UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Estudo comparativo da estabilidade de formulações
cosméticas contendo papaína livre e modificada**

Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo
2005

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P659e Pinto, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira
Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas
contendo papaina livre e modificada. / Claudinéia Aparecida
Sales de Oliveira Pinto. -- São Paulo, 2005.
128p.

Dissertação (mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

I. Emulsão cosmética : Cosméticos : Tecnologia I. T. II.
Velasco, Maria Valéria Robles, orientador.

668.55 CDD

Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto

**Estudo comparativo da estabilidade de formulações
cosméticas contendo papaína livre e modificada**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco
Orientador / Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ^{08/04} ____ de ____ de ____.

*Ao meu marido Cléber, pelo amor, carinho, amizade,
incentivo, apoio, e compreensão.*

*Aos meus filhos Arthur, pela colaboração e demonstração
de maturidade ao entender minha ausência, e Heitor pela
alegria e mesmo sem entender aceitar minha ausência.*

*À minha mãe, Maria das Graças, pelo exemplo de luta e
pela atenção com os netos.*

*Aos meus sogros Sr. Osseon e D^a. Isabel pelo cuidado com
meus filhos.*

*À minha orientadora Dra. Maria Valéria Robles Velasco,
pela orientação, dedicação e amizade.*

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer a todos que colaboram para a realização deste trabalho, mas vou tentar não cometer injustiças!!!

No início o incentivo de algumas pessoas foi muito importante, fazendo despertar o interesse pela pesquisa. O entusiasmo da Professora Dra. Maria Valéria Robles Velasco, da Professora Dra. Telma Mary Kaneko, da Patrícia Santos Lopes e da Júlia Kayko Yamamoto com as pesquisas sobre a aplicação da papaína me envolveram neste mundo fantástico.

As dificuldades foram surgindo e para enfrentá-las pude contar com o apoio de amigos de trabalho: José de Sousa Sobrinho, lutador que vai além do impossível para abrir caminho para um companheiro, Carla Aparecida Gonçalves dos Santos que se mostrou muito companheira neste período difícil, Edgar Muniz Júnior que me trouxe descontração nos momentos mais tensos. À Cristiane que fez das minhas refeições no bandeirão momentos para me alimentar com palavras incentivadoras e agradáveis. À minha companheira de caronas Sueli com quem muitas vezes dividi o peso dos materiais, artigos e pastas a serem levadas para o carro e à também mamãe Beth da secretaria pelo profissionalismo e pelos conselhos.

Aos professores Cristina Helena dos Reis Serra, Humberto Gomes Ferraz, Valentina Porta, Vladi Olga Consiglieri, Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, Elizabeth Igne Ferreira, que acreditaram que o desenvolvimento do trabalho seria possível. Muito obrigada pelo estímulo.

Para a execução deste projeto foi necessário contar com a valiosa colaboração dos Professores Dr. Sandro Roberto Marana, Dr. Walter Ribeiro Terra, Dra. Célia Célia e também dos alunos Sidnei, Lucas

Blanes, Fernando (Miguelito), Fábio (Pererê), Adriana e Paloma do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, que mais do que colaborar com o desenvolvimento do método de doseamento e empréstimo de equipamentos, cederam sua atenção e sempre me receberam de braços abertos para qualquer tipo de solicitação, isso foi muito importante.

A modificação da enzima envolveu o Prof. Dr. José Abrahão Neto do Laboratório de Enzimologia Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, que sempre muito prestativo não mediu esforços para que pudéssemos chegar ao final deste trabalho.

Ao pessoal do Biofar, Eunice Kazue, Éder, Ereminata e Valdirene, por cederem vidrarias, a água e muita atenção.

À comissão julgadora da banca de qualificação Prof. Dr. Flavio Finardi Filho e Profa. Dra. Érika Rosa Maria Kedor pelas orientações, sugestões e discussões que tornaram este processo final do trabalho conclusivo.

Meus amigos de curso e de laboratório, Janaína Cecília Villanova que cedeu sua casa para a primeira comemoração quando fui aprovada para realizar o curso de pós-graduação, aos companheiros de Cosmetologia Tânia Cristina de Sá Dias, André Rolim Baby, Vivian Zague, Gislaine Zulli, por compartilharmos desta maravilhosa ciência. Evelyn Ojoe e Vanessa Alves Pinheiro que me transmitiram a calma, paciência e perseverança para que eu não me desesperrasse e que percebesse a importância deste equilíbrio para a finalização do meu trabalho.

Todos participaram cedendo o que há de melhor em cada um. Alguns me fizeram acreditar em minha capacidade e outros dividiram seu conhecimento. A participação de todos teve uma importância que talvez vocês nem imaginem.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 - ENZIMAS	6
2.1.1 - Histórico	6
2.1.2 - Propriedades	9
2.1.3 - Especificidade dos substratos.....	10
2.1.4 - Efeitos do valor de pH.....	10
2.1.5 - Enzimas proteolíticas.....	11
2.1.6 - Enzimas em cosméticos	12
 2.2 - PAPAÍNA	15
2.2.1 - Características físicas.....	16
2.2.2 - Estrutura Molecular	17
2.2.3 - Estabilidade da papaína.....	18
2.2.4 - Ativadores e Inativadores	20
2.2.5 - Especificidade enzimática	21
2.2.6 - Estabilização da papaína	21
2.2.7 - Reações adversas	25
2.2.8 - Determinação da atividade de enzimas proteolíticas.....	27
 2.3 - ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS.....	34
 3- OBJETIVOS	36
 4- MATERIAL E MÉTODOS	38
 4.1 - MATERIAL.....	39

4.1.1 - Reagentes	39
4.1.2 - Padrão de referência.....	39
4.1.3 - Equipamentos.....	39
4.1.4 - Outros materiais.....	40
4.1.5 - Matérias-primas.....	40
4.2 - MÉTODOS.....	51
4.2.1 - Doseamento da atividade da papaína	51
4.2.1.1 - Soluções empregadas	51
4.2.1.2 - Validação da metodologia analítica.....	53
a) Condições instrumentais.....	53
b) Curva de calibração	54
c) Especificidade	55
d) Precisão	55
e) Exatidão.....	56
f) Limite de detecção	57
g) Limite de quantificação.....	57
4.2.2 -Modificação da enzima.....	58
4.2.3 - Teste de Estabilidade Preliminar.....	59
4.2.3.1 - Pré- formulações	59
4.2.3.2 - Condições do Teste Preliminar de Estabilidade e variáveis analisadas	62
4.2.4 - Teste de Estabilidade Acelerada	64
4.2.4.1 - Avaliação inicial	64
4.2.4.2 - Condições do teste	64
4.2.4.3 - Variáveis analisadas.....	65
4.2.5 - Teste de Estabilidade Normal	66
4.2.5.1 – Amostras	67
4.2.5.2 - Condições do teste de estabilidade normal.....	69
4.2.5.3 - Variáveis analisadas.....	69

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 - Curva de calibração	71
5.2 - Especificidade - estudo de interferentes dos excipientes, a partir das emulsões-base e gel-base sem papaína	73
5.3 - Precisão	77
5.4 – Exatidão	79
5.5 - Limite de detecção e quantificação.....	79
5.6 - Modificação da enzima	81
5.7 - Teste de estabilidade preliminar.....	81
5.8 - Testes de estabilidade acelerada	84
5.9 - Teste de estabilidade normal	93
 6- CONCLUSÕES	 107
 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 109

TABELAS

Tabela 1 - Famílias de enzimas proteolíticas	12
Tabela 2 - Propriedades físicas da papaína	16
Tabela 3 - Volumes adicionados das soluções das amostras e da solução padrão no teste de recuperação.....	56
Tabela 4 - Pré-formulações contendo 0,8% de papaína, preparadas para avaliação macroscópica e aspecto sensorial (1 a 11).	60
Tabela 5 - Pré-formulações contendo 0,8% de papaína, preparadas para avaliação macroscópica e aspecto sensorial (12 a 23).	61
Tabela 6 - Formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Normal.	68
Tabela 7 - Resultados experimentais obtidos na curva de calibração para a papaína Merck 30000, USP/mg, padrão secundário.	71
Tabela 8 - Resultados experimentais do estudo de interferentes dos excipientes obtidos no doseamento da formulação 2, sem adição de papaína.....	73
Tabela 9 - Resultados experimentais do estudo de interferentes dos excipientes obtidos no doseamento da formulação 3, sem adição de papaína.....	74
Tabela 10 - Resultados experimentais do estudo de interferentes dos excipientes obtidos no doseamento da formulação Gel, sem adição de papaína. ...	75
Tabela 11 - Precisão intra-dia - Resultados experimentais obtidos da avaliação da precisão intra-dia das amostras 2, 3 e Gel. As leituras foram obtidas no mesmo dia.	77

Tabela 12 - Resultados obtidos no teste de recuperação da papaína aplicado nas amostras das formulações 2, 3 e Gel	79
Tabela 13 - Resultados para cálculo do limite de detecção e quantificação da papaína pelo método espectrofluorimétrico de microplacas.....	79
Tabela 14 - Avaliação das características organolépticas e físicas das pré-formulações contendo 0,8% (p/p) de papaína no Teste de Estabilidade Preliminar	82
Tabela 15 - Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação 2 acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Acelerada	85
Tabela 16 - Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação 3 acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Acelerada	86
Tabela 17 - Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação 14 acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Acelerada	87
Tabela 18 - Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação 16 acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Acelerada	88
Tabela 19 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação 2 , acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal	94
Tabela 20 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $22 \pm 2,0$ °C da formulação 2 , acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal	94

Tabela 21 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $40 \pm 2,0$ °C da formulação 2 , acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal	95
Tabela 22 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico- químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação 3 , acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal	95
Tabela 23 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $22 \pm 2,0$ °C da formulação 3 , acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.....	96
Tabela 24 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $40 \pm 2,0$ °C da formulação 3 , acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.....	96
Tabela 25 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico -químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação 2M , acrescida de papaína modificada p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal. Condição $5 \pm 1,0$ °C	97
Tabela 26 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $22 \pm 2,0$ °C da formulação 2M , acrescida de papaína modificada p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.	97
Tabela 27 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $40 \pm 2,0$ °C da formulação 2M , acrescida de papaína modificada p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal	98
Tabela 28 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas e físico-químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação Gel acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.....	98

FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura da papaína	17
Figura 2 - Representação da distribuição da amostra na microplaca de 96 poços	53
Figura 3 - Curva de calibração da papaína Merck 30000USP/mg.	71
Figura 4 - Curva de 4 tempos (tempo x unidades de fluorescência) obtida pelo doseamento da formulação 2 , sem adição de papaína.	73
Figura 5 - Curva de 4 tempos (tempo x unidades de fluorescência) obtida pelo doseamento da formulação 3 , sem adição de papaína.	74
Figura 6 - Curva de 4 tempos (tempo x unidades de fluorescência) obtida no doseamento da formulação Gel , sem adição de papaína	75
Figura 7 - Variação de pH (%) para as formulações 2, 3, 14 e 16 , nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Acelerada	89
Figura 8 - Variação da condutividade (%) para as formulações 2, 3 14 e 16 , nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Acelerada	90
Figura 9 - Variação da viscosidade aparente (%) para as formulações 2, 3, 14, 16 , nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Acelerada	91
Figura 10 - Variação da Atividade da papaína (%) para as formulações 2, 3, 2M e Gel , nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal	99
Figura 11 - Variação do valor de pH (%) para as formulações 2, 3, 2M e Gel , nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal	103

Figura 12 - Variação do valor de viscosidade aparente (%) para as formulações 2, 3 e Gel, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal 104

Figura13 - Variação do valor da condutividade (%) para as formulações 2, 3 e Gel, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal..... 105

RESUMO

A papaína é uma enzima utilizada em formulações tópicas como agente proteolítico debridante, no tratamento de lesões abertas de grande extensão e queimaduras. Também empregada como agente promotor da permeação cutânea, *peeling* químico e como agente depilatório progressivo.

A estabilidade de formulações contendo enzimas não é facilmente alcançada. No presente trabalho realizou-se a modificação da papaína com polietilenoglicol, visando maior estabilidade.

O Teste de Estabilidade Normal de formulações cosméticas incorporadas de papaína não modificada e modificada apresentou um perfil diferenciado para a atividade da enzima modificada, nas diferentes condições de temperatura (5 ± 1 °C; 22 ± 2 °C, 40 ± 2 °C), sendo que a mais adequada para a papaína não modificada foi de 5 ± 1 °C e para a modificada foi de $22 \pm 2,0$ °C.

Estes resultados confirmam o aumento da estabilidade da papaína modificada e o seu potencial de aplicação em formulações de uso tópico.

ABSTRACT

Papain is an enzyme used in formulations for local application as proteolytic debridant agent, treatment of wound exposed in large extension and burns. It is also applied as promotor agent of cutaneous permeation, chemical peeling and as progressive depilatory agent.

The stability of formulations with enzymes is not easily obtained. In this work modification of papain with polyethylenglycol was made in order to obtain more stability.

The Test of Normal Stability of cosmetic formulations incorporated with papain not-modified and modified, showed a differentiated profile for modified enzyme in different conditions of temperature (5 ± 1 °C; 22 ± 2 °C, 40 ± 2 °C), being that, the most adequate for papain not-modified was 5 ± 1 °C and for modified was $22 \pm 2,0$ °C.

These results confirm the increase of stability of papain modified and its potential application in formulations for local application.

1- INTRODUÇÃO

Os estudos de estabilidade de produtos cosméticos visam o conhecimento do comportamento de componentes incorporados em diferentes veículos/excipientes resultando em formulações diversas, submetidas a variadas condições de vibração, temperatura e umidade em determinado período de tempo. Conhecer o prazo de validade em que uma formulação cosmética mantém sua integridade física, química, microbiológica e toxicológica frente a essas variações, reflete as condições de segurança e eficácia durante este período. Produtos expostos ao consumo e que apresentem problemas de estabilidade além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade, podem comprometer os objetivos propostos ao produto e, colocar em risco a saúde do usuário. O teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo no desenvolvimento de produtos cosméticos para avaliar prazo de validade, baseado em informações obtidas de produtos armazenados com condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer quando o produto está disponível no mercado (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

A papaína é uma enzima proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto, *Carica papaya Linn*. Seu uso em formulações tópicas é muito difundido como agente proteolítico debridante, sendo usada no tratamento de lesões abertas de grande extensão e de queimaduras. Na Cosmetologia é empregada na pele íntegra como agente promotor da penetração e permeação cutânea, *peeling* químico e como agente depilatório progressivo (HWANG & IVY, 1951; GUZMAN & GUZMAN, 1953; STARLEY et al, 1999; LOPES, 1999; TRAVERSA et al., 2003).

A estabilidade de formulações elaboradas com enzimas, geralmente é dificultada por sua característica reativa com os componentes da formulação e material de acondicionamento. Uma alternativa para elevar a estabilidade das preparações com papaína envolve a modificação de sua estrutura, protegendo seu sítio ativo da hidrólise. Um estudo comparativo entre as formas da enzima livre e conjugada visa verificar a possibilidade da aplicação desta última como matéria-prima em formulações

medicamentosas ou cosméticas (VELASCO, 1993; HEBDA, FLYNN & DOHAR, 1998; TRAVERSA, 2003; SIM et al., 2003; PIEPER & CALIRI, 2003).

Para verificação da atividade da papaína em formulações de uso tópico existe a necessidade de utilizar uma metodologia com determinadas características, como: rapidez, sensibilidade, facilidade de execução e baixo custo. A literatura cita inúmeros métodos de avaliação da atividade de enzimas proteolíticas, que dependem da hidrólise quantitativa de determinada proteína ou substrato peptídico pela enzima (ERLANGER, KOKOWSKY & COHEN, 1961; TANG, ROWELL & CUMMING; 1997).

Existem inúmeras variáveis que dependem do tipo de substância a ser detectada e do substrato empregado. Os métodos envolvidos empregam a colorimetria, a espectrofotometria e a espectrofluorimetria, dentre outros. A metodologia fluorimétrica é bastante sensível e depende da própria fluorescência da enzima ou das propriedades fluorescentes do produto gerado.

A utilização de microplacas e do substrato sintético fluorimétrico cloridrato de carbobenzoxi-L-fenilalanina- L arginina – 4-metilcumarina – 7-amido apresenta-se como alternativa ao método espectrofotométrico convencional de doseamento da papaína. O produto da reação da papaína com este substrato resulta na metilcumarina, de elevada fluorescência. Este método apresenta potencial de emprego analítico para a papaína, pois possui elevada sensibilidade e é de fácil execução.

O método das microplacas pode ser utilizado para doseamento da papaína livre e conjugada incorporada nos diversos tipos de formulações cosméticas e farmacêuticas sob a forma de solução, gel e emulsão. Esse método também pode ser empregado para monitorar a atividade proteolítica da papaína durante o estudo de estabilidade da formulação, visando estimar seu prazo de validade e comparar a atividade da enzima nas formas livre e conjugada (LINDHAL et al., 1988; KORITSAS & ATKINSON, 1995).

A validação do método analítico escolhido (espectrofluorimetria), envolvendo microplacas e substrato fluorimétrico foi realizada a fim de torná-

lo executável com todas características de confiabilidade.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – ENZIMAS

2.1.1 - Histórico

Os sistemas vivos, do vírus ao homem, são formados por uma grande variedade de reações bioquímicas e quase todas são mediadas por vários catalisadores biológicos, conhecidos como enzimas. A Enzimologia, ou estudo das enzimas, tem sua raiz nos primórdios da Bioquímica, pois ambas se desenvolveram simultaneamente, a partir de pesquisas sobre a fermentação e a digestão (COPELAND, 1996; VOET, 2000; LEHNINGER, 2002).

Os povos da antiguidade produziam queijos, pães e bebidas alcoólicas utilizando enzimas. Atualmente, continuam sendo utilizadas na produção de alimentos, bebidas e numerosos produtos como sabões para lavar roupas, medicamentos e produtos cosméticos. Além das enzimas serem de fundamental interesse para a saúde humana despertam grande fascinação entre os cientistas (COPELAND, 1996).

O registro mais antigo que se refere ao uso comercial de enzimas é uma descrição do preparo de vinho no *The Code of Hammurabi* (conjunto de leis de uma antiga civilização da Babilônia) a cerca de 2100 a.C. O uso de microrganismos como fonte de enzimas para fermentação foi difundido pelos povos antigos. Descrições destes processos foram encontradas em escrituras não somente dos povos da Babilônia, como também em documentos das antigas civilizações de Roma, da Grécia, do Egito, da China e da Índia. Estes contêm descrições que relatam o processo de produção do vinagre, baseado na conversão enzimática do álcool em ácido acético, utilizado não somente na alimentação como na preparação de medicamentos. A produção do queijo também foi muito importante para estas sociedades e a enzima utilizada eram a ficina, obtida do extrato da árvore de figo e a renina, extraída do estômago de animais como a vaca. A primeira referência da atividade da ficina foi encontrada no clássico “*Ilíada*” de Homero. Outro alimento importante para a época, o pão, também

necessitava da ação das enzimas que resultava na produção do dióxido de carbono. O amaciamento da carne, processo baseado na ação de enzimas, foi utilizado desde a Antiguidade. Quando a marinha britânica começou a explorar as ilhas do Pacífico em 1700, conheceu o uso da papaia para amaciamento de carne e tratamento de micoses. Relatos do uso nativo da papaia despertaram muito interesse na Europa no século XVIII (COPELAND, 1996).

Os povos antigos utilizaram as enzimas de forma prática e sua aplicação foi baseada no conhecimento empírico e folclore, porém nos séculos 18 e 19 os cientistas começaram a estudar a ação das enzimas de forma sistemática. Os processo de digestão foram de interesse popular no período do Iluminismo. Réaumur (1683-1757), realizou alguns estudos prévios sobre digestão nos pássaros, utilizando um tubo de metal para proteger a carne da ação física do estômago. Este foi inserido no estômago do animal e a carne foi digerida por 24 horas. Ele concluiu que o processo de digestão não era apenas físico, mas também químico e repetiu o experimento com um pedaço de osso e um de planta, verificando que o primeiro foi amaciado e a planta não foi atingida. Esta foi provavelmente a primeira demonstração de atividade específica das enzimas (COPELAND, 1996).

Posteriormente Spallanzani (1729-1799), repetiu o experimento com diferentes animais inclusive seres humanos. Também utilizou seu próprio suco gástrico para observar a digestão de pedaços de carne *in vitro*. Estes experimentos ilustraram alguns fatores críticos do “ingrediente ativo” (que ainda não tinha sido definido) do suco gástrico. Ele demonstrou que o volume de água, a temperatura e o tempo influenciavam na atividade do “ingrediente ativo” do suco gástrico e que fora do corpo sua atividade diminuiu com o tempo. Nesta mesma época descobriu-se atividade enzimática de diferentes sistemas biológicos, como por exemplo a peroxidase de origem vegetal, e a α -amilase em grãos (COPELAND, 1996).

Durante a segunda metade do século XIX os cientistas começaram a voltar sua atenção para fracionar extratos diversos que continham enzimas e obter o “ingrediente ativo” sob a forma pura. Inicialmente, a impossibilidade de reproduzir a maioria das reações bioquímicas no laboratório conduziu Louis Pasteur (1822-1895) e outros pesquisadores a considerar que os sistemas vivos eram dotados de uma “força vital” que lhes permitia evitar as leis da natureza que governavam a matéria inanimada. Contudo, alguns investigadores, principalmente Justus von Liebig (1803-1873), argumentaram que os processos biológicos eram causados pela ação de substâncias químicas que, na época, eram conhecidas como “fermentos”. Durante este período, em 1878, Wilhelm Kühne, ao estudar a catalise dos extratos de leveduras, definiu pela primeira vez o termo enzima (do grego, *em* + *zyme*, levedura). Bertand purificou parcialmente a enzima laccase de uma árvore. Buchner (1897), utilizou um suco prensado e rehidratado de uma levedura, que foi estocado em baixa temperatura (0 °C). Ocorreu diminuição de sua atividade em 5 dias e quando foi adicionado caldo de cana de açúcar esta foi mantida por 2 semanas, na mesma condição de temperatura. Este pesquisador demonstrou que a fermentação alcoólica poderia acontecer na ausência de células vivas. Este fato foi um grande marco na história das enzimas o que encorajou os pesquisadores a tentar isolar muitas enzimas diferentes, e posteriormente estudar suas propriedades catalíticas. (COPELAND, 1996; VOET, 2000; LEHNINGER, 2002).

Até 1926, a composição química das enzimas não havia sido totalmente esclarecida e somente após esta data foi obtido seu isolamento sob a forma cristalina pura. A primeira enzima a ser cristalizada por James Sumner foi a urease, obtida de extratos do feijão de soja (VOET, 2000; LEHNINGER 2002).

Atualmente, cerca de 2.000 tipos de enzimas foram identificadas e cada uma delas catalisa uma reação química diferente, sendo centenas obtidas sob a forma cristalina pura (LEHNINGER, 2002).

Para que as moléculas possam reagir devem ter energia suficiente que lhes permita atingir um estado reativo denominado de transição e a velocidade de reação é diretamente proporcional ao número de moléculas que atingem este estado. A diminuição do valor da energia de ativação é uma forma de acelerar a velocidade da reação que pode ser obtida na presença de catalisadores, como enzimas, substâncias que aceleram a velocidade de uma reação química, sem ocorrer seu consumo pelo processo (CHAMPE & HARVEY, 1996, MURRAY, 1998; MARZZOCCO, 1999; VOET, 2000).

2.1.2 - Propriedades

Desde a época de Pasteur, a pesquisa bioquímica tem demonstrado que, embora estejam sujeitas às mesmas leis da natureza que governam o comportamento de outras substâncias, as enzimas diferem dos catalisadores químicos comuns em vários aspectos importantes (VOET, 2000).

a. Velocidade de reação mais rápida

A velocidade das reações catalisadas pelas enzimas é maior do que as reações correspondentes não catalisadas, geralmente 10^6 a 10^{12} . A velocidade inicial de uma reação catalisada pela enzima é sempre proporcional à sua concentração (VOET, 2000).

b. Condições de reação mais brandas

As reações catalisadas enzimaticamente ocorrem em condições mais brandas que as correspondentes não catalisadas, como no caso de temperaturas inferiores a 100 °C, pressão atmosférica e valor de pH entre 5 e 9. Em contraste, geralmente uma catálise química eficiente requer temperatura e pressão elevadas, assim como valores de pH extremos (VOET, 2000).

c. Maior especificidade da reação

As enzimas apresentam maior especificidade que os catalisadores químicos em relação à identidade dos seus substratos (reagentes) e dos seus produtos, isto é, as reações enzimáticas dificilmente produzem subprodutos (MURRAY, 1998; VOET, 2000).

2.1.3 - Especificidade dos substratos

As forças não-covalentes, por meio das quais substratos e outras moléculas se ligam às enzimas, são similares aquelas que regem a conformação das proteínas. Ambas envolvem interações do tipo: ponte de hidrogênio, de Van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas. Em geral, o sítio de ligação do substrato consiste de uma depressão ou sulco na superfície da enzima, complementar ao formato dos substratos (complementaridade geométrica). A complementaridade entre as enzimas e seus substratos é a base do modelo “chave-fechadura” da função enzimática, proposto por Emil Fischer em 1894. O modelo de Koshland (1958) é um modelo mais refinado e é denominado de modelo do encaixe induzido, sendo a característica principal a flexibilidade da região do sítio ativo. Neste modelo, o substrato induz uma mudança de conformação na enzima, na orientação espacial correta para a ligação do substrato (MURRAY, 1998; VOET 2000).

Quando existe quantidade suficiente de substrato para reagir com a enzima livre, qualquer aumento ou decréscimo na concentração de enzima é acompanhado pelo aumento ou decréscimo correspondente na velocidade de reação (MURRAY, 1998).

2.1.4 - Efeitos do valor de pH

A maioria das proteínas é ativa apenas em um intervalo estreito de valor de pH, freqüentemente de 5 a 9, influenciando a ligação do substrato à enzima, o estado de ionização dos resíduos de aminoácidos envolvidos na

atividade catalítica da enzima, a ionização do substrato e a variação da estrutura da proteína (em geral, significativa somente em valores extremos de pH). As velocidades de muitas reações enzimáticas apresentam curvas que obedecem à distribuição normal (curva em forma de sino) em função do valor de pH, refletindo o estado de ionização de alguns resíduos de aminoácidos que influenciará a atividade enzimática (VOET, 2000).

As enzimas apresentam valores de pH onde possuem atividade máxima, denominado de pH ótimo. Valores extremos causam sua denaturação, por meio da protonação ou desprotonação de resíduos de aminoácidos ácidos ou básicos, impedindo a formação de ligações iônicas responsáveis pela manutenção da estrutura das enzimas (MURRAY 1998, VOET, 2000).

2.1.5 - Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas participam de numerosos processos celulares e extracelulares na saúde e na doença, clivando ligações peptídicas e historicamente foram associadas com processos de digestão em animais e homem. As proteinases são agrupadas em 6 famílias, de acordo com o resíduo de aminoácido essencial em seu sítio ativo e sua estrutura tridimensional, conforme indicado na **Tabela 1**. Os membros destas famílias descendem de um antecessor comum que se diferenciou durante a evolução. O intervalo de pH ótimo, de atividade, a sequência de aminoácidos e os inibidores são similares entre elas (NEURATH, 1989; STERCHI & STÖKER, 1999).

Tabela 1 - Famílias de enzimas proteolíticas (NEURATH, 1989)

Família	Proetase representante	Característica do resíduo do sítio ativo
Serina protease I	Chymotrypsina	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
Serina protease II	Sutlisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Cisteína protease	Papaína	Cis²⁵, His¹⁵⁹, Asp¹⁵⁸
Aspartico protease	Penicillopepsin	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metallo-protease I	Carboxipeptidase A Bovina	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸
Metallo-protease II	Termolisina	Zn, Glu ¹⁴³ , His ²³¹

2.1.6 - Enzimas em cosméticos

O uso de enzimas em cosméticos tem sido muito disseminado nos últimos anos. Enzimas proteolíticas, como a papaína e bromelina, entre outras, têm sido empregadas na Cosmetologia para o *peeling* químico, em formulações depilatórias e como promotores de penetração (BROOKS, 1999; LOPES, 1999; PROTOPA et al., 1999; ROHR, BENARD & SCHRADER, 2000; TRAVERSA et al., 2003).

O emprego de proteases na superfície da pele exige alguns cuidados, pois é difícil controlar sua ação e muitas vezes a enzima continua agindo para o interior da pele causando irritação (BROOKS, 1999).

É interessante notar que o processo natural de renovação de camadas da pele é controlado por meio de enzimas específicas que liberam as células mortas da superfície da pele. Quando esta for normal, a produção de queratinócitos na camada basal da epiderme é balanceada pela perda destas células da superfície do estrato córneo durante o processo de descamação. Caso este balanço esteja alterado, existe falha na descamação e também pode ocorrer a hiperproliferação dos queratinócitos, resultando no aumento da coesão destes na superfície da pele. Um dos principais componentes do estrato córneo responsável pela coesão das

células são os desmossomos, compostos, em parte, de proteínas transmembranárias como a *desmocollin-1* (dsc1), a *desmoglein-1* (dsg1), a *desmoplakin* e a *corneodesmosin* que por meio de interações com proteínas idênticas nas células adjacentes realizam a coesão celular. Esses componentes são progressivamente degradados durante o processo de maturação requerido para a descamação normal (EL-KADI et al., 2001; RAWLINGS, 2003).

O aumento do número de desmossomos intatos na pele eleva a coesão dos queratinócitos, diminuindo a velocidade da descamação e confere à pele aspecto seco. O processo de esfoliação na superfície da pele ocorre pela ação específica de enzimas hidrolíticas que degradam os desmossomos e diminuem as forças de coesão dos queratinócitos (BROOKS, 1999; EL-KADI et al., 2001; BERNAD et al., 2003; RAWLINGS, 2003).

O efeito da papaína no tratamento da pele seca foi investigado por El-Kadi, et al., 2001, que verificou seu potencial de utilização para diminuição do problema, utilizando uma escala visual para avaliação. Os efeitos foram analisados após 3 e 24 horas da aplicação da enzima e foram considerados melhores que o veículo.

A eficácia de um produto cosmético é determinada por sua capacidade de liberar seus componentes ativos no sítio de ação. O conceito de liberação de substâncias funcionais distingue-se entre liberação dérmica e transdérmica. No primeiro caso, o local de ação da substância ativa é no estrato córneo e denomina-se penetração; e quando ocorre na epiderme viável e/ou derme é denominado de permeação. Para ocorrer a liberação transdérmica, ou absorção da substância ativa, conhecida como de absorção percutânea, o local de ação envolve a derme e a circulação sistêmica (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; OSTROSKY, 2001).

As enzimas podem interferir na permeação cutânea, favorecendo ou impedindo a absorção de substâncias ativas, portanto podem ser utilizadas como promotores ou retardadores deste processo (LOPES, 1999).

Enzimas proteolíticas, como a papaína, são empregadas como promotores de penetração cutânea de substâncias ativas incorporadas nos produtos tópicos, pois o estrato córneo é uma membrana relativamente impermeável que limita o processo de absorção. A via mais importante de penetração através do estrato córneo é a matriz lipídica, e a velocidade como este fenômeno ocorre depende das características da substância envolvida. As maiores variáveis que influenciam neste processo envolvem concentração da substância ativa, o coeficiente de partição do permeante entre o estrato córneo e o veículo e a difusibilidade do princípio ativo com o estrato córneo (MORGANTI et al., 2001).

Pesquisas demonstraram que a papaína promoveu absorção de substâncias ativas pela pele, sendo o efeito da penetração de fármacos investigado por Sim et al., 2003. A papaína foi conjugada com SC-glucam™ para garantir sua estabilidade durante o processo de absorção. Os fármacos utilizados foram a antipirina e a indometacina como modelo hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente. Os resultados indicaram que a papaína facilitou a absorção cutânea da antipirina. A espessura do estrato córneo e da epiderme viável aumentou após o tratamento com a papaína conjugada com SC-glucam, além disso, ocorreu indução da fase de separação, formação de lacuna e destruição lamelar dentro dos interstícios do estrato córneo. Contudo, a papaína conjugada com SC-glucam™ não foi irritante para a pele (SIM et al., 2003).

A ação promotora de penetração foi investigada por Lopes, 1999, que estudou a papaína (0,2% p/p) incorporada em formulação contendo diclofenaco sódico, comparando-a com o óleo de pequi como auxiliar de penetração. A enzima apresentou resultados satisfatórios em relação ao segundo promotor investigado.

Lopes, 2003, verificou a segurança do uso da papaína como promotor de absorção cutânea, utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos. O estudo demonstrou que a papaína foi inócua e segura, pois permitiu a recuperação dos queratinócitos humanos, conduzindo a formação do epitélio celular após 21 dias. A eficácia foi

comprovada por meio de métodos biofísicos, observando-se a desestruturação dos componentes do estrato córneo, que permitiu a passagem de substâncias ativas através da pele.

Enzimas proteolíticas, como a papaína, são consideradas como retardadoras do crescimento do pêlo. De acordo com Prista e colaboradores, 1995, a papaína penetrou pelos canais foliculares, moderando esta ação. Hernandez & Mercier-Fresnel (1999) e Breuer (1990) também citaram o emprego de enzimas proteolíticas para retardar o crescimento do pêlo. Em 1972, Barry et al., consideraram a papaína como um depilatório enzimático (TRAVERSA et al., 2003).

Traversa et al., 2003, estudaram os efeitos da papaína sobre o pêlo e o folículo piloso decorrentes da utilização de formulações gel hidrofílico e emulsão tipo óleo em água contendo papaína (0,8%) em dois grupos de dez camundongos machos *Swiss*. A aplicação foi realizada diariamente durante um período de 30 dias e a papaína veiculada na emulsão, conduziu ao efeito depilatório visível nos camundongos, sendo pouco expressivo quando a enzima foi incorporada na forma cosmética gel hidrofílico (TRAVERSA et al., 2003).

2.2 - PAPAÍNA

As enzimas proteolíticas têm sido investigadas extensivamente por muitos anos por vários pesquisadores. A papaína é uma enzima proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto, *Carica papaya Linn* e consiste de um mistura de proteínas, envolvendo essencialmente uma combinação de papaína e quimopapaína, enzimas proteolíticas que hidrolisam polipeptídios, amidos e ésteres, especialmente nas ligações envolvendo aminoácidos básicos, leucina ou glicina, produzindo peptídeos de baixo peso molecular. O termo refere-se tanto ao látex bruto seco quanto à enzima cristalina. A árvore de papaia é cultivada na maioria dos países tropicais. Os maiores produtores são a Índia, Sri Lanka, Malásia, Indonésia,

América do Sul e Central, África do Sul e Havai (HWANG & IVY, 1951; MERCK INDEX, 1996; MARTINDALE, 2002).

2.2.1 - Características físicas

Várias características físicas da papaína são listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Propriedades físicas da papaína (SASMITO, DEMEESTER & BRACKE, 1982; KAMPHUIS et al., 1984; MERCK INDEX, 1996; DARDENNE et al., 2003).

Propriedades físicas	Característica/Valor
Apresentação	Pó branco ou branco acinzentado, altamente higroscópico
Ponto Isoelétrico	PH 8,75
Constante de sedimentação $S_{20,w}$	2,42 +/- 0,04S
Constante de difusão $D_{20,w}$	10,27 +/- 0,13x10 ⁻⁷ cm ² sec ⁻¹
Massa molecular	23.350 Dalton
Coeficiente de extinção, $E^{1\%}_{1cm}$	25,0
K_m (BAEE)	0,023M
Rotação óptica (pH 5,7; 25 °C) $[\alpha]_D$	-66,7°
Conteúdo de α -hélice	17%
Solubilidade	Água e glicerol incompleto Álcool, clorofórmio e éter – Insolúvel
Faixa de temperatura favorável para a reação proteolítica	60 a 90°C sendo 65°C o ponto ótimo
Faixa de pH ótimo para a reação enzimática	5,0 a 7,0
Faixa de pH da solução a 2% em água	4,8 a 6,2

2.2.2 - Estrutura Molecular

A molécula da papaína consiste de uma cadeia polipeptídica simples. Sua seqüência de aminoácidos foi reportada primeiramente por Light et al., 1964, que descreveram a indicação da posição das pontes de dissulfetos na molécula, bem como do grupo sulfidril ativo. Uma das principais características estruturais da papaína é a presença de dois domínios, ou regiões topográficas, do mesmo tamanho, o domínio R e o domínio L (**Figura 1**), mas de conformação diferente, delimitando o sítio ativo em uma fenda profunda (ARNON, 1970; SASMITO, DEMEESTER & BRACKE, 1982; KAMPHUIS, 1984; DARDENNE et al., 2003).

Figura 1 – Representação da estrutura da papaína (IMAGE GALLERY, 2004)

Na primeira parte, domínio L, começando pelo grupamento amino terminal, a cadeia é dobrada ao redor de um núcleo hidrofóbico contendo três regiões de α -hélices, sendo que seu conteúdo na molécula é de aproximadamente 20%. A segunda parte, domínio R, contém além da região

α -hélice uma β -estrutura (ARNON, 1970; SASMITO, DEMEESTER & BRACKE, 1982; KAMPHUIS, 1984).

Existem sete resíduos de cisteína, seis envolvidos na formação da ligação dissulfeto, dois constituindo a primeira parte da cadeia (Cys22-Cys63 e Cys56-Cys95) e um na segunda parte (Cys153-Cys200). O sétimo resíduo de cisteína (Cys25) participa do sítio catalítico. As duas partes da molécula são unidas por pontes de hidrogênio, ligação eletrostática e efeitos hidrofóbicos (ARNON, 1970; SASMITO, DEMEESTER & BRACKE, 1982).

A seqüência primária exata da molécula da papaína e sua estrutura foi estabelecida por estudos químicos e parcialmente por estudos de raio X. A molécula tem 212 resíduos de aminoácidos, seu formato é elipsoidal e possui dimensões aproximadas de 5,0 x 3,7 x 3,7nm (ARNON, 1970; SASMITO, DEMEESTER & BRACKE, 1982).

A conformação da papaína é estabilizada por três ligações dissulfeto e sua ruptura completa resulta na destruição da proteína, com redução da atividade biológica, catalítica e imunológica. Porém, nem todas as ligações dissulfeto são essenciais para a performance da função biológica (SASMITO, DEMEESTER & BRACKE, 1982).

2.2.3 - Estabilidade da papaína

A estabilidade da papaína pode ser influenciada por condições ambientais, tais como temperatura, luz, presença de oxigênio, umidade e material de acondicionamento. A enzima apresenta-se mais estável e ativa no intervalo de pH de 5,0 a 7,0 (SASMITO, DEMEESTER & BRACKE, 1982; SIM et al., 2000).

Arnon, 1970, relata alguns experimentos onde a enzima foi submetida a diferentes condições para verificação de sua estabilidade. Em solução de derivados de mercúrio, sua atividade enzimática diminui de 1 a 2% por dia, provavelmente resultado de autólices e/ou oxidação. A papaína sob a forma de pó resistiu ao calor seco a 100 °C por 3 horas. Em solução de dimetilsulfoxido contendo 20% de solvente orgânico não ocorreu diminuição

da atividade da papaína. A exposição a agentes denaturantes potentes como solução de ácido tricloroacético a 10% ou de hidrocloguanidina 6M causou mudanças irreversíveis na estrutura molecular da papaína, expressas pela mudança drástica na rotação óptica específica e na baixa atividade enzimática.

Kang & Warner, 1974, pesquisaram o efeito do valor de pH sobre a atividade da papaína. As ações combinadas de pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima indicaram que ocorreu pequena redução de atividade em pH 5,0; alguma perda a pH 7,0 e diminuição significativa em valor de pH 9,0; especialmente à temperatura de 70°C (ASAKURA, 1982).

Velasco, 1993, avaliou a atividade de 4 formulações de Gel de papaína 0,4% (p/p). As temperaturas utilizadas para o armazenamento das formulações foram 5, 22 e 37 °C e o tempo de análise foi cerca de 2 meses. Observou-se perda de aproximadamente 30% da atividade proteolítica à temperatura de 5 °C, houve diminuição de aproximadamente 50%, para a temperatura de 22 °C, mas para a condição 37 °C ocorreu variação de 30% a 60% da redução da atividade proteolítica em cerca de 2 meses.

Velasco et al., 1999, verificaram a estabilidade da papaína em solução a 2% (p/v) em água. As soluções foram armazenadas em 2 condições diferentes: 5 e 22 °C. No primeira caso, após 52 horas de armazenamento a atividade enzimática foi reduzida a 64%, em relação ao inicial, enquanto no segundo, o mesmo comportamento ocorreu em apenas 6 horas.

Traversa, 2003, avaliou a estabilidade físico-química de formulações cosméticas contendo papaína em diferentes temperaturas. As formulações avaliadas foram: gel de Carbopol® 940 e um creme à base de cera emulsificante não iônica Polawax®, ambas contendo 0,8% (p/p) de papaína. As condições do teste foram 4, 25 e 40 °C. Os parâmetros avaliados envolveram, características organolépticas, cor, odor, e uniformidade, valores de pH e viscosidade. As maiores variações de resposta foram observadas quando as formulações foram armazenadas na temperatura de 40 °C, onde ocorreu alteração no odor, para as duas formulações na

primeira semana, na cor ao 32º dia para a formulação a base de Polawax®. No caso da emulsão ocorreram alterações de viscosidade em todas as condições, sendo que à temperatura de 40 °C houve variação de 48%.

2.2.4 - Ativadores e Inativadores

Ativação - A papaína é uma enzima que requer um grupo sulfidril livre para sua ação catalítica. A enzima nativa tem o grupo tiol bloqueado e neste estado, exibe baixa atividade. A ativação é acionada por um agente redutor moderado como a cisteína, sulfito, cianida, cianeto de hidrogênio, glutathione reduzida e tioglicolato. Como padrão de condições de ativação da papaína tem sido usado um meio contendo 0,005M de cisteína e 0,001-0,002M de EDTA (GRASSMANN, SCHOENEBECK & EIBELER, 1930; ARNON, 1970; MERCK INDEX, 1996; USP 25, 2002).

Inativação - A papaína é inativada, reversivelmente na presença de ar e baixa concentração de cisteína e também por peróxido de hidrogênio, acetato de iodo, sais de guanidina, ácidos concentrados e solução de uréia 6M, sendo acelerado por metais pesados, como o cádmio, zinco, mercúrio, ferro, chumbo e cobre. O aumento da temperatura também conduz à inativação da enzima (BALLS, LINEWEAVER, 1939; KIMMEL, & SMITH, 1957; ARNON, 1970; KILARA, SHAHANI & VWAGNER, 1977; MONETTA, 1988; RAJALAKSHMI & SUNDARAM, 1995; MERCK INDEX, 1996; USP 25, 2002).

Todas as substâncias que reagem com o grupo sulfidril atuam como inibidores da papaína. Por este motivo, o *p*-cloromercuriobenzoato, que forma um complexo estável com a enzima, pode ser utilizado para titulação do grupo -SH livre. O ácido iodoacético ou iodoacetamida pode também reagir com o grupo sulfidril livre da papaína, causando assim uma inativação irreversível (ARNON, 1970).

A reação da papaína com o clorometil cetona da fenilalanina e lisina provocou perda total de sua atividade. Reagentes aldeídos, como a

fenilidrazina e hidroxilamina entre outros, têm sido reportados como agentes inativadores da papaína (ARNON, 1970).

Além dos inibidores descritos, existem aqueles específicos da estrutura da papaína. O ácido carbobenzoxi-L-glutâmico é descrito como um inibidor quando o meio apresenta valor de pH entre 3,9 a 4,5. Outros contendo fenilalanina como um resíduo secundário do C-terminal, têm sido relatados pela literatura (ARNON, 1970).

2.2.5 - Especificidade enzimática

A papaína se destaca por sua especificidade relativa a proteínas e substratos de baixo peso molecular. Estudos com peptídeos sintéticos e derivados de destes contribuíram significativamente para o conhecimento da especificidade hidrolítica da enzima. Estas pesquisas demonstraram que a maioria das ligações peptídicas é hidrolisada com intensidade variada pela papaína, sendo as mais suscetíveis aquelas formadas por grupos α -amino substituído. Além disso, na hidrólise de ligações peptídicas, a papaína é tão efetiva quanto na atividade esterase ou tiol esterase e na transferase, sendo capaz de catalisar não somente a transamidação e a transpeptidação, mas também reações de transesterificação (KIMMEL & SMITH, 1954).

2.2.6 - Estabilização da papaína

Existem vários métodos para se realizar a imobilização de enzimas, considerando-se sua ação específica. Diversas tentativas têm sido realizadas para estabilizar a estrutura da papaína, visando sua utilização mais eficiente como: ligações covalentes, interação com íon metal imobilizado, insolubilização em glutaraldeído, imobilização em agarose, biopolímero, ligações covalentes com poliéter sulfona, acoplamento a uma sacarose polimérica, modificação com anidrido succínico, absorção simples em Celite®, absorção iônica em CM-cellulose (resina de troca iônica-catiônica) e QAE-Sephadex® (resina de troca iônica-aniônica) e ligação

cruzada covalente (ZHUANG & BUTTERFIEL, 1991; SIM et al., 2000; KHAPARDE & SINGHAL, 2001; AFAQ & IQBAL, 2001).

As propriedades e a atividade enzimática da papaína insolubilizada com glutaraldeído foram pesquisadas por Janse & Olson, 1969, mantendo-se inalterada na temperatura de 4 °C, por 5 semanas, sendo que esta resposta considerada satisfatória (JANSE & OLSON, 1969).

Kilara, Shahani & Wagner, 1977, imobilizaram papaína e lipase em agarose e obtiveram dados favoráveis de cinética enzimática. A enzima imobilizada apresentou estabilidade aumentada quando estocada em valor de pH 7,5 e na temperatura de 5 °C. A papaína imobilizada não foi afetada depois de repetidos tratamentos com solução de uréia (KILARA, SHAHANI & WAGNER, 1977).

A estabilidade da atividade proteolítica da papaína foi estudada em um sistema de fase micelar reversa e em meio aquoso. Nas micelas reversas, a atividade máxima foi de 80%, comparada com a da enzima em meio aquoso, porém foi verificado aumento no tempo de meia vida para a enzima modificada. Os resultados obtidos foram: tempo de meia vida para enzima em solução aquosa, 10 dias; e em meio da fase micelar reversa, o tempo foi de 24 dias (VICENT, BARROS & EMPIS, 1994).

Rajalakshmi & Sundaram, 1995, estudaram a estabilidade da papaína nativa e covalentemente modificada, acoplada a uma sacarose polimérica. A papaína nativa e a modificada foram submetidas a diferentes valores de temperaturas, por 30 minutos. Foi observado aumento na termo-estabilidade e maior resistência à inativação pela uréia na concentração de 8M. A papaína modificada apresentou valor de temperatura ótima 10 °C acima que a forma nativa, que foi de 65 °C (RAJALAKSHMI & SUNDARAM, 1995).

Um estudo sobre papaína imobilizada por ligação não covalente numa estrutura modificada de membranas de poliéter sulfona unida a um complexo biotina-avidina, foi realizado por Bhardwaj et al., 1996. A atividade da enzima modificada apresentou aumento na estabilidade quando comparada à forma

livre. O estudo de estabilidade foi realizado por um período de 19 dias, à temperatura de 0 °C (BHARDWAJ et al., 1996).

Zhang et al., 1996, utilizaram quatro tipos de suportes para a imobilização da papaína por diferentes métodos: absorção simples em Celite®, absorção iônica em CM-cellulose (uma resina de troca iônica-catiônica) e QAE-Sephadex® (resina de troca iônica-aniônica) e uma ligação cruzada covalente com albumina. Os efeitos diretos dos suportes nas propriedades catalíticas da enzima foram examinados verificando a influência da quantidade de água, valor de pH, resistência iônica e temperatura de reação, utilizando-se como substrato o dipeptídeo Boc-Phe-ValOMe em acetato etila sob condições termodinamicamente controladas. Os suportes com baixa hidrofobicidade demonstraram reter maior atividade catalítica da papaína que aqueles com elevada característica. A albumina foi considerada o melhor suporte para a papaína com rendimento de 94,5% do dipeptídeo (ZHANG et al., 1996).

SIM et al., estabilizaram a papaína e a lisozima para aplicação em produtos cosméticos. As enzimas foram conjugadas com uma solução de de SC-glucam™, um biopolímero produzido pelo fungo *Schizophyllum commune*. A estabilidade das enzimas conjugadas elevou significativamente, acima de 90% de sua atividade foi mantida, quando estocada à 45 °C, por 30 dias (SIM et al., 2000).

A estabilização da papaína em formulações cosméticas foi estuda por Kang et al., 2000. A enzima foi conjugada numa solução aquosa de SC-glucam™, incorporada a uma emulsão múltipla (água/óleo/água) e armazenada à temperatura de 45 °C. Após 3 meses, a enzima manteve 85% da atividade inicial (KANG et al., 2000).

Khaparde & Singhal, 2001, realizou um estudo sobre a papaína modificada para ser incorporada a uma formulação detergente. A papaína foi modificada com anidrido succínico, o que alterou seu valor de pH ótimo de 6,0 para 8,0 e a temperatura ótima ficou inalterada (KHAPARDE & SINGHAL, 2001).

Afaq & Iqbal, 2001 selecionaram um método para imobilização da papaína baseado na interação dos resíduos de histidina, cisteína e triptofano com um condutor íon metal imobilizado. A enzima imobilizada reteve 87% da atividade, quando submetida à temperatura de 65 °C por uma hora (AFAQ & IQBAL, 2001).

Edwin, Sharma & Jagannndham, 2002, observaram que em meio de pH ácido as moléculas de papaína foram suscetíveis à agregação e permaneceram em estado de glóbulo fundido. Na presença de concentrações reduzidas de hidrócloro guanidina, à temperatura ambiente os glóbulos tendem à agregação que pode ser evitada com a adição de solução de uréia 0,5M em meio de tampão, induzindo a estabilização da proteína. A agregação foi máxima em valor de pH 2,0; com de hidrócloro guanidina 1M. Este trabalho sugeriu que o efeito de estabilização da papaína pela uréia em concentrações reduzidas ocorreu por sua ação na estrutura da água, criando condições desfavoráveis para os grupos hidrofóbicos expostos que se direcionaram para o interior da molécula. A eliminação da água do interior da molécula da proteína induziu ao aumento no volume interior bem como elevou a estabilidade da proteína neste estado (EDWIN, SHARMA, JAGANNDHAM, 2002).

A estabilidade da papaína conjugada com polímeros de fosfolípidos, solúveis em água, foi estudada por Miyamoto, Watanabe, Ishihara, 2004. A enzima foi conjugada com polioxietileno com um grupo carboxila (PEO-COOH) e foi utilizada como controle. Os polímeros poli (2-metacrilóiloxietyl fosforilcolina) (PMPC-COOH) reagiram com os grupos amins terminais da enzima, resultando em moléculas com diferentes pesos, com aumento de 5 a 40K de PMPC-COOHs. A enzima modificada e a não modificada foram estocadas a 40 °C e a atividade monitorada durante um período de 28 dias, sendo que na forma não modificada esta foi reduzida em 7 dias, chegando a níveis próximos de 0% e a enzima conjugada com PEO-COOH apresentou diminuição de 50% após 7 dias e manteve-se estável por 28 dias. O peso molar das enzimas modificaas com de PMPC-COOHs determinou diferentes comportamentos da estabilidade da atividade enzimática, sendo que esta foi

mantida durante 4 semanas para as amostras modificadas com P-PMPC 5 e 40K (MIYAMOTO, WATANABE & ISHIHARA, 2004a).

Posteriormente, Miyamoto, Watanabe & Ishihara, 2004, realizaram um estudo de estabilidade com a papaína modificada com PMPC-COOH, em diferentes temperaturas. Foram analisadas duas amostras que apresentaram diminuição de 41,5% e 34,1% da atividade após a modificação. À temperatura de 40 °C a atividade de ambas foi mantida entre 75% e 85% durante o período de 28 dias, embora para a temperatura de 25°C ocorreu sua diminuição, chegando próximo de 50% nos primeiros 7 dias, seguidos de uma elevação gradual, até 150% do valor inicial aos 28 dias. Este fenômeno foi explicado pela formação de agregados da papaína conjugada, à 25 °C, que se dissociam com o passar do tempo (MIYAMOTO, ISHIHARA & WATANABE 2004b).

2.2.7 - Reações adversas

Enzimas proteolíticas, como a papaína, são conhecidas por oferecem riscos de doenças respiratórias, principalmente nos processos produtivos onde estão envolvidas, pois estas substâncias podem ser liberadas para o ambiente e inaladas pelos trabalhadores (TANG, ROWELL & CUMMING, 1997).

Gross et al., 1965 observaram os efeitos da papaína em ratos tratados com 3% desta enzima, em pó, por inalação. Os animais apresentaram dispnéia e tosse durante as primeiras 48 horas após o tratamento, ocorrendo também perda de peso entre 10 a 15%. Este quadro foi recuperado após 2 semanas e nenhum animal morreu (GROSS et al. 1965).

Chambers et al., 1998, verificaram que a papaína ativa induziu resposta IgG1, em ratos, típica de reação alérgica. O experimento foi realizado para verificação da desensibilização da papaína ativa, utilizando papaína inativa. Foram utilizados 48 ratos divididos em 4 grupos de 12 animais. Os grupos A e B foram imunizados com 1,0 µg de papaína ativa e

os grupos C e D com papaína inativa. Aos 14 dias, foram injetados na cavidade peritoneal de 6 dos animais de cada grupo, 1,0 µg de papaína ativa (grupo A e C) e, 1,0 µg de papaína inativa (grupo B e D). Os outros animais passaram pelo mesmo processo aos 28 dias. Houve uma resposta diferenciada para os animais imunizados com papaína ativa comparada aos imunizados com papaína inativa, para o primeiro caso a resposta de IgG1 foi 3 vezes superior que o segundo (CHAMBERS et al., 1998).

Existem relatos de reação alérgica por contato da enzima com a pele. Estes casos estão relacionados com exposição ocupacional.

Soto-Mera et al., 2000, relataram o caso de duas mulheres que trabalharam em salão de beleza e usavam comprimidos de papaína dissolvidos em água para a retirada de adesivos. No primeiro caso, a profissional, trabalhou por 5 anos e desenvolveu progressivamente urticária de contato, rinoconjuntivite e asma, após interromper o uso da papaína, não ocorreram mais os sintomas descritos. No segundo caso a profissional trabalhou por 10 anos apresentou rinite, asma e urticária de contato. Similarmente ao primeiro caso, quando o uso foi interrompido não ocorreram mais os sintomas. Ambas nunca ingeriram mamão papaia e nunca tiveram problemas com abacaxi, carne, látex e creme dental. A primeira nunca usou lentes de contato e não apresentava os sintomas com o consumo de kiwi e cerveja. A segunda usava lentes de contato, nunca consumiu cerveja e apresentava inchaço na boca quando ingeria kiwi. Foram realizados testes para verificar a reação com papaia, papaína, bromelina, abacaxi, kiwi e látex. Os resultados dos testes com a pele e de IgE foram positivos para papaia e papaína para as duas e positivo para kiwi para a segunda (SOTO-MERA et al., 2000).

Focke et al., 2003, estudaram a relação imunológica com a pele para o látex e as frutas figo e outras como: kiwi, banana, abacaxi, abacate, amora e papaia. O número de pacientes testados para o mamão papaia foi 5, sendo que todos apresentavam algum tipo de reação ao figo o resultado foi positivo para 3 deles O resultado do teste com o kiwi foi positivo para 4 pacientes; para a banana e o abacaxi o resultado foi positivo para 2; para o

abacate 3 e para a amora 1, em um total de 6 pacientes testados (FÖCKE et al., 2003).

2.2.8 - Determinação da atividade de enzimas proteolíticas

A necessidade de metodologias específicas, sensíveis e rápidas para monitorar os níveis de enzimas proteolíticas tem estimulado o desenvolvimento de inúmeros métodos analíticos com diferentes vantagens sobre os clássicos descritos por Anson e Kunitz. Estes métodos envolviam o substrato hemoglobina denaturada pela uréia na presença do quelante de metais, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 0,001M; o ativador enzimático, cisteína 0,005 M; cloreto de sódio (NaCl) 0,1M, para evitar modificações na atividade enzimática por conferir força iônica adequada ao meio, valor de pH da solução de 7,0 e a temperatura de reação de 39 °C (LAUWERS & RUYSEN, 1963; EDWARDS, TOWNSHEND & STODDART, 1995).

Os métodos analíticos empregados na determinação da atividade das enzimas proteolíticas podem ser geralmente divididos, em duas categorias: métodos enzimáticos e imunológicos, de acordo com o mecanismo envolvido na reação, com variáveis dependentes da metodologia analítica empregada. O primeiro depende da hidrólise quantitativa de determinada proteína ou substrato peptídico por uma enzima a ser doseada, baseando-se na formação do produto da reação, de baixo peso molecular, formado durante o processo. No segundo caso, temos a interação entre a enzima com um antígeno ou anticorpo que possui natureza protéica variável. Em ambas categorias, existem muitas variáveis, dependendo dos métodos de detecção empregados (ARNON, 1970; KIRSCHKE & WIEDERANDERS, 1999).

A atividade enzimática da papaína pode ser medida pela determinação da velocidade de digestão de proteínas ou da hidrólise de substratos sintéticos, como ésteres ou amidas derivadas de aminoácidos de baixa massa molecular. Nesta metodologia substratos sintéticos são indispensáveis para medir a cinética da reação, testar inibidores enzimáticos

e analisar os peptídeos. As reações de hidrólise enzimática liberam resíduos cromóforos ou cromogênicos, que podem ser determinados por métodos simples como o espectrofotométrico (KIRSCHKE & WIEDERANDERS, 1999).

Muitos substratos sintéticos contendo grupos cromogênicos e fluorogênicos foram pesquisados, incluindo o β -naphtilamido, 7-amino-4-metilcoumarina, 4-nitroanilida, tioesterpeptídeos e 4-aminoftalhidrazida (isoluminol). Vários métodos para marcar a proteína nativa (sem modificação química) com grupos fluorescentes como a fluoresceína e o 2-metoxi-2,4difenílfuran-3-one foram descritos (ROWELL; CUMMING & NITESCU, 1995).

Kanaoka & Takahashi, 1977, estudaram o método fluorimétrico de elevada sensibilidade, utilizando o substrato Benzoil-L-arginina-4-metilcoumarina-7amida, tendo como seu produto hidrolítico o 7-amino-4-metilcoumarina que é altamente fluorescente, podendo ser utilizado nas determinações da tripsina e da papaína. A metodologia envolveu excitação da solução reagente a 380nm e a emissão a 440nm. A concentração do substrato foi de 0,02 a 0,2mM em meio de tampão Tris-HCl, pH 7,5 contendo 5mM de l-cisteína, 2mM de E.D.T.A e 1% (v/v) de DMSO. A linearidade da fluorescência versus tempo de incubação foi satisfatória e a razão da hidrólise foi proporcional à concentração da enzima, sendo entre 30-600ng/mL. A sensibilidade do método foi 100 vezes superior comparada com a do substrato cromogênico benzoil-L-arginina- ρ -nitroanilida (KANAOKA & TAKAHASHI, 1977).

O L-pirolutamil-L-fenilalanina-L-leucina- ρ -nitroanilida, substrato cromogênico para tiol proteases, foi sintetizado por Filippova et al., em 1984. A papaína, a ficina e a bromelina hidrolisaram esse substrato e liberaram a ρ -nitroanilina, quantificada espectrofotometricamente, em comprimento de onda de 410 nm (FILIPPOVA, et al., 1984).

Twining, 1984, desenvolveu um método sensível, reprodutível e de baixo custo, utilizando a caseína ligada ao isotiocianato de fluoresceína. A proteína foi incubada com o substrato na temperatura de 37 °C, por 24 horas

e a fluorescência foi medida a cada 5 minutos. A reação foi interrompida com uma solução de ácido tricloroacético e a proteína insolúvel foi sedimentada por centrifugação, a solução sobrenadante foi diluída em tampão tris pH 8,5 e a fluorescência foi determinada usando um comprimento de onda de excitação de 365nm ou 460nm e de emissão de 525nm. De acordo com o autor, a caseína funcionou como substrato adequado para muitas proteases, porque é uma proteína solúvel similar aos substratos fisiológicos, facilmente preparada, estável no armazenamento e de baixo custo. As proteínas testadas foram a quimotripsina, elastase, subtilisina e a termolisina. A atividade dessas enzimas pôde ser quantificada na ordem de nanogramas (TWINING, 1984).

Um método sensível para detecção de enzimas proteolíticas foi descrito por Robertson, Kwan-Lim & Maizels, 1988. Foram utilizados microplacas e gelatina marcada com radio-iodina (substrato), o tempo de incubação foi de 16 horas na temperatura de 37 °C. Ao final da reação, a solução sobrenadante foi aspirada, individualmente de cada poço, e foi realizada a leitura em um aparelho contador de radiação gama. Foi possível a detecção de 1ng de papaína por mL (ROBERTSON, KWAN-LIM & MAIZELS, 1988).

Lindhal et al., 1988, utilizaram o substrato Cabobenzoxi-L-fenilalanina-L-arginina-4-metilcumarina-7amida e para inibir a hidrólise o monocloroacetato de sódio 0,1M. A reação ocorreu em meio de pH 4,3. O produto formado foi quantificado em fluorímetro com excitação a 370nm e emissão 440 nm (LINDHAL et al., 1988).

Um sensor holográfico foi testado por Millington e colaboradores, em 1995. O uso de elementos holográficos como sensores biológicos foi sugerido como artifício para monitorar a atividade de proteases. Uma resposta óptica quantitativa de um elemento holográfico preparado em gelatina foi utilizado para um intervalo de concentração de tripsina abaixo de 25nM (aproximadamente 0,6µg/ mL), com resposta em 20 minutos, podendo ser considerado um período de tempo reduzido. A resposta holográfica foi fornecida pela mudança no comprimento de onda na luminosidade. Para a

construção do holograma foi usado: filme, Agfa® 8E75HD, incubado em solução tampão de borato por 12 horas e a reflexão do holograma foi construído sob o tampão. O espectro das amostras, com diferentes concentrações foram analisados de 1 em 1 minuto, por 30 minutos, avaliando-se as mudanças na reflectividade (MILLINGTON et al., 1995).

Tang, Rowell & Cumming, 1997, confirmaram a importância dos métodos enzimáticos com detecção colorimétrica de um produto formado para a indústria, também sendo importantes para a pesquisa científica. Quando se utiliza um substrato como o N,N-dimetilcaseína (DMC) existe a necessidade de uma reação secundária após a digestão enzimática. Outros substratos de peptídeos sintéticos que incluem a p-nitroanilida éster e a p-nitrofenil acopladas a peptídeos podem também ser empregados. Como desvantagem, os autores afirmaram que estes métodos não foram sensíveis com limites de detecção na ordem de μg e foram lentos, requerendo tempo prolongado de incubação da enzima com o substrato (TANG, ROWELL & CUMMING, 1997).

Outro método relatado, o fluorimétrico tradicional que utilizou o isotiocianato de fluoresceína ligado à caseína foi citado como sendo relativamente sensível, porém, exigiu duas etapas: incubação da enzima com o substrato e separação dos derivados da caseína não digeridos. Os métodos com substratos marcados com radio apresentaram problemas similares (TANG, ROWELL & CUMMING, 1997).

Buroker-Kilgore & Wang, 1993, pesquisaram um método espectrofotométrico para medir a atividade da calpaína e outras proteinases, como a papaína, utilizando o substrato Coomassie Brilliant Blue G-250-Based. Este envolveu a incubação com o substrato caseína, seguido da retirada de uma alíquota do corante Coomasie Brilliant blue G-250 que foi adicionada e interagiu somente com a proteína e não com os produtos proteolíticos (pequenos peptídeos ou aminoácidos). Diferente do método existente da caseinólise, a metodologia não exigiu a separação de produtos e a medida foi realizada no comprimento de onda de 595nm. O autor afirmou que o método apresentou maior sensibilidade que os colorimétricos que

empregam substratos de proteínas conjugadas (BUROKER-KILGORE & WANG, 1993).

Gauthier et al., 1993, sintetizaram um novo substrato para a papaína baseado na seqüência do sítio inibitório da cistatina. Este método foi baseado na seqüência conservada em todos os membros da família da cistatina que participou da inibição de cisteína proteinase. Este substrato, O-aminobenzoil (Abz)-QVWAGA-etilenodiamino-2-4-dinitrofenil (QVWAGA - seqüência da cistatina usada) foi considerado sensível para a papaína. A reação ocorreu a 30 °C, em meio de tampão fosfato pH 6,8. A atividade enzimática foi medida por espectrofluorímetro, a 320nm de excitação e 420nm de emissão (GAUTHIER, et al 1993).

Dois tipos de métodos rápidos para enzimas proteolíticas foram relatados por Tang, Rowell & Cumming em 1996 e 1997, ambos empregaram substratos de proteína marcados com flúor, como a albumina bovina sérica. No primeiro, foi empregado um bioreator com um substrato de proteína, marcado com flúor, imobilizada numa fase sólida. Este bioreator foi exposto a solução de enzima proteolítica liberando fragmentos de peptídeos-flúor que foram detectados fluorimetricamente, com tempo de resposta de 3,8 minutos, para a concentração de 5ng de subtilisina. O segundo método, utilizou uma proteína marcada com dois reagentes fluorescentes o *lúcifer yellow VS* (LYV) e o tetrametilrodamina (TMR) com transferência de energia fluorescente característica. Esta metodologia baseou-se na detecção da redução da transferência da energia, onde a subtilisina hidrolisou o substrato marcado, liberando o marcador fluorescente na solução e diminuindo a transferência de energia fluorescente nas moléculas separadas, resultando no aumento da intensidade emissão da fluorescência do LYV e diminuição do TMR, proporcional a concentração da enzima usada. Nos dois casos não apresentaram apenas a vantagem de ser métodos diretos como também foram sensíveis e rápidos (TANG, ROWELL & CUMMING, 1996 e 1997).

Novos métodos de detecção têm sido relatados incluindo os baseados na quimioluminescência, Edwards & Townshed, 1995, estudaram a determinação de proteases por quimioluminescência. Os pesquisadores

desenvolveram um sistema de injeção de fluxo que utilizou uma coluna de politetrafluoretileno para a determinação de proteases, as enzimas testadas foram a α -chymotripsina e a tripsina. O substrato sintético utilizado foi o Alalina-alanina-phenilalanina-isoluminol-HBr (AAPIL-HBr), que foi imobilizado na coluna e a solução amostra foi injetada, utilizando-se uma bomba peristáltica, misturada a uma solução de Co^{+2} e mantida a 30 °C. Na sequência, foi adicionado peróxido de hidrogênio para sua detecção e a quimioluminescência foi medida pela emissão de luz resultante da reação química. A principal vantagem em se utilizar substrato imobilizado não ligado é a utilização do sistema de fluxo. A proteína passou pela coluna e por hidrólise liberou o isoluminol imobilizado (EDWARDS, TOWNSHEND & STODDART, 1995).

Koritas & Atkinson, 1995, desenvolveram um método para detecção de enzimas proteolíticas na ordem de nanogramas. Foi baseado no emprego de uma fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina utilizada para detectar um substrato de proteína biotinilada, previamente fixada em uma fase sólida, que formou um complexo com gelatina adsorvida em microplacas. A medida da atividade da enzima estava envolvida na perda de biotina, resultado da ação proteolítica no complexo gelatina-biotina. O substrato não digerido pela proteína foi doseado com estreptavidina fosfatase alcalina. Os autores utilizaram este método para papaína, pepsina, termolisina e a tripsina, que hidrolisaram o substrato biotinilado em graus variados (KORITAS & ATKINSON, 1995).

Schade et al., 1996, descreveram um método utilizando fluorescência polarizada. A técnica de polarização foi baseada no princípio que um composto fluorescentemente marcado, quando excitado por uma luz polarizada plana, emitirá luz polarizada fluorescente. A polarização emitida será diferente daquela de excitação devido a molécula fluorescente estar em movimento durante o tempo no qual ela passa da excitação, para a emissão. A molécula marcada de menor massa terá um movimento maior e emitirá valores reduzidos de polarização fluorescente. No experimento foi utilizada a caseína marcada, em solução, e seu valor de polarização fluorescente foi

relativamente alto. Após a introdução da proteinase, a polarização fluorescente diminui com o tempo devido a formação de moléculas menores que se movimentaram com velocidade maior e a luz polarizada plana foi despolarizada, refletindo na diminuição da atividade proteolítica. O novo substrato fluorescente utilizado foi o BODIPY- α -caseína (4,4 difluor- 5,7-dimetil-4-boro-3a, 4a - diaza -s- indacene -3- ácido propiônico, succinimidil éster) designado para estudos de fluorescência polarizada, para a medida de atividade proteolítica em amplo intervalo de pH (2 a 11). Esse método foi simples, rápido e reprodutível e permitiu detectar 1 mU de papaína em meio de pH 6,0 (SCHADE et al., 1996).

Bock et al., 1998, utilizaram como substrato a FITC-caseína (kit do Sigma) em valor de pH 6,0, utilizando microplacas. Para interromper a reação foi adicionado ácido tricloroacético a 5% e a solução resultante foi centrifugada para separação dos peptídeos solúveis. A leitura foi realizada em um leitor de fluorescência de microplacas, para excitação foi utilizado 485/20nm e para emissão 530/25nm (BOCK ET AL., 1998).

Em um estudo sobre a afinidade e cinética da inibição de cisteína proteinase pelo contato de cistatina C recombinante bovino, realizado por OLSSON, EK & BJORK; 1999, a atividade da enzima foi medida com a utilização do substrato carbobenzoil-L-fenilalanina-L-arginina-4-metilcoumarina-7-amido, em microplacas. O equipamento usado para detecção da fluorescência foi o Elisa fluorímetro Fluoroscanner II-Labsystems e o comprimento de onda de excitação foi de 355nm, e de emissão 460 nm (OLSSON, EK & BJORK, 1999).

Muller & Bordusa, 2000, apresentaram um método de doseamento da atividade de proteinases baseado no uso de um pequeno substrato sintético, o tert-butiloxi-carbonil-Glu-p-guanidinafenil éster), contendo apenas um aminoácido. A hidrólise deste substrato foi detectada pela mudança da absorção. A enzima foi encubada com o mesmo na temperatura ambiente e após 1 minuto, efetuou-se a leitura. A absorção máxima foi em comprimento de onda de 470nm e a concentração mínima de papaína detectada foi 0,13U (MULLER & BORDUSA, 2000).

2.3 - ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS

A definição de produto cosmético pela legislação brasileira é a seguinte:

“São preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar (pelos e anexos), unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o 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” (BRASIL-RDC 79, 2000).

Os produtos cosméticos podem sofrer alterações físicas e químicas, causadas por diferentes fatores, se eles forem fatores externos são conhecidos como fatores extrínsecos, se forem inerentes à formulação são conhecidos como intrínsecos.

- Fatores extrínsecos: tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração.
- Fatores intrínsecos: incompatibilidade física e química, como valor de pH, reações de óxido-redução e hidrólise, interações entre os componentes da formulação e o material de acondicionamento.

As alterações normalmente observadas nas formulações envolvem: aspecto, uniformidade, cor, odor e sabor; valores de pH; viscosidade; condutividade; contaminação microbiológica e teor de princípio ativo (BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

As formulações que têm como base uma emulsão podem apresentar sinais de instabilidade como: cremeação, coalescência, floculação e separação de fases (ROLAND, et al., 2003).

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido. Para isso, são realizados Testes de Estabilidade Preliminar e Acelerado, conduzidos em condições de temperatura, umidade e luminosidade que favoreçam a degradação do produto. Estas etapas fornecem ao formulador informações para selecionar as formulações de melhor desempenho que serão submetidas ao Teste de Estabilidade Normal onde as preparações são avaliadas por um período de 90 a 120 dias e as temperaturas recomendadas são (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; MORETTO, 1999; DREGER, 2000; RIEGER, 2000; MAIA, 2002; RIBEIRO, 2002; BABY et al., 2004; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004):

- Ambiente: $20 \text{ a } 25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Elevadas: $37, 40, 45 \text{ e } 50 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Baixas: $-5, 5 \text{ e } 10 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Os parâmetros normalmente avaliados nos **Testes de Estabilidade** são: características organolépticas, (aspecto, cor, odor e sabor) uniformidade, valores de pH, de viscosidade, de condutividade, contaminação microbiológica, ponto de ruptura, índice de saponificação, teor alcoólico, de princípio ativo, dentre outros (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; MORETTO, 1999; DREGER, 2000; RIEGER, 2000; MAIA, 2002; BABY et al., 2004; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

3- OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- ♦ Desenvolver formulações cosméticas do tipo emulsão não-iônica óleo em água (O/A) contendo papaína não modificada e modificada;
- ♦ Validar metodologia analítica, para determinação da atividade enzimática da papaína incorporada em emulsões, utilizando o método espectrofluorimétrico e microplacas;
- ♦ Avaliar a estabilidade física, físico-química e química da papaína não modificada e modificada, veiculada em formulações cosméticas do tipo gel hidrofílico (preparação de referência) e emulsões.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Reagentes

- Ácido acético Merck, grau de pureza analítico;
- Ácido clorídrico fumegante 37% Merck, grau de pureza analítico;
- Água ultra-pura MilliQ®;
- Cloridrato de Carbobenzoxi-L-fenilalanina-L-argina-4 metilcumarina- 7 amido (N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA) – Sigma, grau de pureza analítico;
- Cloridrato de cisteína monohidratada Merck, grau de pureza analítico;
- Dimetilsulfoxido Synth, grau de pureza analítico;
- Etilenodiaminotetracetato de sódio (E.D.T.A.) Merck, grau de pureza analítico;
- Fosfato de sódio dibásico anidro Synth, grau de pureza analítico;
- Hidróxido de sódio, Merck, grau de pureza analítico;
- Papaína Wallerstein 450 MS, grau de pureza farmacêutico.

4.1.2 - Padrão de referência

- Papaína, substância química de referência, Merck teor de 30000USP/mg.

4.1.3 - Equipamentos

- Agitador mecânico tipo “mixer” – Walitta®;
- Balança analítica – Sartorius® modelo BL210S;
- Banho de ultrassom – Unique®, modelo Ultrasonic Cleaner;
- Banho-maria digital - Nova Ética®, modelo 500D;
- Centrífuga - Donner®, modelo CD100;
- Condutivímetro Digimed®, modelo DM31;
- Destilador de água - Fabbe®, modelo 106;

- Espectrofluorímetro de placas – Packard Fluorocount™ ; modelo AF10.000 e BF10.000 para fonte de xenônio;
- Estufa – Fanem, modelo 902 CB;
- Freezer – Consul, modelo Slim 200;
- Geladeira – Bosch, modelo ecoplus 370;
- Potenciômetro- Hanna®, modelo 8417;
- Pipeta automática monocanal 10 a 100µL - Brand®, modelo Transferpette;
- Pipeta automática monocanal 100 a 1000µL - Labsystems®, modelo Finnpipette;
- Placas de ELISA, 96 poços, propileno, natural, não estéril;
- Purificador de água - Millipore®, modelo MilliQ Academic;
- Termômetro com graduação de 0 a 100 °C;
- Viscosímetro – Fungilab S.A. modelo Visco Star-R, agulhas TR9, TR 10 e TR11.

4.1.4 - Outros materiais

- Potes de polietileno branco opaco, capacidade de 50g;
- Placas de Petri.

4.1.5 - Matérias-primas

Grau de pureza farmacêutico

- Adipato de dibutila, Cognis;
- Aristoflex® AVC, copolímero do ácido sulfônico acriloldimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado, Clariant;
- Carbopol® 940, polímero carboxivinílico, BF – Goodrich;
- Carbopol ETD 2020, copolímero do ácido poliacrílico, BF – Goodrich;
- Cetiol® V, oleato de decila, Ionquímica;

- Cremerol® HMG, glicerídeos hidroxilados do leite, Ionquímica;
- Essência, Givaudan;
- Lactato de miristila, Croda;
- Natrosol® 250 HH, hidroxietilcelulose, Galena;
- Óleo mineral, Mapric;
- Palmitato de isopropila, Croda;
- Papaína Wallerstein 450 MS, grau de pureza farmacêutico;
- Papaína Merck® 30.000 USP modificada;
- Pemulen® TR1, polímero cruzado acrilato C10-30 alquil-acrilado, BF – Goodrich;
- Phenoben®, fenoxietanol e parabenos, Ionquímica;
- Propilenoglicol, Cosmotec;
- Silicone DC® 5225, ciclopentasiloxano e PEG/PPG –18/18, Dow Corning;
- Uniox® C, cera auto-emulsionante não iônica, Chemyunion.

ADIPATO DE DIBUTILA

CAS N°. 105-99-7

Fórmula molecular: C₁₄H₂₆O₄

Definição: adipato de butila é o diéster do álcool butílico e do ácido adipato e corresponde a seguinte fórmula estrutural:

Função química: éster

Funções nas formulações cosméticas: agente condicionador da pele, agente plastificante e solvente (BRANDÃO, 2000; WENNINGER, CANTERBURY & MCEWEN, 2000).

ARISTOFLEX® AVC

Definição: co-polímero do ácido sulfônico acriloldimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado.

Fórmula estrutural:

Características: polímero sintético, pré-neutralizado. Aparência (20 °C): pó branco; teor de sólidos 92,0 %; pH 4,0 - 6,0 (solução 1% p/v em água); viscosidade 48.000 - 65.000 mPas (solução 1% p/v em água).

Funções em formulações cosméticas: agente formador de gel em sistemas aquosos e como espessante em emulsões óleo em água. Compatível com solventes orgânicos (etanol, acetona); estável a radiação ultra violeta e à alta tensão de cisalhamento (CLARIANT, 2001).

CARBOPOL® 940

CAS N^o. 76050-42-5

Definição: polímero sintético do ácido poliacrílico

Função química: polímero sintético

Características: pó branco de odor levemente acético

Funções em formulações cosméticas: agente regulador da viscosidade e estabilizador de emulsão.

Usos em produtos cosméticos: gel e creme para o rosto, corpo e mãos; preparações para cabelos e maquiagem (CTFA, 1988; MERCK INDEX, 1996; BRANDÃO, 2000; WENNINGER, CANTERBERY & MCEWEN, 2000; HOUSEHOLD, 2005; NOVEON, 2004)

CARBOPOL® ETD 2020

CAS N^o. 176429-87-1

Definição: copolímero ácido de poliacrílico

Funções em formulações cosméticas: espessante, confere boa capacidade de escoamento e aparência brilhante nas formulações cosméticas. Eleva a estabilidade da formulações quando expostas ao congelamento (NOVEON, 2004).

CETIOL® V

Denominação química: oleato de decila

CAS N^o. 3687-46-5

Fórmula molecular: C₂₈H₅₄O₂

Definição: oleato de decila é o éster do álcool da decila e do ácido oleico e corresponde à fórmula estrutural:

Função química: éster de ácidos graxos

Funções nas formulações cosméticas: emoliente de oleosidade média, melhora o espalhamento e atua como: sobreengordurante da pele, solubilizante de princípios ativos nas preparações cosméticas e farmacêuticas e agente condicionador da pele.

Uso em produtos cosméticos: preparações para mãos, corpo, face e pescoço; maquiagem para os olhos; hidratante; máscara facial; loção de limpeza e condicionador de cabelos (CTFA, 1988; BRANDÃO, 2000; WENNINGER, CANTERBURY & MCEWEN, 2000).

CREMEROL® HMG

Denominação: glicerídeos hidroxilados do leite

Função química: produto biológico

Funções nas formulações cosméticas: emoliente, hidratante e umectante nas emulsões água em óleo e óleo em água. Eleva a estabilidade das emulsões, atuando como co-emulsionante.

Usos em produtos cosméticos: creme e loção para mãos, rosto e corpo (CTFA, 1988; BRANDÃO, 2000; IONQUÍMICA, 2002).

EDTA

CAS N°: 60-00-4

Fórmula molecular: $C_{10}H_{16}N_2O_8$

Definição: diamina substituída que corresponde a fórmula estrutural:

Função química: aminoácidos substituídos do grupo alquil

Peso molecular: 292,25u; C 41.10 %; H 5,52 %; N 9.59 % e O 43.80 %

Solúvel em água a 25°C. O ácido livre é menos estável que a forma sal, e tende a descarboxilar quando aquecido a temperaturas igual ou superior a 150°C. Estável quando armazenado e submetido à ebulição em solventes aquosos.

Função nas formulações cosméticas: agente quelante

Usos em produtos cosméticos: produto de limpeza para o corpo (creme, loção e solução); cuidados da pele, mãos e corpo; creme hidratante;

fotoprotetor em gel, creme e solução e produto de limpeza pessoal. Outro uso: antioxidante em alimentos (CTFA, 1988; BRANDÃO, 2000).

HIDROXIETILCELULOSE

CAS N^o. 9004-62-0

Definição: polímero não iônico derivado de celulose, solúvel em água e estável em valores de pH ácido.

Funções nas formulações cosméticas: agente regulador da viscosidade, estabilizador de emulsão, espessante (com eficiência em formulações com laurilsulfato de sódio); formador de filme e ligante.

Uso em produtos cosméticos: indicado para a incorporação de substâncias ativas que conduzam a uma redução do valor de pH final da formulação, como por exemplo, o ácido glicólico e ácido ascórbico; condicionador de cabelos; xampu; sabonete líquido; loção para mão e corpo e fotoprotetor (BRANDÃO, 2000; DEG, 2004).

LACTATO DE MIRISTILA

CAS N^o. 1323-03-1

Fórmula molecular: C₁₇H₃₄O₃

Definição: é um éster líquido viscoso, do álcool miristílico e ácido láctico, com a seguinte fórmula estrutural:

Função química: éster

Funções nas formulações cosméticas: como derivado de um alfa-hidróxiácido, o ácido láctico, possui propriedades de umectação elevada sem

causar esfoliação na pele, proporcionando toque suave e sedoso. Também promove brilho e melhor espalhamento das emulsões sobre a pele, podendo ainda ser adicionado a produtos hidroalcoólicos promovendo lubricidade não gordurosa.

Usos em produtos cosméticos: devido sua capacidade de hidratação é indicado para todos tipos de formulações cosméticas e também farmacêuticas destinadas ao tratamento facial, corporal e capilar (CTFA, 1988; BRANDÃO, 2000; WENNINGER, CANTERBERY & MCEWEN, 2000; CHEMYUNION, 2003).

ÓLEO MINERAL

CAS N^o: 8012-95-1, 8042-47-5, 8020-83-5

Definição: mistura líquida de hidrocarbonetos obtidos do petróleo.

Função química: hidrocarbonetos

Características: líquido incolor e oleoso, praticamente insípido e inodoro mesmo quando aquecido. Densidade relativa entre 0,83 – 0,905 e tensão superficial a 25 °C é cerca de 35 dinas/cm. Insolúvel em água e álcool e solúvel em benzeno, clorofórmio, éter e óleos.

Funções nas formulações cosméticas: solvente de fragrância, agente condicionador dos cabelos e da pele, promovendo emoliência e protetor da pele.

Usos em produtos cosméticos: emulsão para mãos, corpo, face e pescoço; óleos de banho; emulsão fotoprotetora e maquiagem (CTFA, 1988; MERCK INDEX, 1996; BRANDÃO, 2000; WENNINGER, CANTERBERY & MCEWEN, 2000).

PALMITATO DE ISOPROPILA

CAS N^o. 142-91-6

Fórmula molecular: C₁₉H₃₈O₂

Definição: éster do álcool isopropílico e ácido palmítico, e corresponde à fórmula estrutural:

Função química: éster

Funções nas formulações cosméticas: ligante; solvente de fragrância; agente condicionador da pele, conferindo emoliência e agente condicionante para os cabelos.

Usos em produtos cosméticos: batom; hidratante para mãos e corpo, face e pescoço; maquilagem; limpeza da pele; óleo de banho; loção pós-barba; perfume; talco; xampu e condicionador; máscara facial; removedor de maquilagem; sabonete e detergente (CTFA, 1988 BRANDÃO, 2000; WENNINGER, CANTERBERY & MCEWEN, 2000; COGNIS, 2002; IONQUÍMICA, 2002).

PEMULEN[®] TR1

Definição: polímero de ácidos poliacrílicos de peso molecular elevado. Possuem uma pequena parte da molécula com afinidade pela fase oleosa da preparação (lipofílica), e a maior parte com afinidade pela fase aquosa (hidrofílica).

Função química: polímero

Funções nas formulações cosméticas: agente emulsificante primário em emulsões tipo óleo em água. A porção lipofílica de sua estrutura é adsorvida na interface óleo/água, e a porção hidrofílica entumece na água, formando uma rede de gel em torno das gotas de óleo, fornecendo estabilidade elevada para emulsões com grande variedade de óleos incorporados.

É um emulsificante polimérico versátil que pode emulsificar até 30% de óleo na formulação, dentro de um intervalo de pH de 4 a 5,5 e até 20% de óleo com variação de pH de 3 a 11 (NOVEON, 2004).

PHENOBEN®

Denominação química: fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno

Funções nas formulações cosméticas: agente conservante de amplo espectro de ação. Utilizado na conservação de produtos cosméticos e farmacêuticos de uso tópico.

Fenoxietanol

CAS N^o. 122-99-6

Fórmula molecular: $C_8H_{10}O_2$

Definição: éter alcoólico aromático

Função química: éter, álcool

Funções: antimicrobiano, componente de fragrância

Metilparabeno

CAS N^o. 99-76-3

Fórmula molecular: $C_8H_8O_3$

Definição: éster do álcool metílico e do ácido p-hidroxibenzóico

Função química: éster, fenol

Funções: antimicrobiano

Etilparabeno

CAS N^o. 120-47-8

Fórmula molecular: $C_9H_{10}O_3$

Definição: éster do álcool etílico e do ácido p-hidroxibenzóico

Função química: éster, fenol

Funções: antimicrobiano

Propilparabeno

CAS N^o. 94-13-3

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂O₃

Definição: éster do álcool n-propílico e do ácido p-hidroxibenzóico

Função química: éster, fenol

Funções: antimicrobiano e componente de fragrância

Butilparabeno

CAS N^o. 94-26-8

Fórmula molecular: C₁₁H₁₄O₃

Definição: éster do álcool butílico e do ácido p-hidroxibenzóico

Função química: éster, fenol

Funções: antimicrobiano

(BRANDÃO, 2000; WENNINGER, CANTERBURY & MCEWEN, 2000; IONQUÍMICA, 2002).

PROPILENOGLICOL

Denominação química: 1,2- propanodiol; metilglicol

CAS N^o. 57-55-6

Fórmula molecular: C₃H₈O₂

Definição: álcool alifático que corresponde a fórmula estrutural:

Função química: álcool

Funções nas formulações cosméticas: umectante; hidratante para a pele; solvente; agente de redução de viscosidade.

Usos em produtos cosméticos: produtos cosméticos para mãos, corpo, face e pescoço; cuidado da pele; limpeza da pele (creme, loção e solução); máscara em pasta e maquiagem.

Mesmo para o uso interno, o propilenoglicol é seguro para uso. Miscível em água, acetona e clorofórmio, mas imiscível com óleos estáveis. Sob condições normais, o propilenoglicol é estável, mas em temperaturas elevadas tende a oxidar, dando origem a produtos como ácido láctico, ácido pirúvico e ácido acético. LD50 oral em ratos: 25ml/kg

Outros usos: como anticongelante não tóxico em cervejarias e leiterias. Substituto para o etilenoglicol e do glicerol. Na produção de resina sintética. Como inibidor de fermentação e do crescimento de bolor em alimentos. (CTFA, 1988; MERCK INDEX, 1996; WENNINGER, CANTERBURY & MCEWEN, 2000).

SILICONE DOW CORNING® 5225C

Características: líquido viscoso, translúcido, com odor característico. Dispersão de silicone poliéter de peso molecular elevado em decametilciclopentasiloxano.

Funções nas formulações cosméticas: emoliência e maciez; melhora a espalhabilidade; reduz a oleosidade e a pegajosidade.

Usos em produtos cosméticos: maquiagem; preparações de creme para mãos; corpo, rosto e pescoço e formulações destinadas ao tratamento dos cabelos (DOW CORNING, 2001).

UNIOX® C

Definição: cera auto emulsionante não iônica, usada na concentração de 2 a 15%. Apresenta estabilidade com grande variedade dos princípios ativos.

Funções nas formulações cosméticas: constitui sozinho um sistema de emulsão. Proporciona estabilidade e viscosidade adequadas para emulsões sob a forma de creme e loção. Forma emulsões economicamente viáveis e elaboração simples, sendo adequado nos sistemas para os quais as ceras auto emulsionantes aniônicas são contra-indicadas. Em

formulações do tipo óleo em água, onde a manutenção da estabilidade é difícil, pode-se utiliza-lo como auxiliar de emulsificação para estabilizar a emulsão e equilibrar as fases.

Usos em produtos cosméticos: condicionador para cabelo; para emulsificação dos aditivos da fase oleosa (CHEMYUNION, 2003; DEG, 2004).

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Doseamento da atividade da papaína

A papaína foi doseada por espectrofluorimetria utilizando-se o método das microplacas, que consistem em placas com 96 poços e um substrato sintético fluorimétrico, o cloridrato de Carbobenzoxi-L-fenilalanina-L-argina-4 metilcoumarina- 7 amido (N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA) e o produto hidrolítico da reação é o 4-metilcoumarina-7amido. O método sensível, pode ser empregado na determinação da atividade da papaína e os filtros usados para detecção foram: para excitação 360nm, e para emissão 460nm (KANAOKA & TAKAHASHI, 1977; BARRET, 1980; CHAMBERS, et al., 1998; KORITAS & ATKINSON, 1995; BOCK et al., 1998; OLSSON, EK & BJORK, 1999).

4.2.1.1 - Soluções empregadas

Solução tampão fosfato de cisteína – EDTA

Dissolveram-se cerca de 3,55g de fosfato dibásico anidro em 400mL de água ultra-pura (Milli Q) em um balão volumétrico de 500mL. Adicionaram-se 7,0g de EDTA e 3,05 de cloridrato de cisteína monohidratado. Ajustou-se o valor de pH para 6,0 +/- 0,1 com solução de ácido clorídrico 1N ou de hidróxido de sódio 1N e completou-se o volume com água destilada (LOPES, 1999; USP 25, 2002; VELASCO, 1993).

Solução de ácido acético 30% v/v

Transferiram-se 30mL de ácido acético para um balão volumétrico de 100mL completou-se o volume com água destilada.

Solução do substrato Cloridrato de Carbobenzoxi-L-fenilalanina-L-argina-4 metilcumarina- 7 amido (N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA)

Pesaram-se exatamente 25mg do substrato (N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA) e dissolveram-se em exatamente 38,5mL de dimetilsulfoxido em erlenmeyer de 50 mL, utilizando pipeta volumétrica automática. No momento do doseamento, transferiram-se 400 μ L desta solução para um balão volumétrico 25mL e completou-se o volume com a solução tampão fosfato de cisteína – EDTA.

4.2.1.2 - Validação da metodologia analítica

a) Condições instrumentais

Utilizaram-se microplacas com 96 poços e acrescentaram-se as soluções: tampão de cisteína – EDTA, substrato N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA, papaína (amostra), e ácido acético 30% (v/v) para interromper a reação. Durante a montagem do esquema da microplaca, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo, inclusive a placa e em seguida, esta foi colocada no banho-maria à temperatura de 40 °C por 45 minutos e a reação foi interrompida em intervalos de 15 minutos, com solução de ácido acético 30% v/v (**Figura 2**), iniciando-se no tempo 0 e terminando aos 45 minutos. Realizou-se a leitura em espectrofluorímetro de placas Fluorocount™, com filtro de 360nm de excitação e 460nm de emissão e construiu-se uma curva de 4 valores de tempo para cada amostra, para a determinação da velocidade do aumento da fluorescência em função da concentração de papaína.

1 amostra

t0	t0	t0									
t15	t15	t15									
t30	t30	t30									
t45	t45	t45									

Figura 2 – Representação da distribuição da amostra na microplaca de 96 poços, para construção da curva de 4 valores de tempo para cada concentração da curva de calibração. Em cada valor acrescentou-se solução de ácido acético 30% para interromper a reação, como descrito a seguir: t0 – 0 minutos; t15 – 15 minutos; t30 – 30 minutos; t45 – 45 minutos. Cada grupo

de 3 colunas e 4 fileiras, corresponde a um valor de concentração diferente da papaína, doseada em triplicata. Os demais espaços foram preenchidos por outras amostras.

b) Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração pesaram-se exatamente 25mg de papaína padrão secundário Merck 30000USP/mg, dissolvidos em solução tampão fosfato de cisteína – EDTA em balão volumétrico de 250mL. Dessa solução, transferiram-se alíquotas de 180 μ L a 1500 μ L para 5 balões volumétricos de 100mL, completando-se o volume com tampão fosfato de cisteína – EDTA e obtendo-se as seguintes concentrações:

- 0,18; 0,3; 0,6; 1,2 e 1,5 μ g/mL

Em cada conjunto de 3 colunas e 4 fileiras de poços da microplaca, **Figura 2**, foram adicionadas as seguintes soluções, na seqüência:

- tampão fosfato de cisteína EDTA 55 μ L;
- substrato N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA 125 μ L; solução de papaína - Padrão secundário 30000USP/mg, 20 μ L e ácido acético 30% v/v em intervalos de 15 minutos, iniciando-se no tempo 0 e terminando aos 45 minutos, 40 μ L.

A microplaca foi conduzida ao banho-maria na temperatura de 40 °C. O teste foi realizado em triplicata e a leitura foi efetuada em espectrofluorímetro. Por meio da elaboração dos gráficos de tempo em função do aumento da fluorescência, obteve-se a velocidade de aumento de unidades de fluorescência por minuto para cada concentração.

As concentrações da papaína nos poços da microplaca foram as seguintes: 0,450; 0,750; 1,500; 3,000 e 3,750 USP/mL.

c) Especificidade - Estudo de interferentes dos excipientes da emulsão-base e gel-base sem papaína

Com o objetivo de analisar a interferência dos excipientes no método proposto, foram analisadas as formulações bases **2, 3** e **Gel, Tabela 5**, sem adição da papaína.

Pesaram-se exatamente cerca de 3,125g de cada formulação selecionada, diluindo-se em solução tampão fosfato de cisteína - EDTA em balão volumétrico de 50mL. Transferiram-se 2,5mL para balão volumétrico de 25mL, completou-se o volume com tampão citado anteriormente. Dessa solução tomaram-se 0,3mL para balão volumétrico de 25mL e completou-se o volume com o mesmo diluente, realizando o procedimento como descrito no **item 4.2.1.2, b** (BRASIL, RESOLUÇÃO 899, 2003).

d) Precisão

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) segundo a equação (BRASIL, RESOLUÇÃO 899, 2003):

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde:

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada = média das 10 determinações

DPR = desvio padrão relativo

Para a avaliação da precisão intra-dia do método, realizaram-se 10 determinações de cada amostra na concentração 1,5USP/mL, no poço da microplaca e calculou-se o coeficiente de variação segundo a equação acima .

e) Exatidão

Para verificar a exatidão do método, foi realizado o teste de recuperação. Onde foi adicionada à amostra quantidade conhecida de solução da substância padrão (BRASIL, RESOLUÇÃO 899, 2003).

Solução Padrão – Merck 30000USP/mg

Pesaram-se exatamente 25mg de papaína, padrão secundário Merck 30000USP/mg, que foram dissolvidos em solução tampão fosfato de cisteína – EDTA em balão volumétrico de 250mL.

Solução da amostra

Pesaram-se quantidades de amostras equivalentes a exatamente 25mg de papaína Wallerstein, que foram dissolvidas em solução tampão fosfato de cisteína – EDTA em balão volumétrico de 250mL.

Procedimento

Foram transferidas alíquotas da solução padrão e da amostra para balões volumétricos de 50 mL, conforme o esquema da **Tabela 3**.

Tabela 3 - Volumes adicionados das soluções das amostras e da solução padrão no teste de recuperação.

Balão volumétrico (50 mL)	Volume adicionado (mL)	
	Amostra	Padrão
1	-	0,3
2	0,150	0,3
3	0,150	-

A exatidão foi calculada como porcentagem da recuperação segundo a equação (BRASIL, RESOLUÇÃO 899, 2003):

$$E = \frac{CME}{CT} \times 10$$

Onde:

E = Exatidão

CME = Concentração média experimental

CT = concentração teórica

f) Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi estabelecido pela construção de 3 curvas de calibração do padrão secundário Merck 30000 USP/mg, nas concentrações: 0,075; 0,225; 0,750; 1,5; 3,0 e 3,750 USP/mL em cada poço, de onde se obteve o DP e a IC sendo expresso pela equação (BRASIL, RESOLUÇÃO 899, 2003):

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde:

DPa = Desvio padrão do intercepto com o eixo y das 3 curvas de calibração

IC = Inclinação da curva de calibração

g) Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade da substância que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob condições experimentais estabelecidas.

Este valor foi estabelecido, analisando-se soluções contendo concentrações decrescentes de papaína. A partir dos resultados obtidos,

construíram-se 3 curvas de calibração, aplicando-se os resultados na equação descrita a seguir (RESOLUÇÃO 899, 2003):

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

DPa = Desvio padrão do intercepto com o eixo y das 3 curvas de calibração

IC = Inclinação da curva de calibração

As concentrações usadas para a construção das curvas de calibração foram; 0,075; 0,225; 0,750; 1,5; 3,0 e 3,750 USP/mL

4.2.2 -Modificação da enzima

O processo de alteração da enzima foi realizado em colaboração com o Laboratório de Enzimologia Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, sob coordenação do Prof. Dr. **José Abrahão Neto**. A modificação da enzima foi realizada com polietilenoglicol modificado, com peso molecular médio de 5000, que gera um derivado de succinimida e ácido cianúrico. Este derivado reage especificamente com as aminas livres da cadeia lateral de lisinas da enzima. Esta reação foi realizada em meio de tampão pH 7,5 e à temperatura de 15 °C com duração de tempo de 12 horas. A concentração de papaína utilizada foi de 5% (p/v).

Como controle do processo de peglação, incorporação do polietilenoglicol na papaína, foi realizada uma análise de eletroforese em gel de poli(acrilamida e doseamento do grupo de polietilenoglicol incorporado na papaína por meio de espectrofotometria utilizando o ácido trimetil benzeno sulfônico (TNBS) e comparando-se com padrão de referência (HABEED, 1966; MATSUYAMA et al., 1991).

4.2.3 - Teste de Estabilidade Preliminar

4.2.3.1 - Pré-formulações

Preparam-se 23 pré-formulações, variando-se o tipo e a concentração dos polímeros adicionados, e suas misturas com hidroxietilcelulose. Os emolientes e a cera não iônica que se encontram na fase oleosa, foram mantidos sem alterações de concentração. A fase complementar onde se encontram o conservante, o silicone e a essência, também foi mantida sem alteração para todas as formulações. Na fase aquosa o componente que não sofreu alteração de concentração foi o propilenoglicol. Estas pré-formulações foram preparadas com intuito de selecionar aquelas de maior estabilidade macroscópica, avaliadas por análise visual, após 24 horas da adição da papaína, onde se observaram alterações das características organolépticas, homogeneidade, cor e odor com o objetivo de identificar processos de instabilidade, como cremeação, floculação e coalescência. Consideram-se também as características sensoriais, avaliadas segundo critério preconizado pelo analista (espalhamento na pele e toque sedoso). A partir dos resultados apresentados, escolheram-se 10 pré-formulações que foram submetidas ao Testes de Estabilidade Preliminar (centrifugação e estresse térmico). A composição de cada pré-formulação está descrita nas **Tabelas 4 e 5** (FERRARI, 1998; MAIA 2002, BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

Tabela 4 – Pré-formulações contendo 0,8% de papaína, preparadas para avaliação macroscópica e aspecto sensorial (**1 a 11**).

Pré-Formulação (% p/p)											
COMPONENTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fase oleosa											
Uniox® C	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Óleo mineral	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lactato de miristila	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Palmitato de isopropila	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Cetiol® V	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Cremerol® HMG	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Adipato de dibutila	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Aristoflex® AVC	1,0	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fase aquosa											
Carbopol® 940	-	-	1,0	1,5	-	-	-	-	-	-	-
Carbopol® ETD 2020	-	-	-	-	1,0	0,25	0,5	1,5	-	-	-
Pemulen® TRI	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,25	0,5
Hidroxiethylcelulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propilenoglicol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Água destilada qsp	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Fase complementar											
Phenoben®	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Silicone DC® 5225	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Essência	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Legenda

- Componentes não adicionados

Tabela 5 – Pré-formulações contendo 0,8% de papaína, preparadas para avaliação macroscópica e aspecto sensorial (12 a 23).

Pré-Formulação (% p/p)												
COMPONENTES	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Fase oleosa												
Uniox® C	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3,0
Óleo mineral	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lactato de miristila	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Palmitato de isopropila	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Cetiol® V	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Cremerol® HMG	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Adipato de dibutila	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Aristoflex® AVC	-	0,5	1,0	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fase aquosa												
Carbopol® 940	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
Carbopol® ETD 2020	-	-	-	-	-	0,5	0,25	-	-	-	-	-
Pemulen® TRI	1,5	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	-	-	-
Hidroxietilcelulose	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	-
Propilenoglicol	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Água destilada qsp	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Fase complementar												
Phenoben®	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Silicone DC® 5225	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Essência	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Legenda

- Componentes não adicionados

Preparam-se 200g de cada pré-formulação, empregando aquecimento dos componentes das **Fases oleosa e aquosa**, separadamente, a 70-75 °C em recipiente de aço inox e com posterior mistura, empregando-se a técnica de inversão de fases, ou seja, a **Fase aquosa** foi vertida sobre a **Fase oleosa** de forma constante e lenta, com o auxílio do agitador mecânico, tipo *mixer*. Após o preparo das mesmas e seu resfriamento até 35 °C, adicionaram-se, separadamente, os **Componentes da fase complementar**, homogeneizando-os com o auxílio de espátula (MAIA, 2002).

Após um período de 24 horas de repouso para estabilização da emulsão, foram incorporados 0,8% p/p de papaína nativa (não modificada) e 0,16% p/p de cloridrato de cisteína, previamente diluídos em quantidade suficiente de água destilada. Foram acondicionadas 30g das pré-formulações em frascos de polietileno branco e de boca larga com capacidade de 50g e foram mantidas à temperatura ambiente a 22 ± 2 °C (DREGER, 2000; RIEGER, 2000).

4.2.3.2 - Condições do Teste Preliminar de Estabilidade e variáveis analisadas

As formulações consideradas estáveis macroscopicamente, segundo o item **4.2.3.1**, foram submetidas aos testes de centrifugação e estresse térmico, avaliando-se as características organolépticas (aspecto, cor e odor) e de valor o pH (somente para as formulações macroscopicamente estáveis, ao final do teste). As amostras foram avaliadas no início e no final de cada teste, à temperatura ambiente (MAIA, VELASCO & DAZZI, 2000; MAIA, 2002; ROLAND et al., 2003; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

Para avaliação das características organolépticas, cor, odor e aspecto, foi empregada a seguinte nomenclatura para classificá-las:

COR

N – Normal, sem alterações (cor branca)

LM – Levemente Modificada (cor gelo)

M – Modificada (cor palha)

IM – Intensamente modificada (cinza)

ODOR

N – Normal, sem alterações (odor da essência)

LM – Levemente Modificado (perda do odor da essência)

M – Modificado (odor característico da degradação da papaína)

IM – Intensamente modificado (odor intenso característico da degradação da papaína)

ASPECTO

N – Normal, sem alterações (homogêneo)

LM – Levemente Modificado (início de alterações como a separação de fases, a cremeação ou a floculação)

M – Modificado (alterações caracterizadas de separação de fase, cremeação ou floculação)

IM – Intensamente modificado (alteração completa da formulação com separação total das fases, intensa cremeação ou floculação)

a) Centrifugação

Dez gramas de cada formulação foram submetidas a ciclos de centrifugação de 1000, 2500 e 3500rpm em centrífuga, durante quinze minutos para cada velocidade (FERRARI, 1998; MAIA, 2002; ROLAND et al., 2003).

b) Estresse térmico

Acondicionaram-se as pré-formulações em frascos de polietileno branco e de boca larga com capacidade de 50g, que foram transferidos para

banho-maria no intervalo de temperatura entre 40 e 80 °C. Realizou-se a elevação de 10 em 10 °C mantendo-se por trinta minutos em cada valor (FERRARI, 1998; MAIA 2002).

4.2.4 - Teste de Estabilidade Acelerada

As pré-formulações consideradas aprovadas nos testes preliminares, (total de 4), foram submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; FERRARI, 1998; MAIA, 2002; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004; BABY et al., 2004).

4.2.4.1 - Avaliação inicial

As formulações foram avaliadas inicialmente quanto às características organolépticas, aspecto, cor e odor, valor de pH, de viscosidade aparente e de condutividade (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; FERRARI, 1998; MAIA, VELASCO & DAZZI, 2000; MAIA, 2002; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004; BABY et al., 2004).

4.2.4.2 - Condições do teste

Após 24 horas de preparo e incorporação da papaína e cisteína nas formulações, estas foram submetidas às condições e períodos de avaliação, descritos da literatura científica (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; FERRARI, 1998; MAIA, 2002; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004; BABY et al., 2004).

a) Geladeira (5 ± 1 °C)

As formulações foram mantidas em geladeira durante 12 dias e avaliadas nos 3º, 7º e 12º dias.

b) Temperatura ambiente ($22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

As formulações foram mantidas à temperatura ambiente, durante 12 dias, sendo avaliadas no 3º, 7º e 12º dias.

c) Estufa ($45 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

As formulações foram mantidas em estufa durante 12 dias, sendo avaliadas nos 1º, 3º, 7º e 12º dias.

d) Ciclo gela e degela ($45 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}/-10 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

As formulações foram submetidas a períodos de congelamento ($-10 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por 24 horas em freezer, seguido de descongelamento em estufa ($45 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por 24 horas, completando-se dessa forma um ciclo. Foram realizados 6 ciclos, sendo as amostras avaliadas no 3º (6º dia) e 6º ciclos (12º dia).

e) Freezer ($-10 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

As formulações foram mantidas à temperatura de $-10 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em freezer durante 12 dias e avaliadas nos 3º, 7º e 12º dias.

4.2.4.3 - Variáveis analisadas

a) Características organolépticas

As características organolépticas das amostras foram observadas com o auxílio de placas de Petri, analisando a homogeneidade, separação de fases, presença de grumos e precipitados, odor e cor. As amostras de

referência foram mantidas a 5 ± 1 °C. Foi adotada a nomenclatura descrita no item **4.2.3.2** (MAIA, VELASCO & DAZZI 2000).

b) Valor de pH

As amostras foram diluídas em água recém-destilada e com pH neutralizado, na proporção de 1:10 p/v e submetidas à leitura em potenciômetro à temperatura ambiente (DAVIS, 1977).

c) Viscosidade aparente

Aproximadamente 15g de cada amostra foram analisadas em viscosímetro, à temperatura ambiente, utilizando-se as agulhas e velocidades descritas em **Resultados, Tabelas 13, 14, 15 e 16** de acordo com cada formulação (MAIA, 2002, BANOVA, 2002).

d) Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das emulsões foi avaliada, inserindo-se o eletrodo diretamente na amostra (DAVIS, 1977; PRISTA, BAHIA & VILAR, 1995; MARTIN, MEDWICK & KING, 1990).

4.2.5 - Teste de Estabilidade Normal

Avaliando-se os resultados do Teste de Estabilidade Acelerada foram escolhidas 2 formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Normal. Prepararam-se 1300g de cada formulação. Aproximadamente 30g foram distribuídas em frascos de polietileno branco e de boca larga com capacidade para 50g (BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004).

4.2.5.1 - Amostras

Como formulação de referência foi utilizada uma preparação sob a forma de gel **Formulação Gel**, descrita na **Tabela 6** (Velasco, 1993). As amostras submetidas ao teste foram as formulações de números **2** e **3** (**Tabela 6**), acrescidas de 0,8% p/p de papaína (não modificada) e 0,16% p/p de cisteína, pois apresentaram melhor desempenho de acordo com os resultados obtidos no Teste de Estabilidade Acelerada. A formulação de número **2** foi escolhida para ser incorporada com a papaína modificada, denominada **Formulação 2M** (**Tabela 6**). Após um período de 24 horas de preparo da desta formulação foram incorporados 22,06% (p/v) da papaína modificada e 0,16% p/p de cisteína.

Tabela 6 – Formulações submetidas ao Teste de Estabilidade Normal. **Gel** (Referência), e preparações números **2** e **3**, acrescidas de 0,8% (p/p) de papaína (não modificada) e 0,16% p/p de cisteína e a preparação **2M** adicionada de 22,06% (p/v) papaína modificada e 0,16% p/p de cisteína.

Formulação				
Componentes	Gel	2	3	2M
Fase oleosa	% p/p			
Uniox [®] C	-	1,5	1,5	1,5
Óleo mineral	-	0,5	0,5	0,5
Lactato de miristila	-	1,0	1,0	1,0
Palmitato de isopropila	-	2,0	2,0	2,0
Cetiol [®] V	-	2,0	2,0	2,0
Cremerol [®] HMG	-	0,5	0,5	0,5
Adipato de dibutila	-	1,0	1,0	1,0
Aristoflex [®] AVC	-	1,5	-	1,5
Fase aquosa				
Carbopol [®] 940	0,6	-	1,0	-
Propilenoglicol	5,0	2,5	2,5	2,5
Água destilada q.s.p.	100,00	100,0	100,0	100,0
Fase Complementar				
Metilparabeno	0,3	0,3	0,3	0,3
Phenoben [®]	-	0,5	0,5	0,5
Silicone [®] DC 5225	-	2,5	2,5	2,5
Essência	-	0,5	0,5	0,5
Papaína nativa (não modificada)	0,8	0,8	0,8	-
Papaína modificada	-	-	-	22,06
Cloridrato de cisteína	0,16	0,16	0,16	0,16

Legenda

- Componentes não adicionados

4.2.5.2 - Condições do teste de estabilidade normal

Após 24 horas de preparo e incorporação da papaína e cisteína nas formulações, as mesmas foram submetidas às seguintes condições e períodos de avaliação, adaptando-se da literatura científica (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; FERRARI, 1998; MAIA, 2002; ROLAND et al., 2003; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004; BABY et al., 2004).

- Geladeira (5 ± 1 °C);
- Temperatura ambiente (22 ± 2 °C);
- Estufa (40 ± 2 °C).

As formulações foram analisadas após 24 horas de repouso nos 3º, 7º, 15º, 30º, 60º, 90º dias.

4.2.5.3 - Variáveis analisadas

A avaliação das formulações envolveu: características organolépticas, (procedimento descrito no item 4.2.3.2); valores de pH, de viscosidade e de condutividade (descritos no item 4.2.3.3) e doseamento da atividade da papaína, conforme item 4.2.1 (RIBEIRO, KHURY & GOTTARDI, 1996; FERRARI, 1998; MAIA, VELASCO & DAZZI, 2000; MAIA, 2002; ROLAND et al., 2003; BRASIL - GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, 2004; BABY et al., 2004).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO

Na **Tabela 7** e **Figura 3** são apresentados os resultados da curva de calibração da papaína Merck 30000, padrão secundário.

Tabela 7. Resultados experimentais obtidos na curva de calibração para a papaína Merck 30000, USP/mg, padrão secundário.

Concentração de leitura USP/mL	Velocidade*
0,450	4,15
0,750	5,46
1,500	10,32
3,000	20,96
3,750	25,55

* Média de três determinações para cada concentração

Figura 3 - Curva de calibração da papaína Merck 30000USP/mg.

A partir da curva de calibração obteve-se a **Equação 1**.

Equação 1: $y = 6,6388x + 0,7391$ $R^2 = 0,999$

Onde: y = Velocidade do aumento de unidades de fluorescência por minuto

x = Concentração de papaína em unidades USP por mL

R^2 = Coeficiente de correlação linear

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 7**, **Figura 3** e **Equação 1** e pela construção da curva de calibração, verificou-se a proporcionalidade entre a concentração da papaína padrão secundário utilizada (30000USP/mg) e o aumento da velocidade de formação do composto fluorescente. O coeficiente de correlação linear R^2 foi igual a 0,999 correspondendo ao valor de $R = 0,999$, estando de acordo com o limite apresentado pela literatura ($R \geq 0,99$) e demonstrando linearidade do método analítico empregado (BRASIL, RESOLUÇÃO 899, 2003).

5.2 - ESPECIFICIDADE - ESTUDO DE INTERFERENTES DOS EXCIPIENTES, A PARTIR DAS EMULSÕES-BASE E GEL-BASE SEM PAPAÍNA

Os resultados da análise dos excipientes empregados nas formulações 2, 3 (emulsão-base) e Gel, sem adição de papaína são apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10 e Figuras 4, 5 e 6.

Tabela 8 - Resultados experimentais do estudo de interferentes dos excipientes obtidos no doseamento da formulação 2, sem adição de papaína.

tempo (minutos)	Unidades de Fluorescência*
0	65,0
15	80,5
30	62,3
45	72,0

* Média de 3 determinações

Figura 4 – Curva de 4 tempos (tempo x unidades de fluorescência) obtida pelo doseamento da formulação 2, sem adição de papaína.

A partir da Figura 4 foi elaborada a Equação 2

$$\text{Equação 2: } y = 0,0189x + 69,53 \quad R^2 = 0,002$$

Onde: y = unidades de fluorescência

x = tempo (minutos)

R^2 = coeficiente de correlação linear

Tabela 9 - Resultados experimentais do estudo de interferentes dos excipientes obtidos no doseamento da formulação 3, sem adição de papaína.

tempo (minutos)	Unidades de Fluorescência*
0	75,0
15	62,7
30	68,5
45	74,0

* Média de 3 determinações

* Média de 3 determinações

Figura 5 - Curva de 4 tempos (tempo x unidades de fluorescência) obtida pelo doseamento da formulação 3, sem adição de papaína.

A partir da **Figura 5** foi elaborada a **Equação 3**.

Equação 3: $y = 0,0189x + 69,62$ $R^2 = 0,0041$

Onde: **y** = unidades de fluorescência

x = tempo (minutos)

R^2 = coeficiente de correlação linear

Tabela 10 - Resultados experimentais do estudo de interferentes dos excipientes obtidos no doseamento da formulação **Gel**, sem adição de papaína.

tempo (minutos)	Unidades de Fluorescência*
0	78,0
15	67,0
30	71,0
45	75,0

* Média de 3 determinações

* Média de 3 determinações

Figura 6 - Curva de 4 tempos (tempo x unidades de fluorescência) obtida no doseamento da formulação **Gel**, sem adição de papaína

A partir da **Figura 6** foi elaborada a **Equação 4**.

Equação 4: $y = -0,0333x + 75,5$ $R^2 = 0,0182$

Onde: **y** = unidades de fluorescência

x = tempo (minutos)

R^2 = coeficiente de correlação linear

A especificidade é a habilidade do método em avaliar, inequivocamente, o analito, na presença de componentes que poderão estar presentes durante a análise, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Nesta pesquisa este parâmetro foi avaliado por meio da verificação se o método não foi afetado por substâncias, que estavam presentes no veículo da formulação (USP 25, 2002, PINTO, FERRARINI & GATTI, 2003).

A pesquisa de interferentes das formulações escolhidas para o **Estudo de Estabilidade Normal** apresentou resposta de baixa velocidade do aumento de unidades de fluorescência por minuto, como apresentado nas **Figuras 4, 5 e 6**, **Tabelas 8, 9 e 10**, confirmando a especificidade do método e não interferência dos excipientes (BRASIL, RESOLUÇÃO 899, 2003).

5.3 - PRECISÃO

Nas **Tabela 11** estão apresentados os resultados da precisão intra-dia, obtidos da análise das formulações **2**, **3**, e **Gel** acrescido de papaína 0,8% (p/p) de papaína.

Tabela 11 - Precisão intra-dia - Resultados experimentais obtidos da avaliação da precisão intra-dia das amostras **2**, **3** e **Gel**. As leituras foram obtidas no mesmo dia.

Determinação	Formulação		
	2	3	Gel
	Concentração obtida (USP/mL)		
1	289,9	279,2	256,1
2	298,6	306,0	258,5
3	284,1	304,7	257,5
4	284,2	288,4	257,3
5	301,1	270,0	253,0
6	262,7	300,5	257,3
7	281,4	276,2	241,9
8	283,5	272,5	254,8
9	304,7	276,2	270,4
10	285,1	302,3	253,9
M*	285,06	302,34	253,87
D.P.R.%**	4,2	5,0	2,7

Onde:

• **M*** – Média

D.P.R.** – Desvio padrão relativo

Verificamos que a partir dos resultados obtidos na **Tabela 11** a precisão do método foi considerada adequada, com desvio padrão relativo inferior a 5,0 estando de acordo com a recomendação da literatura, confirmando a validação do método (BRASIL, Resolução 899, 2003).

Em situações mais complexas, que exigem operações múltiplas ou delicadas de extração, derivação, ou na análise de traços, são aceitos valores de 5 a 10% (PINTO, FERRARINI & GATTI, 2003).

5.4 - EXATIDÃO

Os resultados dos testes de recuperação efetuados nas amostras são apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Resultados obtidos no teste de recuperação da papaína aplicado nas amostras das formulações 2, 3 e Gel.

Formulação	Quantidade de padrão adicionado (USP/mL)	Quantidade de padrão recuperado* (USP/mL)	Exatidão (%)
2	1,5	1,43	95,3
3	1,5	1,48	98,7
Gel	1,5	1,45	96,7

* média de três determinações

5.5 - LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Na **Tabela 13** são apresentados os resultados da análise do limite de detecção e quantificação da papaína.

Tabela 13 - Resultados para calculo do limite de detecção e quantificação da papaína pelo método espectrofluorimétrico de microplacas.

Curvas	Intercepto com o eixo Y	Inclinação
1	0,4990	6,82
22	0,6576	6,54
3	0,5808	6,44
M	—	6,60
DP	0,079	-

M – Média da inclinação obtida com a construção das três curvas

DP – Desvio Padrão do intercepto das três curvas

O Limite de Detecção calculado, segundo a literatura, utilizando-se a equação descrita no item 4.2.1.2 f, foi de 0,040 USP/mL (BRASIL, Resolução 899, 2003; PINTO, FERRARINI & GATTI, 2003).

O Limite de Quantificação calculado, segundo a literatura, utilizando-se a equação descrita no item 4.2.1.2 g foi de 0,12 USP/mL (BRASIL, Resolução 899, 2003; PINTO, FERRARINI & GATTI, 2003).

Estes resultados demonstram que o método é bastante sensível comparado aos resultados do método espectrofluorimétrico que utiliza a caseína como substrato, onde o limite de detecção foi de 3420 USP/mL e o limite de quantificação foi de 10380 USP/mL. O método que utiliza o substrato cloridrato de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina, o BAPA, apresentou limite de detecção igual a 8400USP/mL (LOPES et al., 2003).

O substrato Benzoil-L-arginina-4-metilcoumarina-7amida foi estudado por Kanaoka & Takahashi, 1977, para medir a atividade da papaína e da tripsina, tendo como produto hidrolítico o 7-amino-4-metilcoumarina. A linearidade da fluorescência versus tempo de incubação foi satisfatória e a razão da hidrólise foi proporcional à concentração da enzima, sendo entre 30-600ng/mL. A sensibilidade do método foi 100 vezes superior comparada com a do substrato cromogênico benzoil-L-arginina-p -nitroanilida (KANAOKA & TAKAHASHI, 1977).

OLSSON, EK & BJORK; 1999, utilizaram o substrato carbobenzoil-L-fenilalanina-L-arginina-4-metilcoumarina-7-amido, em microplacas e detectaram 1 μ M de papaína em um estudo sobre a afinidade e cinética da inibição de cisteína proteinase pelo contato de cistatina C recombinante (OLSSON & BJORK, 1999).

5.6 - MODIFICAÇÃO DA ENZIMA

Após a formação da papaína imobilizada, determinou-se sua atividade por meio do método proposto neste trabalho no item 4.2.1. A atividade enzimática decaiu 44,14% comparada a enzima não modificada.

5.7 - TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

O critério para escolha das pré-formulações que foram conduzidas nos testes preliminares tentou contemplar pelo menos um tipo de formulação para cada espessante, emulsificante e formador de filme utilizado (Aristoflex® AVC, Pemulen® TR1, Carbopol® 940 e ETD 2020), com e sem hidroxietilcelulose, sendo apenas uma formulação com hidroxietilcelulose e outra sem nenhuma das substâncias citadas acima, esta última utilizada com o objetivo de verificar a influência de auxiliares de emulsificação e espessamento nas formulações. A técnica de preparo foi similar para todas as formulações.

Foram preparadas 23 pré-formulações e após a avaliação sensorial que envolveu espalhamento na pele e toque sedoso foram selecionadas 10, submetidas ao **Teste de Estabilidade Preliminar**, pois apresentaram as melhores características.

Os resultados das características organolépticas (aspecto, cor e odor) e valores de pH das 10 pré-formulações selecionadas avaliadas inicialmente e após a teste de centrifugação e de estresse térmico, estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Avaliação das características organolépticas e físicas das pré-formulações contendo 0,8% (p/p) de papaína no **Teste de Estabilidade Preliminar**.

Pré-Formulação	Parâmetro avaliado					
	Teste	Aspecto	Cor	Odor	pH	
					Antes	Depois
2	C	N	N	N	6,5	6,6
	E T	N	N	M	6,5	6,5
3	C	N	N	N	6,6	6,8
	E T	N	N	M	6,6	6,7
6	C	IM	N	N	-	-
	E T	IM	N	M	-	-
10	C	IM	N	N	-	-
	E T	IM	N	M	-	-
14	C	N	N	N	6,0	5,9
	E T	N	N	M	6,0	5,8
16	C	N	N	N	6,7	6,7
	E T	N	N	M	6,7	6,7
18	C	IM	N	N	-	-
	E T	M	N	M	-	-
20	C	IM	N	N	-	-
	E T	IM	N	M	-	-
22	C	IM	N	N	-	-
	E T	IM	N	M	-	-
23	C	M	N	N	-	-
	E T	IM	N	M	-	-

Legenda:

Teste: C - Centrifugação; E T - Estresse Térmico;

Aspecto: N - Normal, sem alteração; IM - Intensamente modificado;

Cor: N - Normal, sem alteração;

Odor: N - Normal, sem alteração; M - Modificado,

pH: - pré-formulação macroscopicamente não estável.

Os testes preliminares possibilitaram identificar sinais de instabilidade em 6 das 10 pré-formulações (**Tabela 14**) submetidas ao estresse térmico e à centrifugação, como separação de fases, formação de grumos e mudança de odor. Foram consideradas aprovadas 4 pré-formulações, posteriormente submetidas ao **Teste de Estabilidade Acelerada**.

Os resultados obtidos na **Tabela 14** indicaram que as formulações que continham os polímeros Pemulen® TR1e Carbopol ETD® 2020, não permaneceram estáveis após os testes preliminares, o que pode ser justificado pois as preparações exigiam técnica de elaboração diferenciada em relação às velocidades de agitação e tempo de dispersão.

O comportamento de uma emulsão submetida à centrifugação depende da diferença de densidades entre a fase oleosa e aquosa e também da resistência interfacial das fases. O estresse térmico acelera o processo de degradação dos componentes da formulação. Após as formulações serem submetidas aos testes, aquela que não continha nenhum tipo de espessante, emulsificante e formador de filme não resistiu às condições do teste, fato esperado, pois a concentração do componente auto-emulsionante era inferior à recomendada pelo fabricante (2,0%). A formulação que continha apenas derivado de celulose, hidroxietilcelulose, também não resistiu, similarmente ao experimento realizado por Velasco, 1993, e Traversa 2003, onde a preparação gel a base de derivado de celulose apresentou menor estabilidade que a elaborada com Carbopol® 940 (VELASCO, 1993; ROLAND et al., 2003; TRAVERSA, 2003).

As formulações da **Tabela 14** mais estáveis, após o **Teste Preliminar**, foram as que continham os polímeros Aristoflex® AVC (**Formulações 2 e 14**) e Carbopol® 940 (**Formulações 3 e 16**) em sua composição, apresentando apenas modificações no odor após o teste de estresse térmico, pois em temperaturas elevadas ocorreu degradação da enzima e liberação de odor característico de enxofre. Os polímeros provavelmente elevaram a estabilidade da emulsão pois diminuíram a velocidade de separação de fases (SILVA, 2000).

5.8 - TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA

Os resultados da avaliação das quatro pré-formulações selecionadas, quanto às características organolépticas (aspecto, cor e odor) e valores de pH, de viscosidade e de condutividade, inicialmente e após a exposição às condições do teste: geladeira ($5 \pm 1,0$ °C), temperatura ambiente ($22 \pm 2,0$ °C), estufa a ($45 \pm 2,0$ °C), ciclos gela e degela (45 ± 2 °C/ -10 ± 1 °C) e freezer (-10 ± 1 °C) estão apresentados nas **Tabela 15 a 18** correspondendo as formulações **2, 3, 14 e 16**, respectivamente e **Figuras 7, 8 e 9** para a análise das variáveis: pH, condutividade e viscosidade, respectivamente.

Tabela 15 - Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação 2 acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o **Teste de Estabilidade Acelerada**.

		Condição de armazenamento														
Parâmetros	Início	Geladeira (5 ±1,0 °C)			Ambiente (22 ± 2,0 °C)			Freezer (-10 ± 1,0 °C)			Ciclo gela/degela (45 ± 2 /-10 ± 1 °C)			Estufa (45 °C ± 2,0 °C)		
		tempo (dias)														
		3	7	12	3	7	12	3	7	12	6	12	1	3	7	12
pH	6,4	6,3	6,1	6,2	6,2	6,2	6,3	6,3	6,3	6,2	6,0	6,0	6,3	6,1	6,0	6,0
η*	8150	8566	8300	8433	8700	8900	8666	8000	8150	7666	8000	8000	7666	8466	7766	7700
Cond	5,4	5,8	5,6	5,1	5,1	5,5	5,0	6,0	5,6	6,7	6,2	5,9	5,6	5,8	5,2	5,8
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	Essência	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	N	N	N	N	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração

LM - Levemente modificado

η* - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C)

Tabela 16 – Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação 3 acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Acelerada.

		Condição de armazenamento														
Parâmetros	Início	Geladeira (5 ± 1,0°C)			Ambiente (22 ± 2,0 °C)			Freezer (-10 ± 1,0 °C)			Ciclo gela/degela (45 ± 2 /-10 ± 1 °C)			Estufa (45 °C ± 2,0 °C)		
		tempo (dias)														
		3	7	12	3	7	12	3	7	12	6	12	1	3	7	12
pH	6,4	6,4	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,4	6,3	6,3	6,6	6,3	6,3	6,4	
η*	30900	34300	32800	33300	34566	34000	33333	30900	27566	34666	29200	28966	29800	30966	28566	29600
Cond	3,6	3,4	3,4	3,1	3,4	3,4	3,1	4,4	3,3	3,8	4,2	4,1	3,8	3,8	3,9	3,9
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	LM
Odor	Essência	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	M	N	N	N	M

Legenda:

N - Normal, sem alteração

LM - Levemente modificado

M - Modificado

η* - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR11 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C)

Tabela 17 – Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação **14** acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o **Teste de Estabilidade Acelerada**.

Parâmetros	Início	Condição de armazenamento														
		Geladeira (5 ± 1,0 °C)			Ambiente (22 ± 2,0 °C)			Freezer (-10 ± 1,0 °C)			Ciclo gela/degela (45 ± 2 /-10 ± 1 °C)			Estufa (45 °C ± 2,0 °C)		
		3	7	12	3	7	12	3	7	12	6	12	1	3	7	12
pH	6,6	6,4	6,4	6,4	6,3	6,4	6,3	6,4	6,4	6,3	6,1	6,0	6,6	6,4	6,2	6,2
η*	14066	14700	13033	12500	12700	11100	10400	17100	16066	16566	12500	11066	13800	12000	9100	11100
Cond	3,8	3,8	3,8	3,3	3,6	3,6	3,3	5,3	3,8	3,9	3,9	3,7	3,7	3,8	3,5	3,7
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	Essência	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	N	N	N	M

Legenda:

N - Normal, sem alteração

LM - Levemente modificado

M - Modificado

η* - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C)

Tabela 18 – Avaliação das características organolépticas, físicas e físico-química da formulação **16** acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o **Teste de Estabilidade Acelerada**.

Parâmetros	Início	Condição de armazenamento														
		Geladeira (5 ± 1,0 °C)			Ambiente (22 ± 2,0 °C)			Freezer (-10 ± 1,0 °C)			Ciclo gela/degela (45 ± 2 /-10 ± 1 °C)			Estufa (45 °C ± 2,0 °C)		
		3	7	12	3	7	12	3	7	12	6	12	1	3	7	12
pH	6,3	6,2	6,2	6,2	6,1	6,2	6,2	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0	6,3	6,1	6,1	6,0
η*	6300	7200	4366	6233	6066	5733	4600	7700	7633	8066	5233	4633	6966	3800	4300	4200
Cond	2,8	2,8	2,8	2,6	2,8	2,8	2,5	3,5	2,9	3,0	3,0	2,9	3,0	2,9	2,9	2,5
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	N	N	LM	LM
Odor	Essência	N	N	N	N	N	LM	N	N	N	N	LM	N	N	N	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração

LM - Levemente modificado

η* - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR11 e velocidade de 100 rpm (Cp)

Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C)

Figura 7 - Variação do valor de pH (%) para as formulações 2, 3, 14 e 16, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Acelerada.

Figura 8 – Variação do valo da condutividade (%) para as formulações 2, 3 14 e 16, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Acelerada.

Figura 9 – Variação do valor da viscosidade aparente (%) para as formulações 2, 3, 14, 16, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Acelerada.

O **Teste de Estabilidade Acelerada** forneceu informações sobre as preparações mais estáveis nas diferentes condições a que foram submetidas. As formulações **14 e 16 (Tabela 5)**, que além dos polímeros Aristoflex® AVC e Carbopol® 940 continham em sua composição a hidroxietilcelulose, apresentaram as maiores variações das características analisadas.

A partir dos resultados obtidos, verificamos a tendência de melhor performance das formulações que apresentavam apenas uma dessas substâncias mencionadas anteriormente, e não a sua mistura com um derivado de celulose. As formulações **2 e 14 (Tabelas 4 e 5)** apresentaram valores de pH mais alterados que as demais, sendo o máximo de 0,6 unidades, na condição **45 ± 2 / $-10 \pm 1^\circ\text{C}$ (ciclo gela-degela) (Tabelas 15 e 17, Figura 7)**. Este comportamento era esperado, pois esta condição é muito drástica para formulações que contêm enzimas. Apesar das variações ocorridas, as formulações mantiveram o valor de pH adequado para a manutenção da atividade enzimática (VELASCO, 1993; MERCK INDEX, 1996).

Os valores da viscosidade aparente apresentaram variação maior na condição **$45 \pm 2^\circ\text{C}$ (Estufa) (Figura 9)**, ocorrendo diminuição de **40%** para a formulação **16** e de **35%** para a formulação **14 (Tabela 17 e 18)**. Este resultado era aguardado, pois a temperatura elevada promove a degradação da enzima, podendo interferir na viscosidade da formulação. As concentrações empregadas de Aristoflex® AVC (1,0%p/p) e Carbopol® 940 (0,5% p/p) nestas preparações foram insuficientes para manter o perfil de viscosidade das mesmas, aliado ao fato da hidroxietilcelulose não ter auxiliado as formulações neste quesito. Observações de instabilidade na presença, de hidroxietilcelulose, incorporadas nas preparações adicionadas de papaína foram observadas por Traversa, 2003. Este pesquisador preparou um gel de papaína e submeteu sua preparação ao teste de centrifugação (Teste Preliminar), sendo observadas a formação de cristais e a decantação da enzima.

Houve variação da condutividade, observando-se maior diferença na condição $-10 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Freezer**) (**Figura 8**), verificando-se tendência de elevação para todas as formulações, com maior variação (40%) para a de número **14** (**Tabela 17**), as outras formulações apresentaram variações menores que 25%. A condutividade elétrica é uma técnica freqüentemente utilizada para monitorar a estabilidade das emulsões, verificando a integridade da fase externa, principalmente daquelas armazenadas por longos períodos e do tipo O/A. Este resultado demonstrou a formulação **14**, não apresentou integridade da fase externa, quando exposta a temperatura $-10 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Freezer**) (**Figura 8**) (GRIFFIN et al., 1967; LATREILLE & PAQUIN, 1990; FERRARI, 2002).

Avaliando-se esses resultados obtidos e descritos anteriormente foram escolhidas para o **Teste de Estabilidade Normal** as formulações **2** e **3**.

5.9 - TESTE DE ESTABILIDADE NORMAL

Os resultados do **Teste de Estabilidade Normal** para as formulações **2** e **3**, selecionadas no **Teste de Estabilidade Acelerada** e a formulação **2M** que é igual a de número **2** mas com inclusão de papaína modificada e o **Gel** de papaína (formulação de referência) estão apresentados para atividade da enzima, variações (%) de pH, de viscosidade e de condutividade nas **Tabelas 19 a 28** e **Figuras 10 a 13**. O gel de papaína foi analisado apenas na condição de geladeira $5 \pm 1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas as formulações foram analisadas após 24 horas após preparo (início), pois após este período ocorre estabilização da forma cosmética emulsão e gel.

Tabela 19 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação 2, acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o **Teste de Estabilidade Normal**

		Condição de armazenamento					
Parâmetros	Início	Geladeira ($5 \pm 1,0$ °C)					
		Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	236,2	257,4	191,6	137,5	156,0	151,4	186,3
pH	5,9	6,2	6,2	6,2	6,0	6,0	6,0
η^{**}	8950	9950	9750	9100	9800	10600	11050
Cond	6,5	6,2	6,5	6,9	6,9	6,3	6,6
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N
Odor	Essência	N	N	N	N	N	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / * - USP/mL / Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C) / η^{**} - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Tabela 20 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $22 \pm 2,0$ °C da formulação 2, acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o **Teste de Estabilidade Normal**.

		Condição de armazenamento					
Parâmetros	Início	Ambiente ($22 \pm 2,0$ °C)					
		Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	236,2	240,2	193,34	149,3	116,9	84,4	112,0
PH	5,9	6,0	6,2	6,1	6,0	5,8	5,5
η^{**}	8950	9700	10200	8600	10050	10553	10550
Cond	6,5	6,1	6,2	7,0	6,6	6,1	6,8
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N
Odor	Essência	N	N	N	LM	LM	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / * - USP/mL / Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C) / η^{**} - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Tabela 21 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $40 \pm 2,0$ °C da formulação 2, acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o **Teste de Estabilidade Normal**.

		Condição de armazenamento					
Parâmetros	Início	Estufa ($40 \pm 2,0$ °C)					
		Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	236,2	218,3	155,8	117,6	63,5	13,2	18,1
pH	5,9	5,9	6,0	5,8	5,3	5,13	5,2
η^{**}	8950	9800	9750	8700	9500	10400	10850
Cond	6,5	5,8	6,3	6,9	6,7	6,4	7,0
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	LM	LM	LM
Odor	Essência	N	N	LM	M	M	M

Legenda:

N - Normal, sem alteração / **LM** - Levemente modificado / **M** - Modificado / ***** - USP/mL / **Cond** - Condutividade (S/cm a 25 °C) / η^{**} - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Tabela 22 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação 3, acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o **Teste de Estabilidade Normal**.

		Condição de armazenamento					
Parâmetros	Início	Geladeira ($5 \pm 1,0$ °C)					
		Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	294,7	219,7	170,5	138,1	141,4	97,3	174,2
pH	6,3	6,2	6,6	6,6	6,5	6,5	6,6
η^{**}	31516	33750	34800	33350	34100	33350	33000
Cond	4,0	4,0	4,1	4,2	4,3	4,0	4,2
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N
Odor	Essência	N	N	N	N	LM	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração / **LM** - Levemente modificado / ***** - USP/mL / **Cond** - Condutividade (S/cm a 25 °C) / η^{**} - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Tabela 23 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $22 \pm 2,0$ °C da formulação 3, acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.

		Condição de armazenamento					
		Ambiente ($22 \pm 2,0$ °C)					
Parâmetros	Início	Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	294,7	238,7	139,4	123,9	119,5	59,0	68,8
PH	6,3	6,0	6,6	6,6	6,5	6,4	6,5
η^{**}	31516	33750	33300	32400	32600	32050	32150
Cond	4,0	3,8	4,0	4,4	4,3	4,1	4,4
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	LM	LM
Odor	Essência	N	N	N	LM	LM	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / * - USP/mL / Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C) / η^{**} - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Tabela 24 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $40 \pm 2,0$ °C da formulação 3, acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.

		Condição de armazenamento					
		Estufa ($40 \pm 2,0$ °C)					
Parâmetros	Início	Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	294,7	202,6	102,7	102,3	32,6	17,9	27,03
PH	6,3	6,1	6,5	6,5	6,4	6,3	6,3
η^{**}	31516	31300	31950	29900	29300	30200	29650
Cond	4,0	4,0	4,3	4,5	4,7	4,5	4,7
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	LM	LM	LM
Odor	Essência	N	N	LM	M	M	M

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / M – Modificado / * - USP/mL / Cond - Condutividade (S/cm a 25 °C) / η^{**} - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Tabela 25 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação 2M, acrescida de papaína modificada p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal. Condição $5 \pm 1,0$ °C.

		Condição de armazenamento					
Parâmetros	Início	Geladeira ($5 \pm 1,0$ °C)					
		Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	154,76	203,5	234,4	166,6	299,2	254,5	341,9
pH	6,4	6,5	6,6	6,5	6,5	6,2	6,2
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	N	LM	LM	LM
Odor	Essência	N	N	N	N	N	N

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / * - USP/mL

Tabela 26 -Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $22 \pm 2,0$ °C da formulação 2M, acrescida de papaína modificada p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.

		Condição de armazenamento					
Parâmetros	Início	Ambiente ($22 \pm 2,0$ °C)					
		Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	154,7	164,7	202,0	222,8	346,3	329,5	329,5
pH	6,4	6,5	6,6	6,3	6,3	6,2	6,0
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Branca	N	N	LM	LM	LM	LM
Odor	Essência	N	N	N	LM	LM	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / * - USP/mL

Tabela 27 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas, físicas e físico-químicas a $40 \pm 2,0$ °C da formulação **2M**, acrescida de papaína modificada p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.

		Condição de armazenamento					
		Estufa ($40 \pm 2,0$ °C)					
Parâmetros	Início	Tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	154,76	258,3	257,8	301,8	255,4	193,7	133,1
pH	6,4	6,4	6,4	6,6	6,1	5,6	5,5
Aspecto	Homogêneo	N	LM	M	M	M	M
Cor	Branca	N	LM	M	M	M	M
Odor	Essência	N	N	LM	M	M	M

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / M – Modificado / * - USP/mL

Tabela 28 - Avaliação da atividade enzimática, características organolépticas e físico-químicas a $5 \pm 1,0$ °C da formulação **Gel** acrescida de papaína 0,8% p/p, durante o Teste de Estabilidade Normal.

		Condição de armazenamento					
		Geladeira ($5 \pm 1,0$ °C)					
Parâmetros	Início	tempo (dias)					
		3	7	15	30	60	90
Atividade*	208,3	189,1	188,1	172,3	172,3	139,7	146,0
pH	6,6	6,6	6,7	6,6	6,5	6,5	6,4
η^{**}	7100	7100	6950	6650	7100	6300	7100
Cond	3,0	3,1	3,1	3,2	3,1	3,23	3,0
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N
Cor	Transparente	N	N	N	N	N	LM
Odor	Característico	N	N	N	LM	LM	LM

Legenda:

N - Normal, sem alteração / LM - Levemente modificado / * - USP/mL / **Cond** - Condutividade (S/cm a 25 °C)

η^{**} - Viscosidade aparente, utilizando a agulha TR10 e velocidade de 20 rpm (Cp)

Figura 10 – Variação da Atividade da papaína (%) para as formulações 2, 3, 2M e Gel, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal.

De acordo com a Tabela 28 e Figura 10 na condição de $5 \pm 1,0$ °C (geladeira) o Gel de papaína (amostra de referência), inicialmente, apresentou velocidade de decaimento da atividade enzimática menor que as formulações

com Aristoflex® AVC e Carbopol® 940, respectivamente formulações 2 e 3, até o tempo de 30 dias, mantendo 82% de atividade remanescente. A provável explicação para este fato seria a inclusão do emulsificante não iônico Uniox® C nas duas últimas preparações, que interagiria inicialmente com a enzima, reduzindo sua estabilidade. No caso do **Gel** o veículo é mais simples e inclui um geleificante polimérico que estabiliza a enzima. Após este período de tempo, estas 3 formulações comportam-se de maneira similar e as diferenças de atividade praticamente se igualam. Aos 90 dias obtiveram-se valores, próximos de 70%, em média, para as três formulações. O mesmo comportamento foi observado por Velasco, 1993, quando estudou a papaína veiculada em formulações a base de gel e constatou que nesta condição a preparação a base de Carbopol® 940, reteve aproximadamente 70% da atividade inicial aos 57 dias.

As formulações 2 e 3, quando expostas a condição $22,0 \pm 2,0$ °C (**Tabelas 20 e 23 e Figura 10**), apresentaram perfil de decaimento um pouco diferenciado, onde a formulação 3 perdeu praticamente 50% da atividade da papaína em 7 dias, com decaimento de aproximadamente 80%, aos 90 dias. A formulação 2 apresentou perda de 50% aos 30 dias, com decaimento de aproximadamente 60%, aos 90 dias.

Na condição de $40 \pm 2,0$ °C (**Tabelas 21 e 24**), até os 30 dias do estudo, os resultados demonstraram que a formulação 3 apresentou aproximadamente metade do valor remanescente de atividade em relação a formulação 2, após este prazo o perfil praticamente se igualou. As duas formulações apresentaram atividade remanescente de papaína abaixo de 10% do valor inicial no prazo de 60 dias, mantendo este valor até o final do teste. Este fato era esperado, pois o aumento da temperatura acelerou o processo de decomposição da enzima (RAJALAKSHMI & SUNDARAM, 1995).

De acordo com os resultados do doseamento da atividade da papaína, veiculada nas formulações, 2, 3 e **Gel**, durante o **Teste de Estabilidade Normal**, a atividade da enzima foi afetada pelo aumento da temperatura. Aos

90 dias os resultados foram: na condição $40 \pm 2,0$ °C, a atividade remanescente para as formulações 2 e 3 foi menor que 10%; a $22,0 \pm 2,0$ °C os dados obtidos foram de 47 e 23% respectivamente e a $5 \pm 1,0$ °C, as três formulações (2, 3 e Gel), apresentaram em média 70% de atividade remanescente. Nesta temperatura as formulações apresentaram menor perda de atividade, resultado concordante com a literatura (VELASCO, 1993; RAJALAKSHMI & SUNDARAM, 1995).

A enzima modificada apresentou elevação na atividade enzimática no decorrer do tempo para todas as condições estudadas. No início do experimento, a enzima estava complexada com polietilenoglicol e sua atividade apresentou diminuição de 44%. Durante o estudo de estabilidade, a enzima vai sendo liberada para a ação proteolítica.

Na temperatura de $40 \pm 2,0$ °C (Tabela 27, Figura 10), aos 15 dias de estudo esta apresentou 200% de atividade em relação ao valor inicial, com posterior decaimento chegando a 133% aos 90 dias. Na temperatura de $22 \pm 2,0$ °C (Tabela 26, Figura 10) este valor foi obtido com 30 dias e mantido até os 90 dias. Na geladeira ($5 \pm 1,0$ °C) (Tabela 25 e Figura 10), este valor somente foi alcançado aos 90 dias. Uma possível explicação para este comportamento seria o fato da estrutura da enzima imobilizada, inicialmente, não estar disponível para a ação, e com o decorrer do tempo ocorreu a liberação da estrutura do sítio catalítico que estava complexado com polietilenoglicol. Este perfil de atuação seria acelerado pelo aumento da temperatura.

Comportamento similar ao obtido no experimento foi observado por Rajalakshmi & Sundaram, 1995. Os pesquisadores modificaram a papaína com uma sacarose polimérica e observaram a enzima quando exposta a uma solução de uréia 8M a 37 °C, por um período de 24 horas. Estas condições foram críticas para a papaína, pois além da temperatura elevada a enzima sofreu acréscimo de solução de uréia como agente inibidor. Nesta pesquisa, foi observado que no período de tempo de 4 horas a enzima apresentou aumento

de 170% em relação à atividade enzimática inicial (RAJALAKSHMI & SUNDARAM, 1995).

Miyamoto, Watanabe & Ishikara, 2004 realizaram um estudo onde, a papaína foi modificada com o polímero poli-2-metracrilóilexietilfosforilcolina. A enzima foi mantida à temperatura de 25 °C, sendo observada elevação gradual da atividade, atingindo 150% do valor inicial aos 28 dias. Este fenômeno foi explicado pela formação de agregados da papaína conjugada que é liberada com o tempo (MIYAMOTO, WATANABE & ISHIKARA, 2004b).

O objetivo da preparação de uma enzima modificada é elevar sua estabilidade no decorrer do tempo e promover sua liberação gradual no local de ação, propiciando melhor eficácia terapêutica/cosmética.

Considerando as três temperaturas do estudo, a formulação com papaína modificada apresentou-se mais estável na condição **22 ± 2,0 °C (Tabela 26 e Figura 10)**, onde foi observada elevação da atividade até os 30 dias com posterior estabilização. Na condição geladeira a enzima não apresentou perfil de estabilização até o período de 90 dias. Na condição de estufa a enzima apresentou variação com rápida elevação, nos primeiros 15 dias, e após este período o perfil de atividade da enzima não se estabilizou. A partir dos resultados verificou-se que a condição **22 ± 2,0 °C** é a mais adequada para a papaína modificada, considerando-se os objetivos do tratamento com a enzima. Este resultado pode ser considerado positivo comparado com a formulação que continha a enzima livre e que necessita da condição geladeira **5 ± 1,0 °C** para seu armazenamento mais adequado.

Figura 11 – Variação do valor de pH (%) para as formulações 2, 3, 2M e Gel, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal.

Considerando a variável pH, (Tabelas 21 e 27) e (Figura11), as formulação **2** e **2M** foram as que apresentaram a maior variação, aproximadamente 15% na condição estufa (**$40 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$**), pois como comentado anteriormente para a atividade enzimática o aumento da temperatura promove maior degradação da enzima, propiciando alterações de pH. Nas demais condições a variação foi inferior a 7%, entretanto a porcentagem de variação do

valor de pH se encontra dentro do intervalo adequado para a atividade enzimática da papaína (5 a 7) (VELASCO, 1993; MERCK INDEX, 1996).

Figura 12 – Variação do valor de viscosidade aparente (%) para as formulações 2, 3 e Gel, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal.

Considerando-se os resultados das Tabelas 19 a 24 e Figura 12, a oscilação do valor da viscosidade não ultrapassou **20%** em relação ao inicial, com tendência a elevação, sendo observado para a formulação **2**, em todas as condições apresentadas. Esta formulação apresentava em sua composição a presença do polímero Aristoflex® AVC, que é um emulsificante polimérico não

iônico. Provavelmente houve interação deste polímero com os componentes da formulação e os subprodutos de decomposição da papaína, embora esta oscilação não promoveu mudanças perceptíveis na observação das características organolépticas da preparação.

Figura13 – Variação do valor da condutividade (%) para as formulações 2, 3 e Gel, nas diferentes condições do Teste de Estabilidade Normal.

Embora tenha sido observada variação em torno de 17% na condição **40 ± 2,0 °C** (estufa) para a formulação 3 (Tabela 24, Figura 13), nas condições de **5**

$\pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $22 \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, (Tabelas 22 e 23 e Figura 13) os resultados foram satisfatórios com variações inferiores a 10%. A formulação 2 apresentou variação menor que 10% para todas as condições. Estes resultados indicaram estabilidade das emulsões, verificando a integridade da fase externa. A provável explicação seria a manutenção da estrutura íntegra dos polímeros durante o estudo, não ocorrendo separação de fases da preparação (GRIFFIN et al., 1967; LATREILLE & PAQUIN, 1990; FERRARI, 2002).

6- CONCLUSÕES

Considerando-se as formulações contendo papaína não modificada 0,8% (p/p), para as variáveis valor de pH, de viscosidade e de condutividade, a emulsão contendo o polímero Carbopol® 940 foi a que apresentou resposta mais adequada em todas as condições de temperatura (**$5 \pm 1,0$ °C; $22 \pm 2,0$ °C, $40 \pm 2,0$ °C**), comparada àquela com o polímero Aristoflex® AVC.

A atividade da enzima não modificada, durante o Teste de Estabilidade Normal, das formulações mantidas na condição **$22 \pm 2,0$ °C**, foi influenciada pelo tipo de polímero utilizado nas formulações. A emulsão contendo Aristoflex® AVC manteve aproximadamente o dobro da atividade enzimática comparada a formulação que continha Carbopol® 940. Para as outras temperaturas os diferentes polímeros não influenciaram a perda da atividade.

A temperatura influenciou o comportamento da atividade da papaína não modificada presente nas emulsões, sendo que a **$40 \pm 2,0$ °C**, houve o decaimento mais rápido da atividade enzimática, aproximadamente 90%, em 90 dias.

O armazenamento das formulações na geladeira (**$5 \pm 1,0$ °C**) representa a melhor condição para as emulsões contendo papaína não modificada 0,8% (p/p) e os polímeros Aristoflex® AVC e Carbopol® 940.

O método da imobilização da papaína com o polietilenoglicol alterou o perfil de liberação e da atividade da enzima incorporada na emulsão contendo Aristoflex® AVC, em todas as condições avaliadas. A estabilidade da enzima foi elevada quando comparada com as demais formulações contendo a enzima não modificada.

A condição de **$22 \pm 2,0$ °C** foi a mais adequada para a emulsão contendo papaína modificada e o polímero Aristoflex® AVC.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFAQ, S.; IQBAL, J. Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier. *Electron. J. Biotechnol.*, Valparaíso, v.4, n.3, 2001.
2. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. *Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. São Paulo: Editorial Premier, 2000, p.397-401.
3. ARNON, R. Papain. *Meth. Enzymol.*, New York, v.19, p.226-244, 1970.
4. ASAKURA, Y. *Hidrólise de proteínas da carne bovina pela ação da papaína, bromelina e ficina*. São Paulo, 1982. 96p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
5. BABY, A.R.; MACIEL, C.P.; ZAGUE, V.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.; VELASCO, M.V.R. Ensaios aplicados aos produtos cosméticos e dermatológicos emulsionados. *Int. J. Pharm. Comp. (Edição Brasileira)*, São Paulo, v.6, n.3, p.130-139, 2004.
6. BALLS, A.A. K.; LINEWEAVER, H. Isolation and properties of crystalline papain. *J. Biol. Chem*, Baltimore, v.130, p.669-686, 1939.

De acordo com a NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

7. BANOVA, D. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato seco de Ginkgo biloba L.* São Paulo, 2002. 112p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
8. BARRETT, A.J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem. J.*, London, v.180, p.909-912, 1980.
9. BARRY, R.H. Depilatories. In: BALSAM, M. S., SAGARIN, E., eds. *Cosm., Sci. Technol.* 2.ed. New York: Wiley-Interscience, 1972. v.2, cap.18, p.39-72.
10. BERNARD, D.; MÉHUL, B.; THOMAS-CLIGNON, A.; SIMONETTI, L.; REMY, V.; BERNARD, M.A.; SCHMIDT, R. Analysis of protein with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called "stratum corneum thiol protease" as cathepsin L2. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.120, p.592-600, 2003.
11. BHARDWAJ, A.; LEE, J.; GLAUNER, K.; GANAPATHI, S.; BHATTACHARYA, D.; BUTTERFIELD, D. A. Biofunctional membranes: a EPR study of active site structure and stability of papain non-covalently immobilized on the surface of modified poly(ether) sulfone membranes through the avidin-biotin linkage. *J. Memb. Sci. Amsterdam*, v.119, p.241-252, 1996.

12. BOCK, A.; KOLAC, C.; BORCHARD, G.; KOCH, K.; FUCHS, R.; STREICHHAN, P.; LEHR, C.M. Transport of proteolytic enzymes across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.15, n.9, p.1393-1400, 1998.
13. BRANDÃO, L. *ÍNDICE ABC – Ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes*. São Paulo: 2.ed., Associação Brasileira de Cosmetologia, 1070p. 2000.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries Temáticas: Qualidade 1. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*, Brasília, 47p.,2004.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 79, de 28 de agosto de 2000. *Definição de cosméticos e classificação de produtos*. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 de agosto de 2000.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 02 de junho de 2003.
17. BREUER, H. Depilatories in the eighties. *Cosm. Toilet.*, Carol Stream, v.105, n.4, p. 61-66, 1990.

18. BROOKS, G.; SCHOLTZ, D.B.; PARISH, D.; BENNETT, S. Envelhecimento e o Futuro das Enzimas em Cosméticos. *Cosm. Toilet. (Edição em Português)*, São Paulo, v.11, n.5, p.62-69, 1999.
19. BUROKER-KILGORE, M.; WANG, K.K.W. A coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. *Anal. Biochem.*, New York, v.208, p.387-392, 1993.
20. CHEMYUNION - CATÁLOGO DE PRODUTOS, 2003, 18p.
21. CLARIANT BRASIL - CATÁLOGO DE PRODUTOS FUNCTIONAL CHEMICALS DIVISION, 2001, 3p.
22. COGNIS - CATÁLOGO DE PRODUTOS, 2002, 51p.
23. DOW CORNING- CATÁLOGO: SILICONES DOW CORNING PARA PERSONAL CARE, PRODUCT INFORMATION - PERSONAL CARE DOW CORNING, 2001.
24. CHAMBERS, L.; BROWN, A.; PRITCHARD, D.I.; SCREEDHARAN, S.; BROCKLEHURST, K.; KALSHEKER, N.A. Enzymatically active papain preferentially induces an allergic response in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v.253, p.837-840, 1998.
25. CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. *Bioquímica Ilustrada*. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. cap.4, p.53-65.

26. COPELAND, R.A. Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. New York, Wiley-CH, 306p., 1996.
27. CTFA, Cosmetic Ingredient Handbook, 1ed. The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, 1988, 522p.
28. DARDENNE, L.E.; WERNECK, A.S.; NETO, M.O.; BISCH, P.M. Electrostatic Properties in the Catalytic Site of Papain: A Possible Regulatory Mechanism for the Reactivity of the Ion Pair. *Proteins.: Struct., Funct. Genet.*, Hoboken, v.52, p.236-253, 2003.
29. DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotions. In: SEZEL, A.J. (Ed.) *Newburger's manual of cosmetic analysis.*, Washington, Association of Official Analytical Chemists, cap.4, p.32, 1977.
30. DEG Catálogo de matérias primas: Disponível em: <http://www.deg.com.br/prodlist/n.htm> - acesso em 11/01/2005.
31. DREGER, M.M., ed. *Harry's Cosmeticology*. 8.ed. New York: Chemical Publishing, 8.ed., 2000, p.889-899.
32. EDWARDS, R.; TOWNSHEND, A.; STODDART, B. Chemiluminescence determination of proteases by flow injection using immobilized isoluminol. *Analyst*, London, v.120, p.117-120, 1995.
33. EDWIN, F.; SHARMA, Y.V.; JAGANNADHAM, M.V. Stabilization of molten globule state of papain by urea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v.290, p.1441-1446, 2002.

34. EL-KADI, K.N.; RAWLINGS, A. V.; FEINBERG, C. WATKINSON, A. NUNN, C.C., BATTAGLIA, A., CHANDAR, P.; POCALYKO, N.R.D.J. Broad specificity alkaline proteases efficiently reduce the visual scaling associated with soap-induced xerosis. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.293, p.500-507, 2001.
35. ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.95, p.271-278, 1961.
36. FERRARI, M. *Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba*. Ribeirão Preto, 1998. 143p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
37. FERRARI, M. *Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (Carapa guyanensis)*. Ribeirão Preto, 2002. 142p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
38. FILIPPOVA, I.Y.; LYSOGORSKAYA, E.N.; OKSENOIT, E.S.; RUDENSKAYA, G.N.; STEPANOV, V.M. L-pyroglutamyl-L-phenyllalanyl-L-leucine-p-nitroanilide- A chromagenic substrate for thiol proteinase assay. *Anal. Biochem.*, New York, v.143, p.293-297, 1984.

39. FOCKE, M.; HEMMER, W.; WÖHRL, S.; GÖTZ, M.; JARISCH, R. Cross-reactivity between *Ficus benjamina* latex and fig fruit in patients with clinical fig allergy. *Clin. Exp. Allergy*, Oxford, v.33, p.971-977, 2003.

40. GAUTHIER, F.; MOREAU, T.; LALMANACH, G.; BRILLARD-BOURDET, M.; MARTINO, M.F.D.; JULIANO, L. A new, sensitive fluorogenic substrate for papain based on the sequence of the cystatin inhibitory site. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.306, n.2, p.304-308, 1993.

41. GRASSMANN, W.; SCHOENEBECK, O.V.; EIBELER, H. Z. *PHYSIOL. CHEM*, v.194, p.124, 1930. Apud KIMMEL, J. R. & SMITH, E. L. The properties of papain. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, New York, v.19, p.267-334, 1957.

42. GRIFFIN, W.C.; LYNCH, M.J.; LATHROP, L.B. Emulsions, part one. *Drug Cosmet. Ind.*, New York, v.231, n.10, p.170-173, 1967.

43. GROSS, P.; PFITZER, E.; TOLKER, E.; BABYAKI, M.; KASSCHAK, M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicatic rats. *Arch. Environ. Health*, v.11, p.50-58, 1965. Apud SASMITO, T.; DEMEESTER, J.; BRACKE, M. Review on the production, properties and uses of papain. *Pharm. Tijdschr. Belg.*, Antwerp, v.59, n.2, p.149-158, 1982.

44. GUZMAN, A.V.; GUZMAN, M.G.S. The enzymatic debridement of suppurations necrotic lesions and burns with papain. *J. Int. Coll. Surg.*, Chicago, v.20, n.6, p.695-702, 1953.

- 45.**HABEEB, A.F.S.A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, New York, v.14, p.328-336, 1966.
- 46.** HEBDA, P.A.; FLYNN, K.J.; DOHAR, J.E. Evaluation of the enzymatic debridging agents for removal of necrotic tissue and promotion of healing in porcine skin wounds. *Comp. Clin. Res. Prac.*, v.10, n.3, p.83, 1998.
- 47.**HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.-M. *Manual de Cosmetologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999, p.241-242.
- 48.**HOUSEHOLD PRODUCTS. Disponível em: <http://www.householdproducts.nlm.nih.gov> - acesso em 11/01/2005.
- 49.**HWANG, K.; IVY, A.C. A review of the literature on the potential therapeutic significance of papain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.54, p.147-296, 1951.
- 50.**IMAGE GALLERY. The structure of papain. [Online]. Disponível em: <http://www.delphi.phys.uni-tours.fr/prolysis/images/pap.jpeg>. Acesso em 01/11/04.
- 51.**IONQUÍMICA - CATÁLOGO DE PRODUTOS, 2002, 22p.
- 52.**INTERNATIONAL Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 8.ed. The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association: Washington, D.C., 2000, 1461p.

53. JANSEN, E.F.; OLSON, A.C. Properties and enzymatic activities of papain insolubilized with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.129, p.221-227, 1969.
54. KAMPHUIS, I.G.; KALK, K.H.; SWARTE, M.B.A; DRENTH, J. Structure of Papain Refined at 1.65 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, New York, v.179, p.233-256, 1984.
55. KANAOKA, Y.; TAKAHASHI, T. Synthesis of a Key fluorogenic amide, L-arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (L-Arg-MCA) and its derivatives. Fluorescence assays for trypsin and papain. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.25, p.3126-3128, 1977.
56. KANG, B.; LEE, S.; LEE, D.; KIM, M.; SUN, B.; AN, S.; PARK, J.; KIM, H.; KANG, H.; LEE, S. Stabilization of the proteolytic enzyme in cosmetic formulations through the enzyme-polysaccharide conjugate and multiple emulsion. In: INTERNATIONAL CONGRESS, 11, Berlin, 2000. *Proceedings*. Korea.
57. KANG, C.K.; WARNER, W.D. Tenderization of meat with papain latex proteases. *J. Food Sci.*, Champaign, v.39, p.812-818, 1974.
58. KHAPARDE, S.S.; SINGHAL, R.S. Chemically modified papain for applications in detergent formulations. *Bioresour. Technol.*, Barking, v.78, p.1-4, 2001.

59. KILARA, A.; SHAHANI, M.; WAGNER, F.W. Preparation and properties of immobilized papain and lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v.19, p.1703-1714, 1977.
60. KIMMEL, J.R. & SMITH, E.L. Crystalline Papain. Preparation, specificity and activation. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.207, p.515-531, 1954.
61. KIMMEL, J. R. & SMITH, E. L. The properties of papain. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, New York, v. 19, p.267-334, 1957.
62. KIRSCHKE, H.; WIEDERANDERS, B. Chromogenic peptide substrate, In: *Prot. Enzym.*, New York: Springer-Verlag, 1999, p.11-53.
63. KORITSAS, V.M.; ATKINSON, H.J. An Assay for Detecting Nanogram Levels of Proteolytic Enzymes. *Anal. Biochem.*, New York, v.227, p.22-26, 1995.
64. LATREILLE, B. PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. *J. Food Sci.*, Champaign, v.55, n. 6, p.1666-1668, 1990.
65. LAUWERS, A., RUYSEN, R. Standardization of papain. *Int. Congr. Pharm. Sci.*, Münster, Sept. 1963,. Apud: *Int. Pharm. Abstr.*, Washington, v.1, n.1, abstr. n.30c, 1964.
66. LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier., 2002, p.189-922.

67. LIGHT, A.; FRATER, R.; KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* v.52, p.1276, 1964. Apud ARNON, R. Papain. *Methods Enzymol.*, New York, v.19, p.226-244, 1970.
68. LINDHAL, P.; ALRIKSSON, E.; JÖRNVAL, H.; BJÖRK. Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry*, Washington, v.27, n.14, p.5074-5082, 1988.
69. LOPES, P.S. *Influência da papaína e do óleo de pequi na penetração percutânea do diclofenaco de sódio*. São Paulo, 1999. 149p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo].
70. LOPES, P.S. *Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos*. São Paulo, 2003. 214p. [Dissertação de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
71. LOPES, P.S.; YAMAMOTO, J.K.; PINTO, C.A.S.O.; TAKANO, C.Y.; VELASCO, M.V.R.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M. Validação de metodologia analítica de avaliação da atividade da papaína. *Braz. J. Pharm. Sci.*, São Paulo, v.39, supl. 3, p.214-216, 2003.
72. MAIA, A.M. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico*, São Paulo, 2002. 117p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].

73. MAIA, A.M.; VELASCO, M.V.R.; DAZZI, C. Influência de aminoácidos na estabilização da vitamina C em produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA 14^a EDIÇÃO, 2000, São Paulo. Anais do Congresso Nacional de Cosmetologia 14^a edição, p. 625-636, 2000.
74. MARTIN, A.N.; MEDWICK, T., KING, R.E. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 18.ed. Easton: Mack, 1990, 1928p.
75. MARTINDALE, The Complete Drug Reference, 33.ed. London: Pharmaceutical Press, 2002, p.1647-1648.
76. MARZZOCCO, A.; TORRES, B.B. *Bioquímica Básica. Capítulo Enzimas*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.59-88.
77. MATSUYAMA, H.; TAGUCHI, R.; IKEZAWA, H. Phospholipase D modified with polyethylene glycol derivative. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.39, n.3, p.743-746, 1991.
78. MERCK Index. 12.ed. Whitehouse Station Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., 1996, 1741p.
79. MILLINGTON, R.B.; MAYES, A.G.; BLYTH, J.; LOWE, C.R. A holographic sensor for proteases. *Anal. Chem.*, Washington, v.67, p.4229-4233, 1995.
80. MIYAMOTO, D.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Effect of water-soluble phospholipid polymers conjugated with papain on the enzymatic stability. *Biomaterials.*, Guilford, v.24, p.71-76, 2004 (a).

81. MIYAMOTO, D.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Highly stabilized papain conjugated with water-soluble phospholipids polymer chain having a reacting terminal group. *J. Appl. Polym. Sci.*, Hoboken, v.91, p.827-832, 2004 (b).
82. MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos fitos pela enfermagem. *Rev. Bras. Enferm.*, Brasília, v.40, n.1, p.66-73, 1988.
83. MORETTO, L.D. A estabilidade de fármacos e medicamentos. *Pharmac. Tech.*, São Paulo, v.3, n.4, p.46-48, 1999.
84. MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.19, p.489-501, 2001.
85. MULLER, N.; BORDUSA, F. Assay of diverse protease activities on the basis of a small synthetic substrate. *Anal. Biochem.*, New York, v.286, p.86-90, 2000.
86. MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. *Bioquímica Ilustrada*. 8.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, p.64-108.
87. NEURATH, H., em *Proteolytic enzymes a practical approach*: Oxford University Press Oxford:, 1989, 259p.
88. NOVEON, Catálogo de matérias primas. Disponível em: <http://www.personalcare.noveoninc.com> - acesso em 31/10/2004.

89. OLSSON, S.L.; EK, B.; BJORK, I. The affinity and kinetics of inhibition of cysteine proteinases by intact recombinant bovine cystatin C. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1432, p.73-81, 1999.
90. OSTROSKY E. A. *Sistema para avaliar in vitro a liberação e permeação da vitamina e (α - tocoferol) em formulações tópicas*. São Paulo, 2001. 88p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
91. PIEPER, B.; CALIRI, M.H. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J. Wound. Ostomy. Continence. Nurs*, Saint Louis, v.30, n.4, p.175-183, 2003.
92. PINTO, T.J.A.; FERRARINI, M.; GATTI, R.M. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. *Rev. Farm. Quím.*, São Paulo, v.36, n.1, p.26-36, 2003.
93. PRISTA, L.; BAHIA, M.F.G.; VILAR, E. Depilatórios. In: *Dermofarmácia e cosmética*. Porto. Associação Nacional de Farmácias, v.2, cap.8, p.479-500, 1995.
94. PROTOPA, E.E.; GAISSERT, H.; XENAKIS, A.; AVRAMIOTIS, S.; STAVRIANEAS, N.; SEKERIS, C.E.; SCHENKEL, J.; ALONSO, A. The effect of proteolytic enzymes on hair follicles of transgenic mice expressing the lac Z-protein in cells of the bulge region. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, Amsterdam, v.13, p.28-35, 1999.

95. RAJALAKSHMI, N.; SUNDARAM, P.V. Stability of native and covalently modified papain. *Protein. Eng.*, Oxford, v.8, n.10, p.1039-1047, 1995.
96. RAWLINGS. Trends in stratum corneum research and the mangement of dry skin conditions. *Int. J. Cosmet. Sci.*, Oxford, v.25, n.1-2, p. 63-95, 2003.
97. RIBEIRO, A.M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA. *Encontro Brasileiro de Químicos Cosméticos*. São Paulo, v.10, p.349-375, 1996.
98. RIBEIRO, H.M. Teoria de estabilidade de emulsões cosméticas. *Cosm. Toil.*, São Paulo, (edição em português) v.14, p.88-92, 2002.
99. RIEGER, M.M. Stability. In: *Harry's Cosmetology*. New York: Chemical Publishing, 2000, cap.37, p.889-899.
100. ROBERTSON, B.D.; KWAN-LIM, G.E.; MAIZELS, R.M. A sensitive microplate assay for the detection of proteolytic encimes using radiolabeled gelatin. *Anal. Biochem.*, New York, v.172, p.284-287, 1988.
101. ROHR, M.; BENARD, S.; SCHRADER, A. *Enzymes – powerful anti-ageing and anti oxidant active ingredients investigated by FOITS and detection of ICL-S*. In: International Congress, Berlim, 2000.

- 102.** ROLAND, I.; PIEL G., DELATTRE, L.; EVRARD, B.; Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.263, n.1,2, p. 85–94, 2003.
- 103.** ROWELL, F.J.; CUMMING, R.H.; NITESCU, I. Environmental analysis in the workplace; development of a rapid, sensitive ELISA for monitoring airborne alcalase. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.316, p.247-252, 1995.
- 104.** SASMITO, T.; DEMEESTER, J.; BRACKE, M. Review on the production, properties and uses of papain. *Pharm. Tijdschr. Belg.*, Antwerp, v.59, n.2, p.149-158, 1982.
- 105.** SCHADE S.Z.; JOLLEY, M.E.; SARAUER, B.J.; SIMOMSON, L.G. BODIPY- α -casein, a pH-independent protein substrate for protease assay using fluorescence polarization. *Anal. Biochem*, New York, v.243, p.1-7, 1996.
- 106.** SILVA, F.C.F. *Padronização de métodos analíticos para a determinação de filtros solares em emulsões*. São Paulo, 2000, 116p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo]
- 107.** SIM, Y.C.; LEE, S.G.; LEE, D.C.; KANG, B.Y.; PARK, K. M.; LEE, J.Y.; KIM, M.S.; CHANG, I.S.; RHEE, J.S. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v.22, n.2, p.137-140, 2000.

108. SIM, Y.C.; Nam Y.S.; Shin Y.H.; Shin E.; Kim S.; Chang I.S.; Rhee J.S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as an enzymatic transdermal drug penetration enhancer. *Pharmazie*. Eschborn, v.58, n.4, p.252-256, 2003.
109. SOTO-MERA, M.T.; LOPÉZ-RICO, M.R.; FILGUEIRA, J.F.; VILLAMIL, E.; CIDRÁS. R. Occupational allergy to papain. *Allergy*. Copenhagen, v.55, n.10, p. 983-984, 2000.
110. STARLEY, I.F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S.W. The treatment of pediatric burns using topical papaya. *Burns*, Oxford, v.25, p.636-639, 1999.
111. STERCHI, E.E.; STÖKER, W. Proteolytic Enzymes. Tools and Targes. Berlin: Springer-Verlag. 366p. 1999.
112. SUNDARAM, P.V.; VENKATESH, R. Retardation of thermal and urea induced inactivation of α -chymotrypsin by modification with carbohydrate polymers. *Protein. Eng.*, Oxford, v.11, n.8, p.699-705, 1998.
113. TANG, L.X.; ROWELL, F.J.; CUMMING, R.H. A rapid homogeneous fluorescence assay for subtilisin. *Anal. Lett*, Oxford, v.29, n.12, p.2085-2095, 1996.
114. TANG, L.X.; ROWELL, F.J.; CUMMING, R.H. Monitoring proteolytic enzymes for health and safety in the manufacturing environment. A review. *Anal. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.347, p.235-240, 1997.

115. TANG, L.X.; ROWELL, F.J.; CUMMING, R.H. Rapid and sensitive assay for some protease enzymes using a fluorosubstrate-immobilized bioreactor. *Analyst.*, London, v.120, p.1949-1952, 1995.
116. TRAVERSA, E. *Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo papaína e avaliação da sua eficácia depilatória sobre o folículo piloso*. São Paulo, 2003. 159p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
117. TRAVERSA, E.; OTTOLENGHI, A.T.B.; MENEGOTTO, C.P.; MARCONDES, C.P.; MACHADO-SANTELLI, G.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. *Braz. J. Pharm. Sc.*, São Paulo, v.39, supl.3, p.201-203, 2003.
118. TWINING, S.S. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.*, New York, v.143, n.1, p.30-34, 1984.
119. USP 25; UNITED States Pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002, p.1306.
120. VELASCO, M.V.R. *Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico*. São Paulo, 1993. 144p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].

121. VELASCO, M.V.R.; RODRIGUES, L.B.; DAZZI, C.; YAMAMOTO, J.K.; KANEKO, T.M. Avaliação da estabilidade da solução de papaína 2% p/v pelo método da coagulação do leite. *Rev. Farm. Quim.*, São Paulo, v.32, n.4, p. 8-13, 1999.
122. VICENT, L.C.; BARROS, R.A.; EMPIS, J.M.A. Stability and proteolytic activity of papain in reverse micellar and aqueous media: a kinetic and spectroscopic study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Oxford, v.60, n.3, p.291-297, 1994.
123. VOET, D. Fundamentos de Bioquímica. Donald Voet, Judith G. Voet e Charlotte W. Prat; trad. Arthur Germano Fett Neto (et.al.) – Porto Alegre: Artes Médicas Sul, v.9, p.282-318, 2000.
124. ZHANG, X.; WANG, X.; CHEN, S.; FU, X.; WU, X.; LI, C. Protease-catalyzed small peptide synthesis in organic media. *Enzyme. Microb. Technol.*, Guildford, v.19, p.538-544, 1996.
125. ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D.A. Denaturation studies of active-site labeled papain using electron paramagnetic resonance and fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.*, New York, v. 60, p.623-628, 1991.
126. WENNINGER, J. A.; CANTERBURY, R.C.; MCEWEN, G.N. International Cosmetic Ingredients Dictionary and Handbook, 8.ed. *The Cosmetic, Toiletry and Fragancy Association*, Washington, 2000.