 A3.

GREENOUGH, R. J.; PERRY, C. J. STAVNSBJERG, M. Safety evaluation of a lipase expressed in *Aspergillus oryzae*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 34, n. 2, p. 161 – 166, 1996.

GUIRAUD, P.A.D. **Les cosmétiques et la peau**. Paris. Du Rocher Editions. p. 22-24. 1997.

GULTEKIN, M. S.; ÇELIK, M.; TURKUT, E.; TANYELY, C.; BALCI, M. Resolution of (±)-anti-2,3-dioxabicyclo(2.2.2)oct-7-en-5-ol via *Candida cylindracea* lipase: synthesis of (-)-and (+)-proto-quercitol. **Tetrahedron:Asymmetry**, v. 15, n. 3, p. 453-456, 2004.

GUTH, J.; LENTNER, V. **Aqueous enzyme delivery system**. World Intellectual Property Organization, 2006, WO 2006/018048 A1.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A.; Industrial application of microbial lipase. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

<http://anvisa.gov.br/>. Acessada em 10/09/2006

<http://ctfa.org/>. Acessada em 14/04/2005

<http://www.fda.gov/>. Acessada em 5/12/2006

<http://www.gnpd.com/>. Acessada em 18/10/2004

<http://www.iubmb.unibe.ch/>. Acessada em 29/03/2004.

<http://www.novozymes.com.br/>. Acessada em 7/05/2004

<http://www.skin-science.com/>. Acessada em 25/01/2006

HUNTING, A.L.L.; **Encyclopedia of conditioning rinse ingredients**. Micelle Press, Cranford, p. 130 – 346, 1987

IBRIK, A.; CHAHINIAN, H.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase *from Penicillium cyclopium*. **Lipids**, v. 33, n. 4, p.377-384, 1998.

IMAMURA, S., KITaura, S. Purification and Characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **Journal of Biochemistry**, v. 127, p. 419-425, 2000.

INTERNATIONAL SPF TEST METHOD GUIDELINES. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), v. 1, 2003.

ISAKSSON, D.; SJODIN, K.; HOGBERG, H. E. Enantiomerically enriched cryptone by lipase catalysed kinetic resolution. **Tetrahedron:Asymmetry**, v. 17, n. 2, p. 275-280, 2006.

IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Fungal lipase. In: Howard L. Brockman (Eds.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier, 443-469, 1984.

JAEGER, K .E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in? Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.E.; RANSACK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, 29-63, 1994.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, L. **Histologia Básica**. 8a. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1995.

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N., MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 307–313, 2003.

KAMYSHNY, A.; TROFIMOVA, D.; MAGDASSI, S.; LEVASHOV, A. "Native and modified glucose oxidase in reversed micelles". **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 24, 177-183, 2002.

KANG, H.; KIM, J.; KIM, H.; PARK, S.; OH, T.; HUR, C. MELDB: A database for microbial estearases and lipases. **Febs Letters**, v. 580, p. 2736-2740, 2006.

KASHIMO, Y.; NISHIDA, T.; TAKAHARA, Y. **Decomposition of melanin using a culture of Basidiomycetes fungus**. U.S Patent Application Publication, 1996, 5578296A.

KNOWLTON, J. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**, Cotswold Publishing Company, Oxon, p. 225. 1996.

KONTKNEN, H.; TENKANEN, M.; REINIKAINEN, T. Purification and characterization of a novel steryl esterase from *Melanocarpus albomyces*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, n. 2, p. 265-273, 2006.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. **Food Technology Biotechnology**, v. 42, n.4, p. 279–286, 2004.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.; AIRES-BARROS, M.R.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CABRAL, J.M.S. Purification of *Penicillium citrinum* lipase using AOT-Isooctane reversed micelles. **Journal Chemical Biotechnology**, v. 69, p. 77-85, 1997.

KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba, 1995. 260 p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LEE, D.W.; KIM, H.W.; LEE, K.W.; KIM, B.C.; CHOE, E.A.; LEE, H.S.; KIM, D.S.; PYUN, Y.R. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **Enzimology Microbial Technology**, v. 29, p. 363-371, 2001.

LIMA, A.W.O.; ANGNES L. Biocatálise em Meios Aquo-Restritos: Fundamentos a Aplicações em Química Analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65-71, 2004 b.

LIN, M.; LU, C.; CHENG, Y.; LIN, Y.; LIN, C.; LIN, G. Inhibition or activation of *Pseudomonas sp.* Lipases by 1,2-ethylene-di-N-alkylcarbamates in detergents. **Chemistry and Physics of Lipids**. Article in Press; 2007.

LOPES,S.P; KANEKO,M.T. Membranas no estudo de permeação cutânea. **Cosmetic & Toiletries.**, v.12, p.62-67, 2000.

MANCO, G.; DI GENNARO, S.; DE SOUZA, M.; ROSSI, M. Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*. **European Journal of Biochemical**, v. 221, p.965-972, 1994.

MAMMONE, T.; SCHNITTGER, S. F.; MAREUS, K. D.; MAES, H.D.; **Whitening compositions containing Ascomycete derived enzymes**. U.S Patent Application Publication, 2003, 6514506 B1

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, J.M.K.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5-6, p. 650 – 663, 2000.

MORI, N.; OKAYAMA, O.; OKAYAMA, K; OKAYAMA.; T. **Facial cleansers**. U.S Patent Application Publication, 2002, 20040151684 A1.

NAMBOODIRI, V.M.H; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v. 35, p. 495-502, 2000.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of Lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-Level Production and Purification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 488-492, 1996.

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE,C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. **Biochemical Biophysics Acta**, v. 1534, p. 34-44, 2001.

NIU, W.; ZHANG, D.; YU, H.; TAN, T. Imprard thermostability and the optimum temperature of *Rhizopus orrhizus* lipase by directed evolution. **Journal of Molecular Catalysts B: Enzymatic**. v. 43, n. 1-4, p. 33-39, 2006.

OISHI, H.; MORIMOTO, T.; WATANABE, Y. Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis* and cloning of phospholipase B gene. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 83-90, 1999.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PATEL, M.T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. Lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: a review. **Chemical Engineering Communications**, v. 153, p. 365-404, 1996.

RATHI, P.; BRADDOO, S.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 495-498, 2000.

REETZ, M.T.; JAEGER, K.E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 3-14, 1998.

RUBIN, J.; VIGLIOGLIA, A. P. **Cosmiatria II**. AP Americana, Buenos Aires, 1989, p. 22-74.

SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 80, p. 104-107, 1991.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal Microbiology Methodology**, v. 52, p.1-18, 2003.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, E. T.; **Skin Barrier Principles of Percutaneous Absorption**. S.Karger AG, Switzerland, 1996, p. 1-14.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization and Applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.T.; TSUMASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 349-352, 1993.

SIEGEL, Sidney. **Estatística Não-paramétrica**. Ed. Mcgraw-Hill, New York, 1975.

TOMIC, S.; RAMEK, M. Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 3-6, p. 139-147, 2006.

SOUZA, V.M.; **Ativos Dermatológicos**. Tecnopress Editora e Publicidade LTDA, São Paulo, 2003, p.23-25.

TOYAMA, K.; TAUCHI, T.; MASE, N.; YODA, H.; TAKABE, K. Lipase-catalyzed kinetic resolution of thiotetronic acid derivatives bearing a chiral quaternary carbon: total synthesis of (R)-thiolactomycin and its O-analogue. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n.40, p. 7163-7166, 2006.

UVARANI, G.; JAGANATHAN, L.; SHRIDAS, P.; BOOPATHY. "Purification and characterization of lipase from *Rhizomucor miehei*". **Journal of Science Industrial Research**, v. 57, 607-610, 1998.

VAN HEERDEN, E., LITTHAUER, D., VERGER, R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 30, n. 7, p.902-909, 2002.

VECCHIA, R.D. Imobilização de Lipases e Materiais Poliméricos Aplicações na Síntese de Ésteres. Florianópolis, 2004. 132 f. Tese (Doutorado em Química)-Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal de Santa Catarina.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

WATANABE, T.; MATSUE, R.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Differential activities of a lipase and a protease toward straight- and branched-chain acyl donors in transesterification to carbohydrates in an organic medium. **Carbohydrate Research**, v. 275, n. 1, p. 215-220, 1995.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Harry`s Cosmeticology**. Chemical Publishing, New York, 1982, p. 5-20.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WILSON, L.; PALOMO, J. M.; LORENTE, G. F.; ILLANES, A.; GUISAN, J. M.; LAFUENT, R. F. Effect of lipase – lipase interactions in the activity stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes sp.* **Enzymes and Microbial Technology**. v.39, n. 2, p. 259-264, 2006.

XINMIN, Y.U.; YU, X. **Process for preparing alkaline toilet soap containing lipase for nourishing pancreas.** CN Patent Application Publication, 2001, CN 1316500 A.

