



IARA ROCHA ANTUNES PEREIRA BRESOLIN

**“PURIFICAÇÃO DA ENZIMA BROMELINA DE RESÍDUOS DE
ABACAXI PARA ESTUDO DE ESTABILIDADE EM BASES
DERMATOLÓGICAS”**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

IARA ROCHA ANTUNES PEREIRA BRESOLIN

**“PURIFICAÇÃO DA ENZIMA BROMELINA DE RESÍDUOS DE
ABACAXI PARA ESTUDO DE ESTABILIDADE EM BASES
DERMATOLÓGICAS”**

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscila Gava Mazzola

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA IARA ROCHA ANTUNES PEREIRA BRESOLIN E ORIENTADA
PELO PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI**

Assinatura do orientador

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

B754p Bresolin , Iara Rocha Antunes Pereira
Purificação da enzima bromelina de resíduos de
abacaxi para estudo de estabilidade em bases
dermatológicas / Iara Rocha Antunes Pereira Bresolin. --
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Elias Basile Tambourgi
Coorientador: Priscila Gava Mazzola.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Enzimas - Purificação. 2. Bromelina. 3. Enzimas.
I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Mazzola, Gava
Priscila, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Purification of the enzyme bromelain from pineapple
waste to study stability in dermatological bases

Palavras-chave em Inglês: Enzymes - Purification, Bromelain, Enzymes

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Juliana Moura de Luna, Patricia Bernardi Leite da
Silva, Luiz Carlos Bertevello, Giovana da Silva
Padilha

Data da defesa: 26-02-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

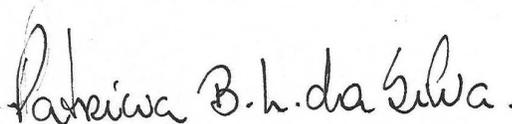
Tese de Doutorado defendida por Iara Rocha Antunes Pereira Bresolin em 26 de Fevereiro de 2013 e aprovada pela banca examinadora:



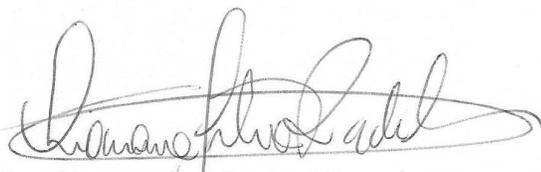
Dr. Elias Basile Tambourgi-orientador



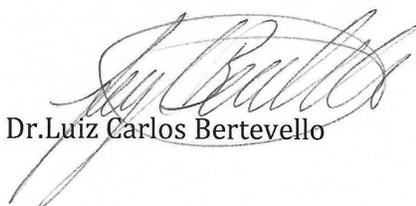
Dra. Juliana Moura de Luna



Dra Patricia Bernardi Leite da Silva



Dra Giovana da Silva Padilha



Dr. Luiz Carlos Bertevello

Dedico este trabalho ao meu marido Igor Bresolin.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida.

Aos meus pais Arlete e Manoel pelo incentivo e amor incondicional.

Ao meu marido Igor pelo auxílio no desenvolvimento dessa tese e, acima de tudo, pelo amor e companherismo.

Aos orientadores Prof. Dr. Elias Basile Tambougi e Prof^a. Dr^a. Priscila Gava Mazzola, pela orientação, competência e profissionalismo.

A todos os professores e funcionários da FEQ e FCM que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante esta jornada, amigos do laboratório, do dia a dia, amigos realmente imprescindíveis em minha vida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a
vitória é o desejo de vencer”
(Mahatma Gandhi)

RESUMO

A bromelina é uma enzima proteolítica encontrada em tecidos vegetais como casca, talo, fruta e folhas de espécies da família *Bromeliaceae*, incluindo o abacaxi (*Ananas comosus*). É uma enzima conhecida por seus efeitos terapêuticos, sendo usada em tratamentos de vários problemas de saúde, como desordens digestivas, feridas, queimaduras e inflamações. Este trabalho teve como objetivo a purificação da enzima bromelina de casca de abacaxi e sua posterior aplicação em bases dermatológicas. Foi demonstrado que é possível purificar bromelina extraída de casca de abacaxi, um resíduo da indústria alimentícia, através de um processo de recuperação e purificação, incluindo precipitação por sulfato de amônio (40-80%), seguido de dessalinização e liofilização, com 75% de recuperação da atividade. Cromatografia de troca iônica com dietilaminoetil-agarose (DEAE-Sepharose) separou polissacarídeos da enzima e esta foi recuperada na etapa de eluição, mantendo sua atividade enzimática. A enzima foi incorporada em creme e loção Lanette, gel de Carbopol e creme e loção da Chemyunion na concentração de 5 mg de enzima por mL de base dermatológica. Essas bases foram submetidas ao teste de centrifugação e teste de estabilidade acelerada durante 90 dias a 25°C (com e sem a incidência de luz solar), 37°C e 4°C, a fim de avaliar a estabilidade da bromelina nas bases dermatológicas. As formulações permaneceram estáveis quanto a suas características organolépticas (aspecto, cor, odor, sensibilidade ao tato) apenas quando mantidas a 4°C, com atividade remanescente de 84,9%, 73,8%, 95,5%, 77,7% e 72,3% após 90 dias de teste em creme e loção Lanette, gel de Carbopol e creme e loção da Chemyunion, respectivamente. Baseando-se nestes resultados, foi possível purificar bromelina de casca de abacaxi e incorporá-la em bases dermatológicas mantendo-se sua atividade mais estável quando estas bases foram mantidas em geladeira a 4°C.

Palavras-chave: *Bromelina, casca de abacaxi, purificação, bases dermatológicas, estabilidade enzimática.*

ABSTRACT

Bromelain is a proteolytic enzyme found in vegetable tissues like peel, stem, fruit and leaves of the *Bromeliaceae* family including pineapple (*Ananas comosus*). Bromelain is known for its therapeutic effects, being useful in the treatment of several health problems such as digestive disorders, burns and inflammation. This work aimed the purification of the enzyme bromelain from pineapple peel for potential therapeutic application in dermatological bases. It was shown that it is possible to purify bromelain extracted from pineapple peel, a waste in food industry, in a downstream processing, including ammonium sulfate precipitation (40-80%), followed by desalting and freeze-drying with a 75% activity recovery. Ion exchange chromatography on diethylaminoethyl-agarose (DEAE-Sepharose) was able to separate polysaccharides from the enzyme, which was recovered in the elution step, maintaining its enzymatic activity. The enzyme was then incorporated in Lanette cream and lotion, Carbopol gel and Chemyunion cream and lotion at a concentration of 5 mg enzyme per mL of dermatological bases. These bases were subjected to centrifugation test and accelerated stability test during 90 days at 25°C (with and without sunlight), 37°C and 4°C, in order to evaluate bromelain stability in a dermatologic formulation. The formulations were stable as its organoleptic characteristics (appearance, color, smell and sensitivity to touch) only when kept at 4°C with activity remaining 84.9%, 73.8%, 95.5%, 77.7 % and 72.3% after 90 days of testing in Lanette cream and lotion, Carbopol gel and Chemyunion cream and lotion, respectively. Based on the results, it was possible to purify bromelain from pineapple peel and to incorporate it in dermatological bases maintaining the activity stabler when these bases were kept in refrigerator at 4°C.

Keywords: *Bromelain, pineapple peel, purification, dermatologic formulation, enzyme stability.*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo Geral	2
1.2. Objetivos Específicos	2
1.3. Plano e etapas do trabalho desenvolvido.....	3
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Pele, feridas e processo de cicatrização.....	4
2.1.1. Feridas	4
2.1.2. Processo de cicatrização	5
2.1.3. Tratamento de feridas	5
2.2. A bromelina.....	7
2.2.1. Obtenção.....	7
2.2.2. Aplicações	9
2.2.3. Purificação	10
2.2.3.1. Sistemas de duas fases aquosas (SDFA)	11
2.2.3.2. Precipitação.....	12
2.2.3.3. Cromatografia de Troca Iônica	13
2.3. Bases Dermatológicas.....	15
2.3.1. Emulsões: Cremes e Loções	16
2.3.2. Géis	16
2.3.3. Desenvolvimento e estabilidade de bases dermatológicas	17
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Materiais	19
3.1.1. Material vegetal	19
3.1.2. Reagentes.....	19
3.2. Métodos	20
3.2.1. Extração e liofilização de bromelina de casca de abacaxi.....	20
3.2.2. Purificação de bromelina por cromatografia de troca iônica.....	20

3.2.3. Isotermas de adsorção de bromelina em gel de DEAE-Sepharose.....	21
3.2.4. Determinação da atividade da bromelina	22
3.2.5. Determinação de proteína total.....	22
3.2.6. Determinação de polissacarídeos.....	22
3.2.7. Eletroforese SDS-PAGE.....	23
3.2.8. Preparação das bases dermatológicas	23
3.2.9. Estudo de estabilidade das bases dermatológicas	26
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Recuperação e Purificação da bromelina de casca de abacaxi	27
4.1.1. Extração, precipitação e liofilização.....	27
4.1.2. Cromatografia de troca iônica	30
4.1.3. Determinação das isotermas de adsorção da bromelina em DEAE-Sepharose.....	32
4.2. Incorporação da bromelina em bases dermatológicas e estudos de estabilidade	35
4.2.1. Teste de centrifugação	36
4.2.2. Teste de estabilidade acelerada.....	37
4.2.2.1. Temperatura ambiente com luz solar indireta	37
4.2.2.2. Temperatura ambiente sem incidência de luz	48
4.2.2.3. Estufa (37°C).....	59
4.2.2.4. Geladeira (4°C)	70
4.2.3. Discussão geral	81
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES.....	84
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de blocos com as etapas desenvolvidas neste trabalho. 3
- Figura 2.** Eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e não-redutoras, utilizando gel de poliacrilamida 12,5%. Faixas: LMW, marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare); 1, extrato cru; 2, bromelina pré-purificada por precipitação com sulfato de amônio (solução de injeção para cromatografia); 3-5, etapas de eluição das cromatografias em pH 5,0, 7,0 e 9,0 respectivamente; 6, marcador de bromelina do talo de abacaxi (Sigma, USA)..... 29
- Figura 3.** Cromatograma de 1,0 mL de solução de bromelina liofilizada (0,3 mg) utilizando tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0 em gel DEAE-Sepharose (leito de 1,0 mL). I: injeção, L: lavagem, E: eluição com 1,0 mol L⁻¹ de NaCl, R: regeneração. 31
- Figura 4.** Dados experimentais da isoterma de adsorção de bromelina em termos de (a) proteína total e (b) atividade enzimática em gel DEAE-Sepharose utilizando fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0, a 25°C. 34
- Figura 5.** Foto do teste de centrifugação: a) creme Lanette, b) loção Lanette, c) gel de Carbopol, d) creme Chemyunion, e) loção Chemyunion. (1) Base sem bromelina; (2) Base com bromelina comercial; (3) Base com bromelina purificada no laboratório. 36
- Figura 6.** Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 43
- Figura 7.** Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 43
- Figura 8.** Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 44
- Figura 9.** Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 44
- Figura 10.** Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 45
- Figura 11.** Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 45
- Figura 12.** Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 46

Figura 13. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	46
Figura 14. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	47
Figura 15. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	47
Figura 16. Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	54
Figura 17. Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	54
Figura 18. Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	55
Figura 19. Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	55
Figura 20. Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	56
Figura 21. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	56
Figura 22. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	57
Figura 23. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	57
Figura 24. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	58
Figura 25. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	58

Figura 26. Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	65
Figura 27. Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	65
Figura 28. Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	66
Figura 29. Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	66
Figura 30. Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	67
Figura 31. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	67
Figura 32. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	68
Figura 33. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	68
Figura 34. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	69
Figura 35. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	69
Figura 36. Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	76
Figura 37. Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	76
Figura 38. Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	77

Figura 39. Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	77
Figura 40. Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	78
Figura 41. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	78
Figura 42. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	79
Figura 43. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	79
Figura 44. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	80
Figura 45. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos de isotermas de adsorção utilizados para ajuste dos parâmetros aos dados experimentais de proteína total e atividade.	22
Tabela 2. Purificação de bromelina de casca de abacaxi.	28
Tabela 3. Balanço de massa de proteína total, polissacarídeos e atividade da cromatografia realizada com o tampão fosfato de potássio 25 mmol L ⁻¹ , pH 7,0.	31
Tabela 4. Parâmetros das isotermas de Langmuir e Langmuir-Freundlich para os dados experimentais de adsorção de bromelina em termos de proteína total.	32
Tabela 5. Parâmetros das isotermas de Langmuir e Langmuir-Freundlich para os dados experimentais de adsorção de bromelina em termos de atividade enzimática.	35
Tabela 6. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.	38
Tabela 7. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.	39
Tabela 8. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.	40
Tabela 9. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.	41
Tabela 10. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.	42
Tabela 11. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.	49
Tabela 12. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.	50
Tabela 13. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.	51
Tabela 14. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.	52
Tabela 15. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.	53
Tabela 16. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C	60
Tabela 17. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C	61
Tabela 18. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C	62
Tabela 19. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C	63

Tabela 20. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C	64
Tabela 21. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C	71
Tabela 22. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C	72
Tabela 23. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C	73
Tabela 24. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C	74
Tabela 25. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C	75
Tabela 26. Resumo das atividades remanescentes de bromelina nas bases dermatológicas estudadas após 90 dias de teste de estabilidade.....	81

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontrada em várias espécies da família *Bromeliaceae*, dentre elas o abacaxi (*Ananas comosus*), estando presente na casca, talo, fruto e folhas.

O abacaxi é considerado a terceira fruta mais importante no mundo com a produção projetada em 18,7 milhões de toneladas para 2014 (FAO, 2005). A fruta é consumida *in natura* ou ainda industrializada na forma de sucos, calda e enlatada. Estes processos industriais são responsáveis pela geração de resíduos ricos na enzima bromelina e esta pode ser recuperada e purificada visando à obtenção de produtos com um maior valor agregado (BARTHOLOMEW et al., 2003).

Dois grandes ramos da atividade econômica fazem uso da bromelina: a indústria alimentícia e a médico-farmacêutica. Em ambos, o foco está em sua atividade enzimática. Na área alimentícia, por exemplo, há relatos do uso de bromelina para o amaciamento de carnes, na clarificação de cerveja, na coagulação de leite de soja, no refino de óleos vegetais, além de ser um dos constituintes de rações animais (MURATA et al., 1987; FREIMAN DE OLIVEIRA, 2001).

Na área médico-farmacêutica, a bromelina tem sido extensivamente utilizada visando aplicações terapêuticas em vários modelos animais (AHLE e HAMLET, 1987; BAHDE et al., 2007 e BHUI et al., 2009). Aplicações como agente anti-inflamatório, digestivo e cicatrizante em processos de debridamento enzimático de tecidos necróticos de úlceras, feridas de queimaduras, bem como efeito antimetastático em modelos de tumor também foram estudados (AHLE e HAMLET, 1987; NAPPER et al., 1994; BHUI et al., 2009).

Para se atingir as características necessárias para a utilização farmacêutica da bromelina, muitos processos têm sido utilizados para aumentar sua pureza e atividade específica a partir de qualquer parte do abacaxi (casca, talo ou fruto). Estes processos podem envolver operações unitárias de extração líquido-líquido (RABELO et al., 2004; BABU et al., 2008; KETNAWA et al., 2010 e FERREIRA et al., 2011), precipitação com etanol, polietilenoglicol (PEG) ou sulfato de amônio (SINGH et al., 2004; DEVAKATE et al., 2009; SILVA et al., 2010; GAUTAM et al., 2010 e SOARES et al., 2011) e técnicas

refinadas baseadas em processos de adsorção, como a cromatografia de troca iônica e de afinidade (HARRACH et al., 1998; SINGH et al., 2004; DEVAKATE et al., 2009; SILVEIRA et al., 2009 e GAUTAM et al., 2010), seguido de passos de liofilização para fins de estocagem (MAURER, 2001 e DEVAKATE et al., 2009).

Para a utilização da bromelina de forma tópica, faz-se necessário sua incorporação em uma base dermatológica, permitindo, desta forma, uma ação local. Diversos fatores podem interferir no desenvolvimento de produtos cosméticos, contendo ou não princípios ativos. Fatores como a composição, as características físico-químicas, os estudos de eficácia e de segurança das matérias-primas e as substâncias ativas incorporadas, além da avaliação das possíveis incompatibilidades na formulação para o estabelecimento das especificações técnicas do produto final, devem ser avaliadas e monitoradas de forma a garantir a qualidade do produto final (SIMMONS, 2000 e SCHUELLER e ROMANOWSKY, 2002). Após a escolha das formulações, torna-se imprescindível a realização de testes de estabilidade em diversas condições de temperatura, luminosidade e umidade (ANVISA, 2004).

1.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo a purificação da enzima bromelina de casca de abacaxi e sua posterior aplicação em bases dermatológicas.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Purificação da enzima bromelina de casca de abacaxi através de um completo processo de “*downstream*” envolvendo sua extração, precipitação por sulfato de amônio, dessalinização, liofilização e cromatografia de troca iônica e posterior estudo de isotermas de adsorção.

✓ Estudo de estabilidade acelerada da enzima bromelina purificada no laboratório em quatro diferentes condições: temperatura ambiente com e sem a presença de luz, estufa (37°C) e geladeira (4°C), nas seguintes bases dermatológicas: creme e loção Lanette, gel de Carbopol e creme e loção com formulação da Chemyunion. Estudo

comparativo das bases contendo a enzima purificada no laboratório e a enzima comercialmente disponível.

1.3. PLANO E ETAPAS DO TRABALHO DESENVOLVIDO

Para se atingir o objetivo proposto, o trabalho foi desenvolvido de acordo com as etapas apresentadas na Figura 1.

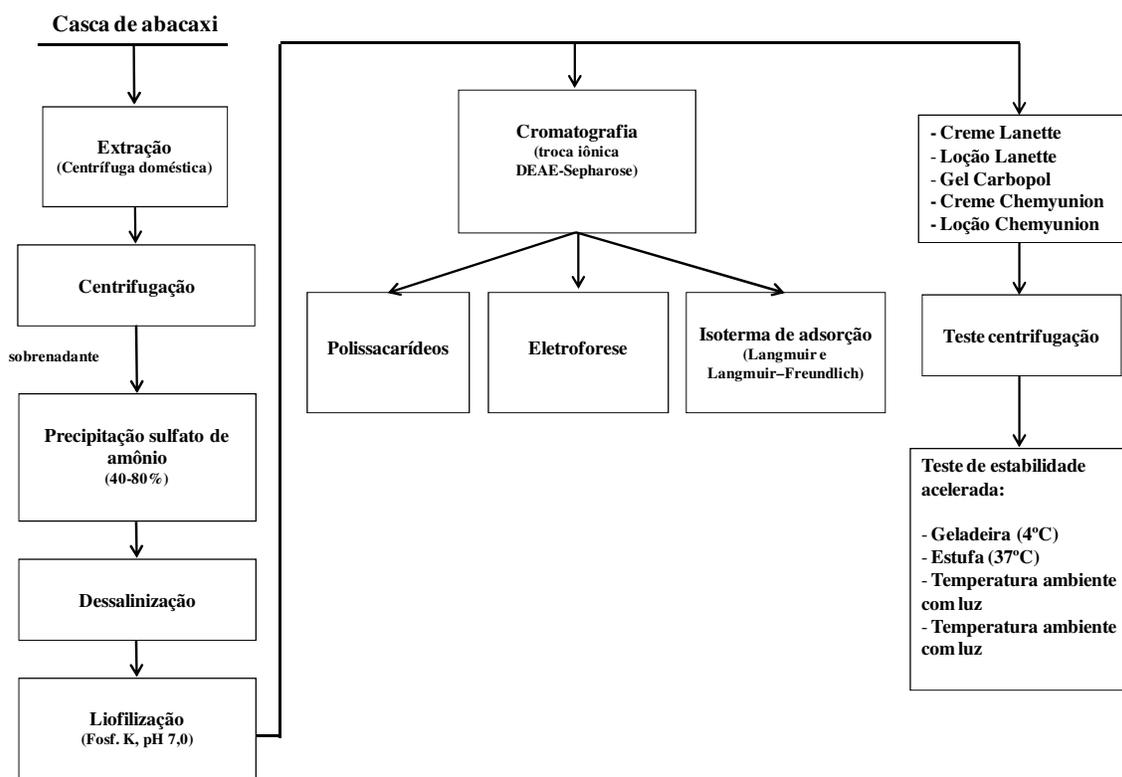


Figura 1. Diagrama de blocos com as etapas desenvolvidas neste trabalho.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados tópicos de conhecimentos básicos necessários para a compreensão do trabalho. A revisão da literatura está dividida nas seguintes partes: pele, feridas e processo de cicatrização; obtenção, aplicação e purificação da bromelina; e desenvolvimento e estabilidade de formulações cosméticas (emulsões e géis).

2.1. PELE, FERIDAS E PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

A pele é considerada o maior e mais complexo órgão do corpo humano, uma vez que corresponde à aproximadamente 15% da massa corporal, sendo composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (DÂNGELO e FATTINI, 1998). A principal função da pele é de revestir e delimitar o corpo humano, além de estar constantemente relacionada com suas variadas atividades biológicas e bioquímicas. Ela contém, pelo menos, cinco diferentes tipos de células que contribuem para sua organização estrutural e demais tipos celulares, provenientes dos sistemas circulatório e imunológico (MENON, 2002; HADGRAFT, 2004; CAMARGO, 2006; QUEIROZ, 2008; HAX, 2009).

2.1.1. Feridas

Uma ferida pode ser denominada como a interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma, de origem física, química, mecânica ou, ainda, desencadeada por uma afecção clínica (CESARETTI, 1998; BLANES, 2004). Desta forma, de acordo com Pereira (2006), as feridas podem ser classificadas em função de sua etiologia (aguda ou crônica); do mecanismo da lesão (amputação, incisa, contusa, escoriação, lacerante ou puntiforme); do grau de contaminação (limpa, limpa-contaminada, contaminada ou infectada); e do grau de perda de tecido (feridas de espessura ou densidade parcial, ou feridas de espessura ou densidade total).

As feridas constituem um gravíssimo problema tanto para os pacientes como também para as instituições de saúde, uma vez que tendem a aumentar o risco de infecção,

dificultando, assim, a recuperação e, como consequência, prolongam a internação, gerando custo elevado e contribuindo para o aumento de índices como a taxa de mortalidade (CANNON e CANNON, 2004; THOMAS, 2006; MACIEL, 2008; REDDY et al., 2008).

2.1.2. Processo de cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, contínuo e complexo, composto por diversas fases sobrepostas, dependendo de vários fatores, locais e gerais, como a localização anatômica, o tipo de pele, a raça e a técnica cirúrgica utilizada (DECLAIR, 2002; BLANES, 2004; CAMARGO, 2006; HAX, 2009). Em termos de aspectos morfológicos, identificam-se três fases da cicatrização: a inflamatória, a proliferativa e a de maturação (BLANES, 2004; HAX, 2009).

A fase inflamatória é uma reação local não específica à lesão do tecido e/ou invasão bacteriana (HAX, 2009). Na fase proliferativa, ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio, compreendendo a formação de tecido de granulação, com proliferação endotelial e de fibroblastos. Na fase de maturação, observam-se dois eventos importantes: a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a regressão endotelial (BLANES, 2004; SCHULTZ et al., 2003). Ocorre o direcionamento das fibras de colágeno, através das colagenases e outras proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas. A remodelação do colágeno tem início na formação do tecido de granulação e permanece por meses após a reepitelização. A cicatriz se torna menos espessa, mais plana, passando de uma coloração rosada para esbranquiçada (BLANES, 2004; HAX, 2009; SCHULTZ et al., 2003).

2.1.3. Tratamento de feridas

Desde os primórdios da humanidade o tratamento de feridas é uma prática observada, sendo adaptado durante os séculos para apresentar melhores resultados. Os primeiros relatos foram descritos na Alexandria, por volta de 3.000 a.C. e tratavam sobre feridas infectadas com bordas avermelhadas e que apresentavam calor. Para o tratamento, a aplicação de folhas de salgueiro, pão mofado ou levedo de cerveja era recomendado. Já os

egípcios foram responsáveis por introduzirem o uso de minerais, como cobre e mercúrio, além do mel para o tratamento de feridas (GOMES e CARVALHO, 2002).

Hipócrates (460 – 370 a.C.), considerado o “pai da medicina”, sugeriu que as feridas deveriam ser tratadas com unguento para a remoção do tecido necrosado, o que ocasionaria redução de inflamação. Já Cornelius Celsus (53 a.C. – 7 d.C.) foi o primeiro a descrever os quatro sinais da inflamação e diferenciou as condutas de tratamento de feridas, classificando soluções para uso tópico em: adstringentes, cáusticos, erosivos e hemostáticos. Por sua vez, Claudius Galeno (129 – 200 d.C.), líder da escola médica de Alexandria, realizava a supuração de feridas com aplicação de unguentos e utilizava substâncias promotoras da cicatrização (GOMES e CARVALHO, 2002; MACIEL, 2008).

O uso de armas de fogo, em consequência das guerras europeias, gerou um novo tipo de ferida, mais difícil de curar, no século XIV. Ambroise Paré, cirurgião francês (1510–1590), reformulou o tratamento desse tipo de feridas, utilizando pomada à base de terebentina, óleo de rosa e gema de ovo em substituição ao óleo fervente, que até então vinha sendo utilizado (BLANES, 2004; GOMES e CARVALHO, 2002).

No período compreendido entre o final do século XIX e o início do século XX, o tratamento de feridas era feito por meio da utilização de agentes tópicos como álcool e antissépticos metálicos com ação antimicrobiana e proteção com coberturas secas. Entre as décadas de 20 e 40 do século XX, foi introduzido o tratamento por meio de pomadas contendo enzimas proteolíticas incorporadas, que tinham como objetivo a realização do debridamento das feridas (GOMES e CARVALHO, 2002; MACIEL, 2008).

Apesar dos grandes avanços tecnológicos e da maior disponibilidade de recursos e informação em decorrência de muitos estudos realizados, ainda existem controvérsias a respeito da melhor terapia tópica para o tratamento de feridas na atualidade (PEREIRA, 2006). O processo que tem sido adotado para auxiliar na escolha do tratamento de feridas consiste na associação da pesquisa e da prática clínica em conjunto com um processo sistemático e contínuo de auto-aprendizado e auto-avaliação, uma vez que tratamentos que não são baseados em evidências científicas não atingem resultados desejados, acabando por submeter o paciente a intervenções ineficazes (PEREIRA, 2006; MACIEL, 2008).

A cicatrização de feridas pode envolver diversos fatores locais e sistêmicos, tais como doenças crônicas e infecciosas, questões socioeconômicas e psicológicas, nutrição,

traumas e cirurgias, necessidade de continuidade da utilização do curativo, além da avaliação do custo-benefício. A escolha do tratamento deve ser adequada à natureza, à localização e ao tamanho da ferida, sendo essencial que o paciente seja acompanhado por uma equipe multidisciplinar, que controle os fatores que interferem no processo cicatricial (FRANCO e GONÇALVES, 2008; MACIEL, 2008).

A terapia tópica de feridas é baseada em estudos científicos sobre a fisiologia de reparação tecidual. Para tornar viável o processo fisiológico, deve-se buscar o favorecimento das condições locais através da terapia tópica, definida como o conjunto de condutas que visam à cura precoce das feridas, compreendendo limpeza, debridamento e cobertura (BLANES, 2004; GOMES e CARVALHO, 2002).

A limpeza da ferida deve ser realizada com uso de técnica e fluido que minimize trauma mecânico e químico, visando à remoção da necrose e também de corpos estranhos do leito da ferida. O uso de antissépticos em feridas tem efeito nocivo, pois, além da citotoxicidade, contribuem para o retardo da cicatrização, não sendo, portanto, o mecanismo mais eficiente para reduzir a contagem bacteriana nas lesões (BLANES, 2004; YAMADA, 1999). O debridamento consiste na remoção de tecidos necrosados aderidos ou de corpos estranhos do leito da ferida, que pode ser realizado por meio do uso de técnicas mecânicas, cirúrgico/instrumental, químicas, enzimáticas, ou até mesmo via autólise (BLANES, 2004; YAMADA, 1999).

2.2. A BROMELINA

2.2.1. Obtenção

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas (proteases) encontrada em tecidos vegetais como casca, talo, fruto e folhas de espécies da família *Bromeliaceae* incluindo o abacaxi (*Ananas comosus*). O abacaxi é considerado a terceira fruta mais importante no mundo com a produção projetada em 18,7 milhões de toneladas para 2014 (FAO, 2005). Além do consumo da fruta *in natura*, o abacaxi é também submetido a processos industriais para obtenção da fruta enlatada, em calda, cristalizada e suco. Estes processos, por sua vez, são responsáveis pela geração de resíduos como casca,

talo e sólidos centrifugados (da produção de suco) que correspondem de 35 a 40% da massa do abacaxi. Uma vez que os subprodutos da indústria de abacaxi têm um apelo comercial baixo, estes subprodutos são utilizados, na maioria dos casos, apenas como constituintes de ração animal (BARTHOLOMEW et al., 2003). Entretanto, é importante ressaltar que estes resíduos são muito ricos na enzima bromelina, que pode ser recuperada e purificada visando à geração de produtos com um maior valor agregado.

A enzima encontrada no talo do abacaxi (EC 3.4.22.32) é sulfidrílica e o grupo sulfidrila é essencial para a atividade proteolítica (BARTHOLOMEW et al., 2003). Por sua vez, a enzima encontrada na fruta (EC 3.4.22.33) é uma proteína ácida e seu ponto isoelétrico (pI) é 4,6, determinado por eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (HALE et al., 2005).

A composição química do abacaxi varia de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a produção ocorre no período do verão e gera frutos com maior teor de açúcares e menor acidez. O abacaxi destaca-se pelo valor energético, devido à sua composição ser rica em açúcares, além de possuir um alto valor nutritivo, especialmente pela presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (A, B₁, B₂, C e Niacina). No entanto, apresenta teor protéico e de gordura inferiores a 0,5% (FRANCO, 1989).

A principal vantagem do uso de proteases do abacaxi quando comparada com proteases de outras plantas é que a enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento da fruta, porém o nível aumenta rapidamente, mantendo-se alto até a fruta estar madura, onde ocorre um pequeno decréscimo (MAURER, 2001). Apesar da leve queda na atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é a única fruta que tem concentração de protease relativamente elevada no estágio maduro. Em outras frutas, como o figo e o mamão, altos níveis de suas proteases, a ficina e a papaína, são encontrados somente quando os frutos estão verdes e, quando ocorre a maturação, sua concentração praticamente desaparece (BARTHOLOMEW et al., 2003).

2.2.2. Aplicações

Dois grandes ramos da atividade econômica fazem uso da bromelina: a indústria alimentícia e a médico-farmacêutica. Em ambos, o foco está em sua atividade enzimática. Na área alimentícia, por exemplo, há relatos do uso de bromelina para o amaciamento de carnes, uma vez que a bromelina hidrolisa a miosina, que é responsável pelas ligações cruzadas entre as fibras da carne (FREIMAN DE OLIVEIRA, 2001). Ainda nesta área, a bromelina foi utilizada em processos de clarificação de cervejas, na coagulação do leite de soja, na modificação das propriedades reológicas da massa destinada à produção de pães, no refino de óleos vegetais, no processamento de biscoitos, dentre outros (MURATA et al., 1987; FREIMAN DE OLIVEIRA, 2001). A bromelina também foi utilizada no campo da nutrição animal, como um constituinte de alimentos destinados a ruminantes, visando atuar como um agente de degradação de proteínas presentes nestes alimentos (TOMANKOVA e KOPECNY, 1995).

Na área médico-farmacêutica, a bromelina tem sido extensivamente utilizada visando aplicações terapêuticas em vários modelos animais (AHLE e HAMLET, 1987; BAHDE et al., 2007 e BHUI et al., 2009). Uma vasta gama de benefícios terapêuticos tem sido atribuída à bromelina, devido à sua ação terapêutica na autoimunidade, inflamação e alergia, assim como a inibição da agregação plaquetária, o alívio da bronquite, melhoria na recuperação de traumas pós-cirúrgicos e de absorção melhorada de fármacos, particularmente de antibióticos (KELLY, 1996; MURAKAWA et al., 2002; ROEP et al., 2002 e SECOR Jr et al., 2009). Aplicações como debridamento enzimático de tecidos necróticos de úlceras, feridas de queimaduras, bem como efeito antimetastático em modelos de tumor também estão apresentados na literatura (AHLE e HAMLET, 1987; NAPPER et al., 1994; BHUI et al., 2009). Devido à sua capacidade de reduzir dor, edema e inflamação, além de potencializar antibióticos, a bromelina pode ser de interesse para os cirurgões plásticos, sendo benéfico nas etapas de pós-operatório (ORSINI, 2006). A bromelina do abacaxi serve também como auxiliar digestivo na quebra de proteínas, já sendo comercializada e manipulada tanto no Brasil quanto no exterior (ROXAS, 2008).

2.2.3. Purificação

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação e técnicas mais modernas com a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade (SCOPES, 1993; LADISCH, 2001; PESSOA JR e KILIKIAN, 2006).

O processo de separação e purificação de bioprodutos, também chamado *downstream processing*, é atualmente um segmento muito importante na indústria, pois pode chegar a representar de 80 a 90% do custo de produção. Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e que, ao mesmo tempo, apresente um baixo custo, é de extrema relevância (CLONIS, 2006).

O ponto chave ao se iniciar um processo de purificação é o grau de pureza exigido para a proteína. Proteínas para fins terapêuticos ou de uso direto em humanos necessitam de um elevado grau de pureza, o que não é necessário, por exemplo, para as enzimas que serão aplicadas em alguns processos industriais. Ao se pensar em um processo de purificação em larga escala, normalmente de 4 a 6 etapas se fazem presentes. Estas etapas podem ser divididas em dois grupos. O primeiro é formado pelos processos de recuperação da proteína: separação e ruptura de células, separação dos fragmentos e concentração da proteína. No segundo grupo o objetivo é purificar a proteína utilizando as etapas de pré-tratamento ou isolamento primário, purificação de alta resolução e refinamento (SCOPES, 1993; LADISCH, 2001; PESSOA JR e KILIKIAN, 2006).

Para se atingir as características necessárias para a utilização farmacêutica, muitos processos têm sido utilizados para aumentar a pureza e atividade específica da bromelina a partir da casca, do talo e do fruto do abacaxi. Esses processos incluem extração líquido-líquido (RABELO et al., 2004; BABU et al., 2008; KETNAWA et al., 2010 e FERREIRA et al., 2011), precipitação com etanol, polietilenoglicol ou sulfato de amônio (SINGH et al., 2004; DEVAKATE et al., 2009; SILVA et al., 2010; GAUTAM et al., 2010 e SOARES et al., 2011) e técnicas refinadas como cromatografia de troca iônica e afinidade (HARRACH

et al., 1998; SINGH et al., 2004; DEVAKATE et al., 2009; SILVEIRA et al., 2009 e GAUTAM et al., 2010), seguido de passos de liofilização para fins de estocagem (MAURER, 2001 e DEVAKATE et al., 2009).

2.2.3.1. Sistemas de duas fases aquosas (SDFA)

A extração líquido-líquido é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Na extração líquido-líquido, a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um constituinte líquido, que seja insolúvel ou parcialmente solúvel, o solvente, no qual o componente a ser extraído da solução, o soluto, é preferencialmente solúvel. O soluto difunde-se no solvente com uma velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as fases e a miscibilidade parcial dos líquidos (CREMASCO, 2002).

A extração de biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre duas fases líquidas. O elevado teor de água, 75% a 80% em massa, garante a manutenção das propriedades biológicas das proteínas. A grande vantagem que os SDFA detêm são que, criteriosamente, recuperam e/ou purificam biomoléculas com uma louvável viabilidade econômica. A inclusão da integração de remoção de sólidos e recuperação de produto, além da facilidade de escalonamento, aliado a elevadas seletividade e recuperação fazem com que SDFAs sejam muito utilizados como etapas de *dowstream processing* das mais diversas biomoléculas, dentre elas a bromelina (RABELO et al., 2004; BABU et al., 2008; KETNAWA et al., 2010 e FERREIRA et al., 2011).

Embora a aplicabilidade do SDFA para a purificação de bromelina tem sido demonstrada na literatura, os esforços necessários para aperfeiçoar sua implementação encontram-se em franco desenvolvimento. Utilizam-se sistemas constituídos por polímeros de várias massas moleculares (polietileno glicol – PEG e trietileno glicol – TEG) e sais de fosfato, cloreto e citrato, tanto no modo batelada como contínuo e em estágios. Entretanto, se a aplicação desta enzima necessitar um elevado grau de pureza, a extração em SDFA não

é suficiente e, nestes casos, há a necessidade de complementar o processo por meio da inclusão de uma ou mais etapas cromatográficas (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

2.2.3.2. Precipitação

Dentre as etapas de recuperação e purificação de biomoléculas, a precipitação é uma das operações que se apresenta com maior destaque, tanto em escala laboratorial quanto industrial, sendo utilizada em virtude de sua simplicidade. O termo precipitação é usado para descrever a operação na qual uma perturbação de natureza física ou química origina a formação de partículas insolúveis a partir de uma solução protéica (CUTLER, 2004).

A precipitação de biomoléculas com o uso de sais é uma etapa de purificação frequentemente encontrada, ocorrendo entre uma primeira etapa de separação sólido-líquido (centrifugação ou filtração), e a purificação final utilizando-se técnicas cromatográficas (LADISCH, 2001). Por apresentar alta capacidade de concentrar a biomolécula de interesse e pelo seu baixo custo, a etapa de precipitação é bastante utilizada.

Dentre os métodos utilizados para a precipitação de biomoléculas destaca-se o *salting-out*, ou seja, a adição de sais, em que a precipitação ocorre pela diminuição da solubilidade da biomolécula ocasionada pela dissolução do sal. Nesta técnica, os íons salinos competem com os grupos polares da biomolécula pelas moléculas de água e, uma vez a camada de hidratação ser parcialmente removida, as interações biomolécula-biomolécula tornam-se relevantes levando à formação de agregados insolúveis (SCOPES, 1993). O sal mais comumente utilizado é o sulfato de amônio, devido à sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução (DEUTSCHER, 1990). Entretanto, a única desvantagem desse método é a necessidade de um tratamento posterior para a remoção do sal (via cromatografia de permeação em gel ou diálise), além de etapas para a separação de outros contaminantes, o que tende a tornar este processo mais oneroso (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

Etapas de precipitação com sulfato de amônio foram utilizadas na faixa de saturação de 40% a 80% por Devakate et al. (2009) que recuperaram aproximadamente 80% de bromelina extraída da fruta abacaxi. A mesma técnica de precipitação, porém em uma faixa

mais estreita de saturação do sulfato de amônio (15-37%), foi utilizada para precipitar bromelina a partir de extratos de folhas da coroa de abacaxi, com aumento de atividade específica na ordem de 70% (SINGH et al., 2004). As elevadas recuperações de atividades específicas obtidas nestes trabalhos (com bromelina do fruto e das folhas do abacaxi) comprovam que a precipitação por sulfato de amônio pode ser uma parte integrante de um *downstream processing* de bromelina a partir da casca do abacaxi, juntamente com a questão de seu baixo custo.

2.2.3.3. Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica é uma técnica de purificação bastante utilizada quando a composição da biomolécula é parcial ou totalmente conhecida. Neste ponto é importante considerar o potencial isoelétrico (pI) da molécula a ser purificada. Na cromatografia de troca iônica, a separação ocorre de acordo com a carga das biomoléculas. Foi constatado que esse é o método de purificação de proteínas mais comumente empregado. Além disso, é utilizado com muita efetividade pelas indústrias de bioquímica fina e farmacêutica para o escalonamento dos processos de isolamento de várias proteínas (SCOPES, 1993).

Desta forma, o conhecimento do pI da biomolécula apresenta fundamental importância na caracterização da mesma durante a extração e nos estágios de purificação, informando igualmente o melhor intervalo de pH na caracterização das propriedades da proteína de interesse. Apesar da disponibilidade de diferentes métodos de purificação de biomoléculas, atualmente a técnica por cromatografia de troca iônica tem sido utilizada com frequência devido ao elevado poder de resolução da mesma (MORAES et al., 2008).

Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem esta técnica, que é baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz cromatográfica. As matrizes trocadoras de íons que possuem grupos funcionais carregados positivamente trocam contra-íons carregados negativamente (ânions) e são chamadas trocadores de ânions. Do mesmo modo, matrizes com grupos funcionais carregados negativamente trocam contra-íons carregados positivamente (cátions) e são chamadas trocadores de cátions. A diferença de afinidade

entre os íons da fase móvel e a matriz é devida a diferenças de carga, sendo possível controlá-la, intensificando-a ou amenizando-as por meio de variações no pH e na força iônica da fase móvel (SPADARO, 2006).

As resinas de troca iônica pode ter sua composição baseada em celulose, agarose, dextrana, sílica, poliacrilato, polivinil ou poliestireno ligadas covalentemente a grupos de carga positiva ou negativa (MORAES et al., 2008). Moléculas com carga de mesmo sinal que a resina são eluídas primeiramente, seguidas por moléculas de cargas opostas, em uma ordem definida pela magnitude da carga apresentada pela biomolécula nas condições da cromatografia. Geralmente, escolhem-se valores de pH e de força iônica (concentração salina) que determinem a ligação da biomolécula de interesse à resina escolhida (SCOPES, 1993; LADISCH, 2001; PESSOA JR e KILIKIAN, 2006).

Uma das vantagens em se aplicar a cromatografia de troca iônica para a separação de purificação de biomoléculas, é que as etapas de adsorção e dessorção (eluição) podem ser efetuadas sob condições amenas, importante para se manter a atividade biológica das biomoléculas. A dessorção pode ser feita aumentando-se a concentração de íons salinos ou alterando-se o pH do meio. O aumento da concentração de íons salinos provoca um aumento na competição pelos grupos funcionais carregados do trocador de íons e, por conseqüência, diminui a disponibilidade destes grupos para interação com as biomoléculas. A eluição por alteração de pH, por sua vez, baseia-se na mudança da carga líquida das biomoléculas, com a conseqüente perda da capacidade de interação com a resina por forças eletrostáticas. Após a completa dessorção, a resina é regenerada de tal forma que os contra-íons originais sejam recuperados e a mesma se encontra pronta para repetir o processo. (SCOPES, 1993; LADISCH, 2001; PESSOA JR e KILIKIAN, 2006).

Harrach e colaboradores em 1998 purificaram duas formas de bromelina de talo de abacaxi através de processo de purificação por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Os componentes básicos principais foram removidos por cromatografia de troca catiônica e as frações não adsorvidas foram posteriormente purificadas por cromatografia de troca aniônica onde de 15 frações proteicas, apenas duas estavam proteliticamente ativas.

Devakate et al., 2009 purificaram bromelina da fruta abacaxi através de cromatografia de troca iônica, alcançando uma pureza 3 vezes maior quando comparada com a purificação por precipitação com sulfato de amônio.

Bromelina do talo e da fruta foram purificadas por cromatografia de troca iônica em leito expandido (em matriz de Amberlite IRA 410) e tiveram um fator de purificação de 12 vezes e aumento em mais que 10 vezes na atividade específica, quando a expansão do leito foi de 10 cm (SILVEIRA et al., 2009).

Diante das elevadas recuperações de atividades da bromelina obtidas nos trabalhos acima citados, a cromatografia de troca iônica mostrou-se promissora para a purificação de bromelina a partir da casca do abacaxi.

2.3. BASES DERMATOLÓGICAS

Bases dermatológicas podem ser definidas como preparações semi-sólidas que contém um ou mais agentes, medicinais ou cosméticos, de uso externo nas diversas partes do corpo humano (pele, sistema capilar, unhas, lábios, etc.) com o objetivo de limpá-las, perfumá-las, alterar sua aparência, corrigir odores corporais e protegê-las ou mantê-las em bom estado. Como exemplos de bases dermatológicas, podem-se citar cremes, loções, géis, pomadas, xampus, condicionadores, sabonetes líquidos e sérum (ANVISA, 2004).

A incorporação de um princípio ativo em uma base dermatológica visa sua administração tópica permitindo uma ação local. Contudo, a habilidade de um fármaco presente em formulações tópicas em permear a pele depende da sua capacidade de liberação do veículo para a pele, e da difusão por esta barreira para seu sítio de ação. Os fármacos aplicados na pele para efeito local incluem agentes anti-sépticos, antifúngicos e antiinflamatórios, assim como emolientes da pele para fins de proteção (AUTON, 2005).

A seguir, serão descritos os principais aspectos teóricos sobre as formulações cosméticas utilizadas neste trabalho: emulsões (cremes e loções) e géis.

2.3.1. Emulsões: Cremes e Loções

As emulsões cosméticas são constituídas por duas ou mais fases, aquosa e oleosa, onde uma se dispersa em outra por meio de um tensoativo adicionado à formulação e que se interpõe entre as fases. Os componentes da formulação se distribuem, de acordo com sua solubilidade, sendo comumente utilizados água deionizada ou destilada, óleos, gorduras, tensoativos, espessantes, umectantes, estabilizantes (antioxidantes, corretivos de pH e conservantes), perfume, corante e substâncias ativas.

A grande vantagem deste tipo de preparação é a possibilidade de serem incorporados ativos hidrossolúveis e lipossolúveis sem perda de estabilidade e/ou modificação em suas características físicas finais (SIQUEIRA, 2004). Quanto à fluidez e a área anatômica aplicada, podemos classificar as emulsões como leite, loção e creme. Podem, também, ser classificadas segundo a função (relacionada aos componentes); aspecto físico; tipo de sistema óleo em água (O/A), água em óleo (A/O), emulsão múltipla (O/A/O e A/O/A) e proporção de fase oleosa e aquosa. O sistema clássico de preparo de emulsões envolve o aquecimento das fases a 70-75 °C, mistura sob agitação e resfriamento adicional (SIMMONS, 2000 e LEONARDI, 2004). Atualmente, há disponíveis no mercado tensoativos poliméricos, que permitem a formação de emulsões a frio, facilitando o preparo.

2.3.2. Géis

A forma cosmética gel é constituída de um sistema semisólido, formado por uma rede de macromoléculas com fase líquida (oleosa ou aquosa) em seu interior, e que forma uma dispersão coloidal de partículas, conferindo aspecto viscoso. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que, quando dispersos em meio aquoso, doam viscosidade a preparação. O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico desta e, portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como no seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo pelo veículo e formação de filme na pele) resultando em diferentes graus de aceitação do mesmo

pelo consumidor (CORRÊA et al., 2005). A consistência dos géis decorre do forte entrelaçamento da fase dispersa que retém e segura o meio de dispersão em sua rede, a qual é responsável por sua viscosidade estrutural (AUTON, 2005; ALLEN Jr. et al., 2007).

Dentre as substâncias utilizadas como geleificantes neste tipo de formulação pode-se citar derivados de celulose (hidroxietil, metil e carboximetilcelulose) e do ácido acrílico, silicatos coloidais de alumínio/magnésio (bentonita e Veegum®), alginatos e polivinilpirrolidona (CORRÊA et al., 2005).

Os tipos de géis mais utilizados como formas farmacêuticas de uso tópico são os géis hidrofílicos (hidrossolúvel, hidrogéis), obtidos pela incorporação de agentes geleificantes à água, ao glicerol ou ao propilenoglicol, tais como tragacanto, amido, celulose, derivados, polímeros de carboxivinil e silicatos de magnésio-alumínio, e os géis hidrofóbicos (oleogéis) constituídos usualmente de parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos com sílica coloidal ou sabões de alumínio ou zinco. Os géis hidrófilos são mais utilizados ou mais comuns, sendo relativamente pequena a quantidade de preparações apresentadas como oleogéis (PRISTA et al., 1990; DRAELOS, 1999; GENNARO, 2004; LEONARDI, 2004; FERREIRA e LEITE, 2008).

2.3.3. Desenvolvimento e estabilidade de bases dermatológicas

Diversos fatores podem interferir no desenvolvimento de produtos cosméticos, contendo ou não princípios ativos. Fatores como a composição, as características físico-químicas, os estudos de eficácia e de segurança das matérias-primas e as substâncias ativas incorporadas, além da avaliação das possíveis incompatibilidades na formulação para o estabelecimento das especificações técnicas do produto final, devem ser avaliadas e monitoradas de forma a garantir a qualidade do produto final (SIMMONS, 2000 e SCHUELLER e ROMANOWSKY, 2002). Após a escolha das formulações, torna-se imprescindível a realização de testes de estabilidade em diversas condições de temperatura, luminosidade e umidade (ANVISA, 2004).

Grande atenção é dada para a utilização de produtos farmacêuticos com base em substâncias ativas naturais devido a provável utilização segura e impacto ambiental

reduzido (ROLIM et al., 2006). A incorporação de extratos vegetais em bases cosméticas requer estudos criteriosos e deve-se levar em conta fatores como a compatibilidade do sistema, cuidando-se do armazenamento do extrato, da escolha dos solventes utilizados na sua dispersão, da temperatura de incorporação na formulação e do material de acondicionamento ou embalagem final. Deve-se garantir a estabilidade da formulação durante todo o período do prazo de validade, mantendo suas características dentro das especificações previamente estabelecidas (BANOVA, 2002 e BABY, 2005).

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Material vegetal

As cascas de abacaxi (*Ananas comosus*), variedade “Pérola” utilizadas neste estudo foram gentilmente doadas pelo mercado local. Estas foram previamente lavadas e utilizadas para a extração de bromelina.

3.1.2. Reagentes

A bromelina comercial de talo de abacaxi (EC 3.4.22.32) na forma liofilizada foi obtida da Sigma (EUA) e utilizada como padrão para os experimentos realizados. O adsorvente DEAE-Sepharose, albumina de soro bovino (BSA), azocaseína, fosfato de sódio dibásico, persulfato de amônio, glicerol, ácido cítrico e fosfato de potássio foram adquiridos da Sigma (EUA). Tris(hidroximetil amino metano) (Tris) e isopropanol foram adquiridos da Merck (Alemanha). Ácido tricloroacético (TCA), ácido clorídrico, ácido acético, metanol e carbonato de sódio foram obtidos da Synth (Brasil). Acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), glicina e N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina (TEMED) foram obtidos da Bio-Rad (EUA). Azul de bromofenol e ditiotriol foram obtidos da Plusone (Suécia). Glutaraldeído e hidróxido de sódio foram obtidos da Nuclear (Brasil). Ácido o-fosfórico foi obtido da Ecibra (Brasil). Azul de comassie brilhante G 250, Carboxyl 940 foram obtidos da Vetec (Brasil). Os marcadores de massa molecular (Fosforilase b, 97 kDa; Albumina, 66 kDa; Ovalbumina, 45 kDa; Anidrase carbônica, 30 kDa; Inibidor de tripsina, 20,1 kDa; α -Lactolbumina, 14,4 kDa) foram adquiridos da GE Healthcare (EUA). Uniox C, Uniox A, Uniliquid, Chemynol, Uniquelan (EDTA), álcool cetosteárico, propilenoglicol, vaselina líquida, glicerina foram obtidos da Chemyunion (Brasil). Nipagin, nipazol, germall e trietanolamina foram adquiridos da Mix das Essências (Brasil). Lanette N e cetiol V foram obtidos da Casa das essências (Brasil). A água utilizada em todos os tampões e soluções foi destilada e deionizada. Todos os outros reagentes químicos foram de grau analítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extração e liofilização de bromelina de casca de abacaxi

As cascas de abacaxi foram moídas sem a adição de água ou tampão, utilizando-se um juicer doméstico. A separação do material sólido foi feita por centrifugação a $8000\times g$ durante 30 minutos a 4°C . O sobrenadante foi mantido a 4°C e as proteínas foram precipitadas utilizando-se sulfato de amônio na faixa de 40-80% de saturação de acordo com DEVAKATE et al. (2009). O sal foi lentamente adicionado ao extrato sob constante agitação e após a completa adição do sal foi mantida a agitação por 30 minutos a 4°C . A suspensão foi centrifugada a $8000\times g$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido no menor volume possível de tampão fosfato de potássio 25 mmol L^{-1} , pH 7,0. Este material foi dessalinizado através de colunas de gel filtração (PD-10, Sephadex G-25 M, GE Healthcare, USA), congelado em nitrogênio líquido e liofilizado de acordo com o procedimento descrito no manual (Lioalfa 6-80 Telstar, Spain).

3.2.2. Purificação de bromelina por cromatografia de troca iônica

A cromatografia foi realizada utilizando um sistema cromatográfico de baixa pressão (Gilson, França) a temperatura ambiente com vazão de $0,5\text{ mL min}^{-1}$. A coluna cromatográfica modelo C 10/10 de 10 mm de diâmetro interno \times 10 cm de altura (GE Healthcare, EUA) foi empacotada com leito de 1,0 mL de DEAE-Sepharose. A coluna foi equilibrada e então com o objetivo de estudar a influência do tampão na adsorção enzimática foram utilizados os seguintes sistemas tamponantes: Mcllavine (fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico) 25 mmol L^{-1} , pH 5,0; Fosfato de potássio 25 mmol L^{-1} , pH 7,0 and Tris-HCl 25 mmol L^{-1} , pH 9,0. Uma solução de bromelina pré-purificada e liofilizada ($0,3\text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada em cada um dos tampões para ser utilizada como alimentação da coluna. Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão até que os valores de adsorção a 280 nm fossem zero. A eluição foi feita aumentando-se a força iônica do tampão (pela adição de $1,0\text{ mol L}^{-1}\text{ NaCl}$). Após cada experimento, a coluna foi regenerada utilizando-se $50\text{ mmol L}^{-1}\text{ NaOH}$, seguida pela lavagem com água. Durante todo o experimento frações de 2,0 mL foram coletadas, quantificadas em termos de proteína total e polissacarídeos pelos métodos de Bradford (1976) e Dubois (1956),

respectivamente. As amostras situadas nos picos de proteínas foram agrupadas e medida atividade enzimática da bromelina pelo método da azocaseína (SARATH et al., 1989) e analisada por eletroforese SDS-PAGE, sob condições desnaturantes e não redutoras.

3.2.3. Isotermas de adsorção de bromelina em gel de DEAE-Sepharose

Para determinação de isoterma de adsorção de bromelina em gel de DEAE-Sepharose, foram realizados experimentos a 25°C em tubos Eppendorf contendo 50 µL de gel como descrito na literatura para outras proteínas (BRESOLIN et al., 2009; BRESOLIN et al., 2010; BRESOLIN et al., 2011; BRESOLIN e BUENO, 2012). O gel DEAE-Sepharose foi equilibrado com o tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0 e então 1,0 mL de solução enzimática (concentração de proteína total de 0,4 a 14,2 mg mL⁻¹ e atividade enzimática de 0,3 a 8,2 U mL⁻¹) foram adicionadas nos tubos. Os tubos foram agitados a 10 rpm por 1 hora para se estabelecer o equilíbrio. Após esse período, a concentração de proteína no equilíbrio (C*) foi determinada pelo método de Bradford (1976) e a atividade enzimática no equilíbrio (A*) foi determinada utilizando-se o método da azocaseína (SARATH et al., 1989), ambos para a fase líquida.

A massa de proteína adsorvida por volume de gel (mg mL⁻¹), Q_{TP}*, e a atividade adsorvida por volume de gel (U mL⁻¹), Q_A*, foram respectivamente calculadas pela diferença entre a quantidade de proteína ou atividade adicionada e a quantidade restante na fase líquida após o equilíbrio dividido pelo volume do adsorvente. O gráfico de Q_{TP}* versus C* e Q_A* versus A* são as isotermas de equilíbrio. Os parâmetros dos modelos de Langmuir (Eq. (1)), e Langmuir-Freundlich (Eq. (2)), apresentados na Tabela 1, foram ajustados utilizando-se o software Origin® (Microcal, EUA).

Os parâmetros das Eq. (1) e Eq. (2) são descritos como: Q_m é a capacidade máxima de ligação de proteínas; Q_{m|A} é a capacidade máxima de ligação em termos de atividade; K_d e K_{d|A} são as constantes de dissociação; K_{dLF} e K_{dLF|A} são as constantes de dissociação aparente e n é o coeficiente de Langmuir-Freundlich, que indica a presença (n > 1) ou ausência (n < 1) de cooperatividade.

Tabela 1. Modelos de isotermas de adsorção utilizados para ajuste dos parâmetros aos dados experimentais de proteína total e atividade.

Modelo	Proteína total	Atividade	
Langmuir	$Q_{TP}^* = \frac{Q_m C^*}{K_d + C^*}$	$Q_A^* = \frac{Q_m _A A^*}{K_{d _A} + A^*}$	Eq. (1)
Langmuir-Freundlich	$Q_{TP}^* = \frac{Q_m (C^*)^n}{K_{dLF} + (C^*)^n}$	$Q_A^* = \frac{Q_m _A (A^*)^{n_A}}{K_{dLF _A} + (A^*)^{n_A}}$	Eq. (2)

3.2.4. Determinação da atividade da bromelina

A atividade de protease foi determinada utilizando-se o método da azocaseína (SARATH et al., 1989). A mistura reacional continha 0,2 mL de solução de azocaseína 2% (m/v), 0,2 mL de solução enzimática diluída apropriadamente no tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0. Após 10 min de incubação a 37°C, a reação foi parada pela adição de 1,2 mL de solução de TCA 5% (m/v). A mistura foi centrifugada a 6000×g por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 440 nm. O branco para zerar o equipamento foi feito seguindo-se o mesmo procedimento, porém com a ausência da enzima. Uma unidade de protease (U) é definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar (e solubilizar em TCA) um micromol de equivalente de tirosina por minuto, a partir de caseína solúvel em condições de ensaio padrão.

3.2.5. Determinação de proteína total

Determinou-se a concentração de proteínas totais nas amostras utilizando o procedimento descrito por Bradford (1976), com albumina do soro bovino (BSA) como proteína de referência. A intensidade de cor foi medida a 595 nm.

3.2.6. Determinação de polissacarídeos

O polissacarídeo presente nas amostras foi determinado pelo método de Dubois (1956) utilizando glicose como padrão. Amostras de polissacarídeos ficam da cor amarelo-

alaranjado quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado. A cor apresentada nesta reação foi medida a 480 nm.

3.2.7. Eletroforese SDS-PAGE

Amostras de proteínas foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida na concentração de 12,5% sob condições desnaturantes e não-redutoras (sem a presença de β -mercaptoetanol) de acordo com o protocolo apresentado por Laemmli (1970) utilizando-se o equipamento Mini-Protean III System (Bio-Rad, EUA). A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100 °C por 10 min. Alíquotas de 15 μ L de cada amostra e 5 μ L de marcador de baixa massa molecular foram aplicadas no gel. O gel foi submetido a uma voltagem de 180 V, em cuba vertical. A coloração do gel foi feita com nitrato de prata, conforme Morrissey (1981).

3.2.8. Preparação das bases dermatológicas

As formulações avaliadas, apresentadas a seguir, foram aniônicas: creme e loção Lanette e gel de Carbopol e não-iônicas: creme e loção com formulação da Chemyunion. Em todas as bases foram incorporadas separadamente bromelina purificada no laboratório 0,5% (m/v), bromelina comercial 0,5% (m/v) (controle positivo) e estas mesmas formulações foram analisadas sem incorporação de bromelina (controle negativo). Todas as bases foram armazenadas em frascos de vidro e tampadas. Para medida de atividade enzimática, proteína total da enzima incorporada nas bases e pH, foi necessário diluir a amostra em água 10 vezes.

Creme Lanette:

Fase A

Lanette N (álcool cetoestearílico).....	15%
Cetiol V (oleato de decila).....	3%
Óleo Mineral (vaselina líquida).....	2%
Nipazol (propilparabeno).....	0,05%

Fase B

Nipagin (metilparabeno).....	0,15%
Propilenoglicol.....	5%
Água destilada.....	q.s.p. 100%

Colocaram-se todos os reagentes da fase A em um becker e os reagentes da fase B em outro becker. Aqueceram-se ambas as fases até 70°C e adicionou-se lentamente e sob constante agitação a fase B sobre a fase A. Continuou-se a agitação até esfriar.

Loção Lanette

Fase A

Lanette N (álcool cetoestearílico).....	6%
Cetiol V (oleato de decila).....	5%
Óleo Mineral (vaselina líquida).....	5%
Nipazol (propilparabeno).....	0,1%

Fase B

Nipagin (metilparabeno).....	0,15%
Glicerina.....	5%
Água destilada.....	q.s.p. 100%

Para se preparar a loção Lanette seguiram-se os mesmos passos descritos para a obtenção do creme Lanette.

Gel de Carbopol

Carbopol 940.....	1%
Propilenoglicol.....	5%
Nipagin (metilparabeno).....	0,15%
Germall 115 (imidazolidinil uréia).....	0,3%
Trietanolamina.....	q.s.p. pH~ 5
Água destilada.....	q.s.p. 100%

Pesou-se o Carbopol 940 e dissolveu-se em água no menor volume possível. Em outro recipiente misturou-se o nipagin e o propilenoglicol. Misturou-se o conteúdo dos dois recipientes, completou-se o volume com água e adicionou-se gotas de trietanolamina até ajustar o pH.

Creme Chemyunion

Fase A

Uniox C.....	10%
Óleo Mineral (vaselina líquida).....	2%
Álcool cetosteárico.....	1,5%
Uniliquid.....	1,5%
Chemynol.....	0,5%

Fase B

Uniquelan (EDTA).....	0,10%
Água destilada.....	q.s.p. 100%

Colocaram-se todos os reagentes da fase A em um becker e os reagentes da fase B em outro becker. Aqueceram-se ambas as fases até 80°C e adicionou-se lentamente e sob constante agitação a fase B sobre a fase A. Manteve-se a temperatura e agitação por aproximadamente 10 min. Continuou-se a agitação até esfriar.

Loção Chemyunion

Fase A

Uniox A.....	4%
Óleo Mineral (vaselina líquida).....	2%
Álcool cetosteárico.....	2%
Uniliquid	2%
Chemynol.....	0,5%

Fase B

Uniquelan (EDTA).....	0,10%
Propilenoglicol.....	2%
Água destilada.....	q.s.p. 100%

Para se preparar a loção Chemyunion seguiram-se os mesmos passos descritos para a obtenção do creme Chemyunion.

3.2.9. Estudo de estabilidade das bases dermatológicas

O estudo de estabilidade foi realizado de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Séries Temáticas: Cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos (ANVISA, 2004).

a) Teste de centrifugação

Realizou-se o teste de centrifugação com todas as bases estudadas, controle positivo e negativo a 3000×g durante 30 minutos.

b) Estabilidade Acelerada (Estabilidade normal ou exploratória)

Realizou-se o teste de estabilidade acelerada com todas as bases que foram aprovadas no teste de centrifugação. O teste foi realizado à temperatura ambiente com e sem a presença de luz, em geladeira (4°C) e em estufa (37°C). Foram avaliados os seguintes parâmetros: características organolépticas (aspecto, cor, odor e sensibilidade ao tato), pH, proteína total e atividade enzimática. As amostras foram avaliadas nos tempos: 0, 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados experimentais obtidos nesta tese de doutorado, bem como a discussão dos mesmos. Os resultados estão subdivididos em duas partes. A primeira delas trata dos aspectos inerentes à recuperação e purificação da bromelina a partir de resíduos de abacaxi (casca), que incluiu operações de extração, precipitação, liofilização e cromatografia. Na segunda etapa, a bromelina purificada foi incorporada em cinco diferentes bases dermatológicas (creme e loção Lanette, gel de Carbopol e creme e loção Chemyunion), sendo apresentados e discutidos os resultados dos testes de estabilidade acelerada das formulações, bem como dos controles positivo e negativo.

4.1. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA BROMELINA DE CASCA DE ABACAXI

4.1.1. Extração, precipitação e liofilização

Bromelina de casca de abacaxi foi extraída e pré-purificada por precipitação com sulfato de amônio na faixa de 40-80% de saturação, onde 75% de bromelina foi recuperada. Estes resultados estão de acordo com os dados experimentais reportados por Devakate et al. (2009) que recuperaram aproximadamente 80% de bromelina da fruta abacaxi por precipitação com sulfato de amônio na mesma faixa de saturação. Após a precipitação o material precipitado foi ressuscitado, dessalinizado e liofilizado para estocagem, assim como recomendado por Maurer (2001). Os resultados de atividade enzimática e concentração de proteína total das amostras contendo bromelina antes e após a liofilização estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Purificação de bromelina de casca de abacaxi.

	Extrato cru	Precipitação^a	Liofilização^b
Volume (mL)	1800	500	-
Atividade (U mL ⁻¹) ^c	0,13	0,35	0,31
Atividade total (U)	234	175	-
Recuperação de atividade (%)	100	75	-
Proteína total (mg mL ⁻¹) ^d	0,25	0,31	0,28
Atividade específica (U mg ⁻¹) ^e	0,52	1,13	1,11
Fator de purificação ^f	1	2,2	-

^a Refere-se ao precipitado ressuspendido e dessalinizado (faixa de 40-80%)

^b Refere-se a solução 1% (M/V)

^c Atividade da bromelina: Determinada de acordo com o método da Azocaseína, Sarath et al. (1989).

^d Proteína total: Determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

^e Atividade específica: Atividade da bromelina dividida por proteína total

^f Em termos de atividade específica

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que a atividade específica aumentou 2,2 vezes após a liofilização (após precipitado, ressuspendido e dessalinizado). Quando o fruto do abacaxi foi submetido a mesma faixa de precipitação, porém a dessalinização foi feita por diálise, um aumento similar da atividade específica foi obtido por Devakate e colaboradores (2009). Precipitação por sulfato de amônio (15-37%) também foi utilizado por Singh et al. (2004) para precipitar bromelina das folhas da coroa de abacaxi, com aumento similar de atividade específica alcançado após essa etapa de purificação.

A eletroforese SDS-PAGE (Figura 2) mostra que a precipitação por sulfato de amônio foi capaz de pré-purificar o extrato cru (faixa 1) quando comparado a amostra presente na faixa 2. Bromelina de casca de abacaxi possui duas massas moleculares, aproximadamente 20 and 30 kDa, similar a bromelina do talo de abacaxi obtida comercialmente da Sigma (USA) que foi utilizada como marcador padrão, que possui a banda mais intensa em torno de 30 kDa. Entretanto, vários autores caracterizaram a bromelina do fruto e do talo como tendo massas moleculares na faixa de 24,5 a 37 kDa (FERREIRA et al., 2011; GAUTAM et al., 2010; SILVEIRA et al., 2009; MURACHI, 1976; SILVERSTEIN E KEZDY, 1975; WHARTON, 1974; TAKAHASHI et al., 1973; OTA et al., 1972). Além das diferentes fontes de bromelina (casca, fruta e talo), outros

parâmetros como a espécie do abacaxi, maturação e tamanho, podem também afetar a quantidade de proteína e atividade enzimática (BARTHOLOMEW et al., 2003).

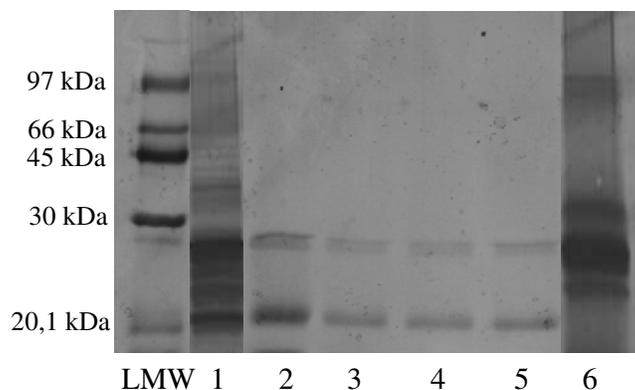


Figura 2. Eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e não-redutoras, utilizando gel de poliacrilamida 12,5%. Faixas: LMW, marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare); 1, extrato cru; 2, bromelina pré-purificada por precipitação com sulfato de amônio (solução de injeção para cromatografia); 3-5, etapas de eluição das cromatografias em pH 5,0, 7,0 e 9,0 respectivamente; 6, marcador de bromelina do talo de abacaxi (Sigma, USA).

A fim de comparar o efeito do processo de liofilização, uma solução de 1% (M/V) da bromelina comercial liofilizada (Sigma, USA) foi preparada e atividade e quantidade de proteína foram determinadas. Os resultados mostraram que a amostra pre-purificada de bromelina em nosso laboratório tem atividade específica 3 vezes maior que a amostra de bromelina comercial ($0,38 \text{ U mg}^{-1}$), porém, a enzima comercial possui maior quantidade de proteína total ($1,60 \text{ mg mL}^{-1}$). A comparação foi realizada utilizando-se bromelina do talo da Sigma, porque não há bromelina da casca comercialmente disponível.

A liofilização visa reduzir o teor de umidade da amostra, que é fortemente recomendado para fins de armazenamento (MAURER, 2001; DEVAKATE et al., 2009). Entretanto, devido a algumas perdas de atividade durante o processo de liofilização, a atividade específica foi reduzida em 5,2%, semelhante à perda de atividade de bromelina da fruta relatado por Devakate et al. (2009).

4.1.2. Cromatografia de troca iônica

Após a pré-purificação do extrato de casca de abacaxi, a cromatografia de troca iônica foi realizada com o objetivo de aumentar a atividade específica da bromelina. Foi utilizado um leito de 1,0 mL de DEAE-Sepharose e foram utilizados os seguintes tampões a 25 mmol L⁻¹: McIlvaine, pH 5,0; fosfato de potássio, pH 7,0 e Tris-HCl, pH 9,0. A bromelina liofilizada foi dissolvida em cada um dos tampões, a uma concentração de 0,3 mg mL⁻¹, que então foram utilizadas separadamente como alimentação da coluna cromatográfica.

Para todas as condições estudadas, a bromelina permaneceu adsorvida em DEAE-Sepharose, que é um adsorvente carregado positivamente nos valores de pH estudados. A bromelina pode ser recuperada na etapa de eluição, e menos de 4% das proteínas totais foram detectadas na etapa de lavagem das cromatografias. De acordo com a eletroforese da Figura 2, as duas bandas de proteínas do material injetado (massa molecular de aproximadamente 20 e 30 kDa) foram recuperadas na etapa de eluição, independente do pH e da natureza do tampão de adsorção. Estes resultados demonstram que não foi possível separar essas proteínas nos processos cromatográficos estudados. Entretanto, como bromelina compreende um grupo de enzimas proteolíticas (não apenas uma enzima), acredita-se que estas sejam duas bandas de enzima, uma vez que a atividade foi mantida após a eluição.

A bromelina permaneceu adsorvida em DEAE-Sepharose provavelmente por causa da predominância de grupos acessíveis carregados negativamente. A bromelina da fruta possui pI de 4,6 (BARTHOLOMEW, 2003) e os resultados obtidos nas cromatografias nos leva a supor que a enzima da casca de abacaxi também possui pI < 5,0 (menor pH estudado). O maior fator de purificação em termos de atividade foi encontrado na cromatografia utilizando fosfato de potássio, pH 7,0. Corzo et al. (2012) encontraram que valores ótimos de pH da bromelina da fruto estão em torno de 7,0, utilizando azocaseína e azoalbumina como substrato para medir a atividade proteolítica.

As frações cromatográficas do experimento realizado em pH 7,0 foram analisadas em termos de proteína total, polissacarídeos e atividade enzimática (Figura 3) conforme resumido na Tabela 3. De acordo com a Figura 3, a cromatografia pode separar polissacarídeos (que foram detectados na etapa de lavagem) das enzimas (recuperadas na

etapa de eluição). A bromelina eluída foi recuperada com apenas 2,3% de polissacarídeos inicialmente presentes no extrato liofilizado, assim, resultando no aumento da atividade específica.

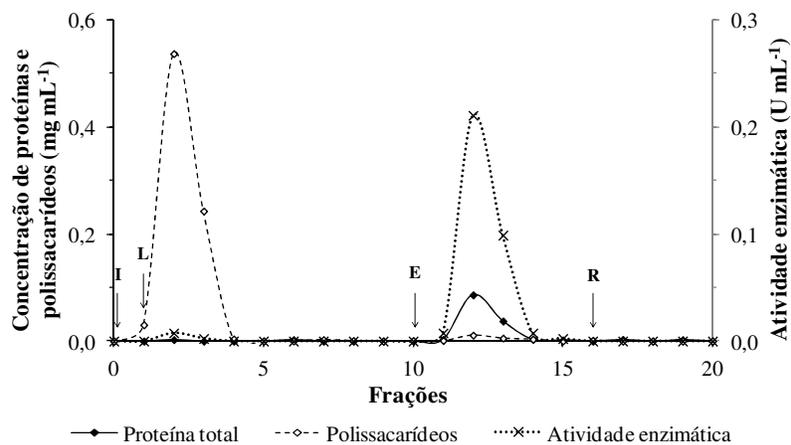


Figura 3. Cromatograma de 1,0 mL de solução de bromelina liofilizada (0,3 mg) utilizando tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0 em gel DEAE-Sepharose (leito de 1,0 mL). I: injeção, L: lavagem, E: eluição com 1,0 mol L⁻¹ de NaCl, R: regeneração.

Tabela 3. Balanço de massa de proteína total, polissacarídeos e atividade da cromatografia realizada com o tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0.

Etapas	Proteína total	Polissacarídeos	Atividade	Atividade específica
	(mg) ^a	(mg) ^b	(U) ^c	(U mg ⁻¹) ^d
Injeção	0,28	0,88	0,31	1,11
Lavagem	0,01	0,82	0,00	0,00
Eluição	0,27	0,02	0,33	1,22
Regeneração	0,01	0,00	0,00	0,00

^a Proteína total: Determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

^b Polissacarídeos: Determinada de acordo com o método de Dubois (1956).

^c Atividade da bromelina: Determinada de acordo com o método da Azocaseína, Sarath et al. (1989).

^d Atividade específica: Atividade da bromelina dividida por proteína total

4.1.3. Determinação das isotermas de adsorção da bromelina em DEAE-Sepharose

Uma vez determinadas as melhores condições de purificação da bromelina, que consistiu na utilização de DEAE-Sepharose, utilizando o tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0, foram realizados experimentos em frascos agitados visando à determinação da isoterma de adsorção da bromelina em termos de proteína total e atividade enzimática. Os experimentos foram conduzidos em batelada, à temperatura ambiente (em torno de 25 °C), visando avaliar parâmetros termodinâmicos como a capacidade máxima de ligação, constante de dissociação, constante de dissociação aparente e parâmetro de cooperatividade. Estes dados foram avaliados somente em termos de proteína total e atividade enzimática, uma vez que menos de 2,5% de polissacarídeos permaneceram adsorvidos, conforme resultados apresentados na Tabela 3.

Os dados experimentais foram analisados utilizando-se os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich (Tabela 4). A comparação entre o perfil em termos de proteína total experimental e os modelos ajustados aos dados encontra-se apresentado na Figura 4a.

Tabela 4. Parâmetros das isotermas de Langmuir e Langmuir-Freundlich para os dados experimentais de adsorção de bromelina em termos de proteína total.

Parâmetros	Langmuir	Langmuir-Freundlich
Q _m (mg mL ⁻¹ gel)	17,0 ± 0,5	15,6 ± 0,6
K _d (mol L ⁻¹)	(6,8 ± 0,6) × 10 ⁻⁵ à (8,7 ± 0,8) × 10 ⁻⁵	-
K _{dLF} (mol L ⁻¹)	-	(6,2 ± 0,6) × 10 ⁻⁵ à (7,9 ± 0,8) × 10 ⁻⁵
n	-	1,23 ± 0,10
R ²	0,992	0,995
Chi ²	0,252	0,170

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, ambos os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich descrevem satisfatoriamente os dados de adsorção de bromelina em termos de proteína total. A presença de cooperatividade positiva (n = 1,23)

no modelo de Langmuir-Freundlich, pode ocorrer devido à natureza heterogênea da adsorção (interações multiponto ou heterogeneidade da superfície), onde uma molécula de bromelina adsorvida favorece a adsorção de outras moléculas de bromelina (JOHNSON E ARNOLD, 1995).

A capacidade máxima de adsorção da bromelina (Q_m) em DEAE-Sepharose é de 15,6 e 17,0 mg mL⁻¹ (46,7 e 50,9 mg g⁻¹; onde 1 mL de gel = 0,33 g de acordo com o fabricante). Os dois valores de K_d são devido ao fato da eletroforese da bromelina purificada possuir duas bandas de proteínas de diferentes massas moleculares. Estes valores são da mesma ordem de grandeza dos valores experimentais para adsorção de bromelina em adsorventes de nanopartículas magnéticas sem recobrimento (MNPs) e nanopartículas magnéticas recobertas com quitosana (CS-MNPs) (24,0 and 48,2 mg g⁻¹) reportado por Song et al. (2011). Entretanto, estes autores também incorporaram o corante Red 120 ao CS-MNPs, onde aumentaram a capacidade de ligação da bromelina nas partículas para 102,6 mg g⁻¹ devido ao efeito misto de diferentes mecanismos de interação como interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio entre o Red 120 imobilizado e as moléculas de bromelina. O valor da constante de dissociação (K_d) foi na ordem de 10⁻⁵ mol L⁻¹, similar ao apresentado para o Red 120-CS-MNPs (SONG et al., 2011) indicando que DEAE pode ser considerado um adsorvente de média/baixa afinidade para adsorção de bromelina (VIJAYALAKSHMI, 1989).

Dados de isoterma em termos de atividade enzimática foram também analisados utilizando os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich (Figura 4b e Tabela 5). Um ótimo ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich foi obtido ($R^2 = 0,993$). As capacidades máximas de adsorções ($Q_m|_A$) em DEAE-Sepharose foram de 15,7 e 18,8 U mL⁻¹. Esses valores são aproximadamente duas vezes maiores que os valores obtidos na adsorção de bromelina do talo em Amberlite IRA 410, resina de troca iônica reportado por Silveira et al. (2009), onde a capacidade máxima de adsorção encontrada foi 9,2 U mL⁻¹ de resina, utilizando o modelo Langmuir. A constante de dissociação ($K_d|_A$) e constante de dissociação aparente ($K_{dLF}|_A$) em termos de atividade foram 0,23 e 0,77 U mL⁻¹, na mesma ordem de grandeza reportada por Silveira et al. (2009) que foi de 0,59 U mL⁻¹.

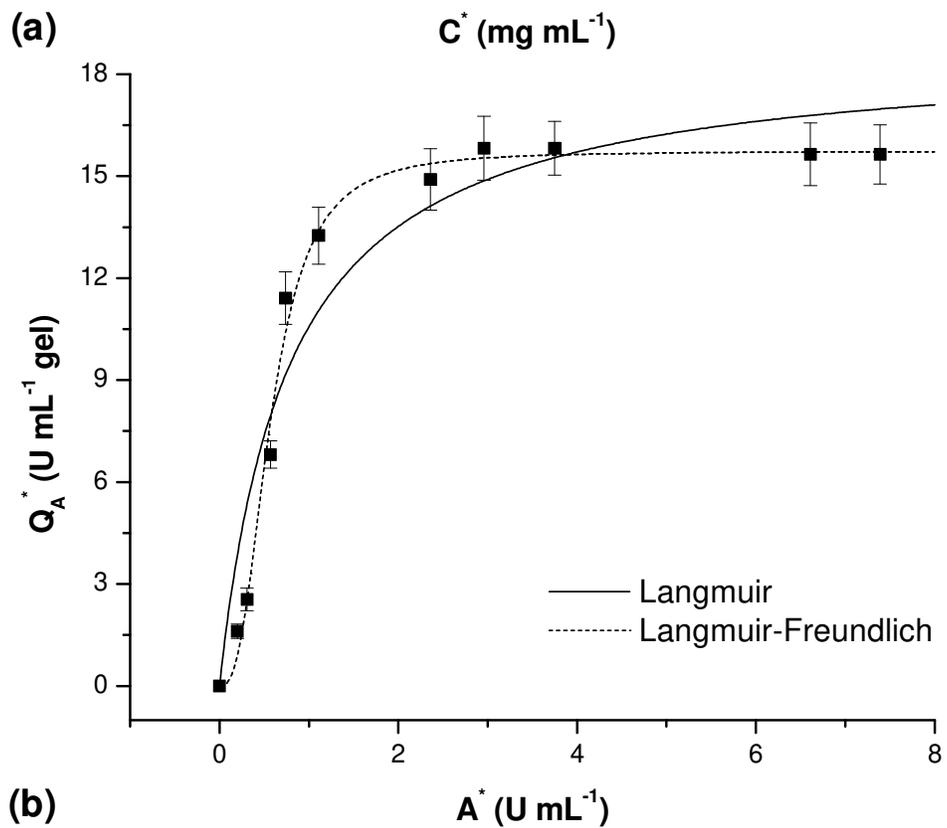
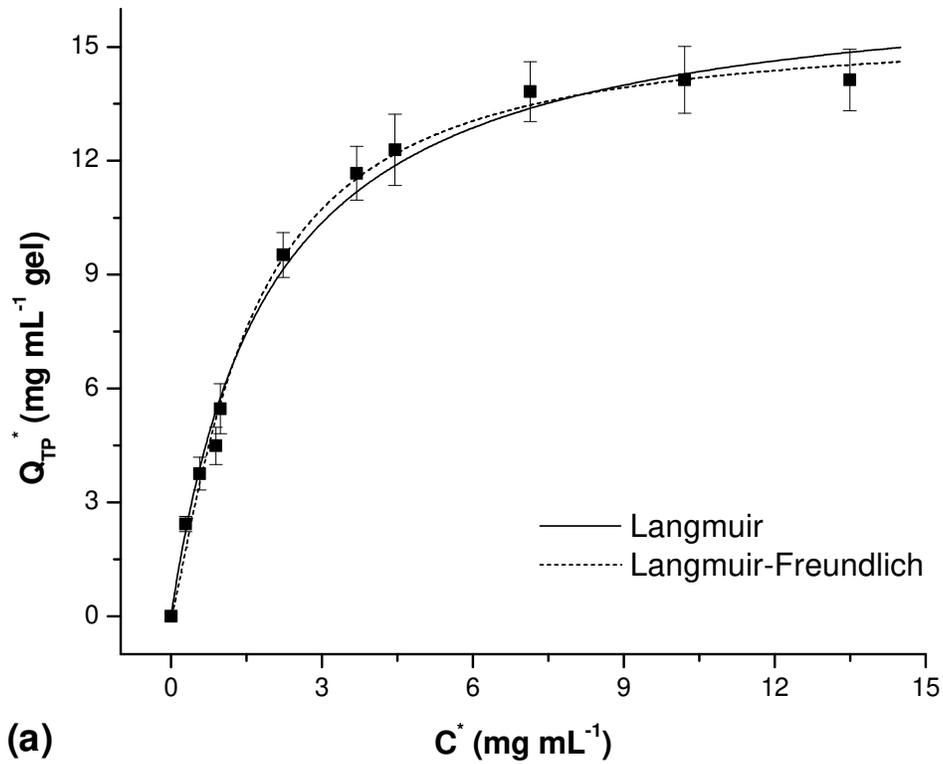


Figura 4. Dados experimentais da isoterma de adsorção de bromelina em termos de (a) proteína total e (b) atividade enzimática em gel DEAE-Sepharose utilizando fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 7,0, a 25°C.

Tabela 5. Parâmetros das isotermas de Langmuir e Langmuir-Freundlich para os dados experimentais de adsorção de bromelina em termos de atividade enzimática.

Parametros	Langmuir	Langmuir-Freundlich
$Q_{m A}$ (U mL ⁻¹ gel)	18,8 ± 1.5	15,7 ± 0,3
$K_d A$ (U mL ⁻¹)	0,77 ± 0.22	-
$K_{dLF A}$ (U mL ⁻¹)	-	0,23 ± 0,04
n_A	-	2,66 ± 0,28
R^2	0,928	0,993
Chi^2	3,201	0,352

O parâmetro de cooperatividade para a atividade (n_A) foi de $2,66 \pm 0,28$, confirmando a presença de efeitos de cooperatividade encontrados na isoterma em termos de proteína total. A cooperatividade depende da natureza da macromolécula e a presença de grupos multifuncionais, onde usualmente ocorre multiplas interações com o ligante DEAE. Forças atrativas causadas por interações laterais ou interações proteína-proteína podem ocorrer devido à natureza heterogênea da adsorção por conta de interações multiponto, indica uma retenção mais forte da enzima.

4.2. INCORPORAÇÃO DA BROMELINA EM BASES DERMATOLÓGICAS E ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Sendo a bromelina uma enzima com potencial terapêutico cicatrizante, após o processo de purificação, incorporou-se a enzima em diferentes bases dermatológicas com a finalidade de estudar a sua estabilidade nestas bases sob diferentes condições de armazenamento e comparar o comportamento da enzima purificada no laboratório com a enzima comercialmente disponível. As bases estudadas foram: aniônicas (creme e loção Lanette e gel de Carbopol) e não iônicas (creme e loção com formulação da Chemyunion). Manteve-se fixa em 0,5% (m/m) a quantidade de enzima incorporada em todas as formulações estudadas.

Para todas as bases estudadas foram realizados os testes de centrifugação e de estabilidade acelerada (normal ou exploratória). A estabilidade foi realizada à temperatura ambiente com e sem a presença de luz, em geladeira (4°C) e em estufa (37°C). Foram avaliados o pH, o teor de proteína total e atividade enzimática, bem como as características organolépticas de aspecto, cor, odor e sensação ao tato. Todas as amostras foram avaliadas e monitoradas durante 90 dias.

4.2.1. Teste de centrifugação

Com a finalidade de se observar possíveis instabilidades físicas nas emulsões, o primeiro teste realizado foi o de centrifugação, onde uma quantidade conhecida da base dermatológica com e sem bromelina foi submetida à centrifugação a 3000×g durante 30 minutos. Não foram observados sinais de instabilidade em nenhuma das formulações. Os resultados estão apresentados na Figura 5.

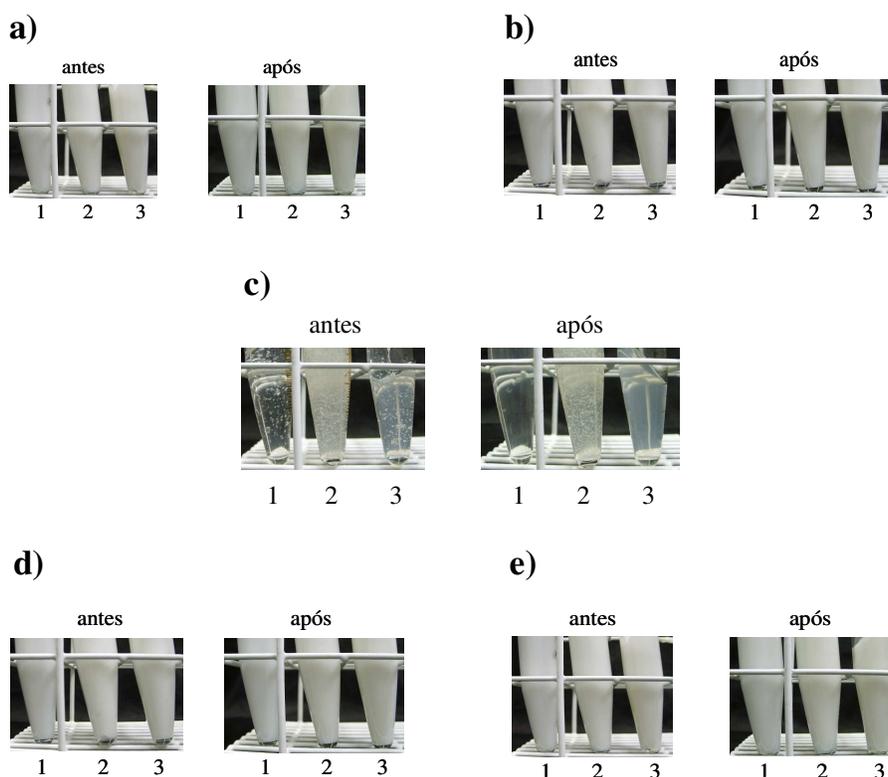


Figura 5. Foto do teste de centrifugação: a) creme Lanette, b) loção Lanette, c) gel de Carbopol, d) creme Chemyunion, e) loção Chemyunion. (1) Base sem bromelina; (2) Base com bromelina comercial; (3) Base com bromelina purificada no laboratório.

4.2.2. Teste de estabilidade acelerada

Com a finalidade de se estimar o tempo de vida útil das formulações e o prazo de validade, realizou-se o teste de estabilidade acelerada para todas as bases, analisando-se as características organolépticas, pH, proteína total e atividade enzimática, em quatro diferentes condições: temperatura ambiente com luz solar indireta, temperatura ambiente sem incidência de luz, estufa (37°C) e geladeira (4°C). Tais condições são destinadas a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância e/ou alterações de características de forma farmacêutica, usando condições forçadas de armazenamento. Como todo procedimento de predição, os resultados destes testes de estabilidade não são absolutos, tendo, porém, muita probabilidade de sucesso. Tal probabilidade aumenta quando as condições do teste se aproximam ao máximo daquelas de mercado e também quando a duração do teste é mais longa (ANVISA, 2004)

4.2.2.1. Temperatura ambiente com luz solar indireta

A condição de temperatura ambiente com luz solar indireta visa simular a condição de mercado na qual o produto estará submetido. Se após o período de validade o produto ainda estiver em condições adequadas de uso, será reavaliado um novo prazo de validade, com o aumento do mesmo. Caso contrário, este prazo deverá ser diminuído. Ao se tratar de uma formulação com enzima incorporada, deve-se buscar garantir que a atividade enzimática se mantenha em níveis toleráveis, permitindo, deste modo, sua eficaz aplicação. Desta forma define-se o histórico do produto, que é fundamental para a sua manutenção no mercado. A vida de prateleira (*shelf life*), entretanto, é o parâmetro responsável pela definição do prazo de validade real.

A seguir encontram-se apresentados os resultados das formulações creme Lanette, loção Lanette, gel de Carbopol, creme Chemyunion e loção Chemyunion: características organolépticas (aspecto, cor, odor e sensibilidade ao tato) nas Tabelas 6 a 10; variações de pH nas Figuras 6 a 10 e variações da atividade enzimática de bromelina nas Figuras 11 a 15.

Tabela 6. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 7. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 8. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 9. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 10. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

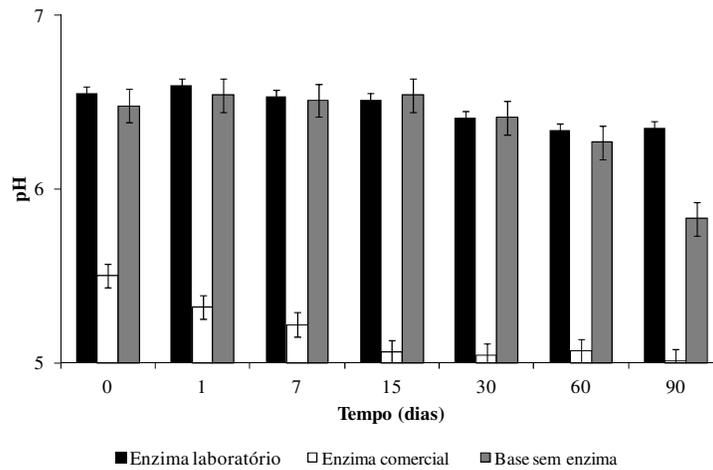


Figura 6. Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

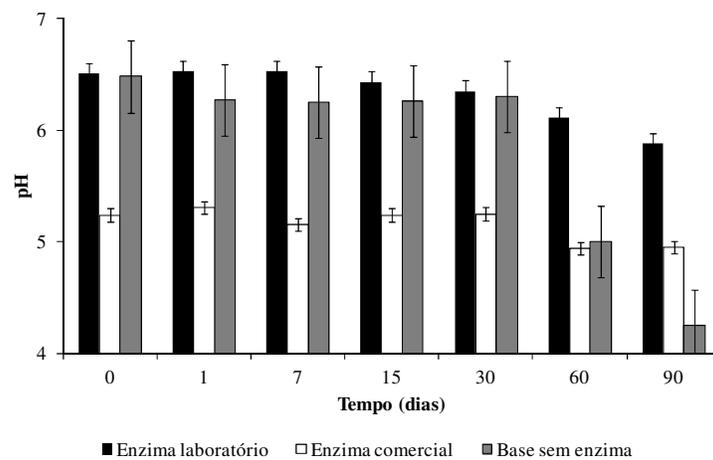


Figura 7. Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

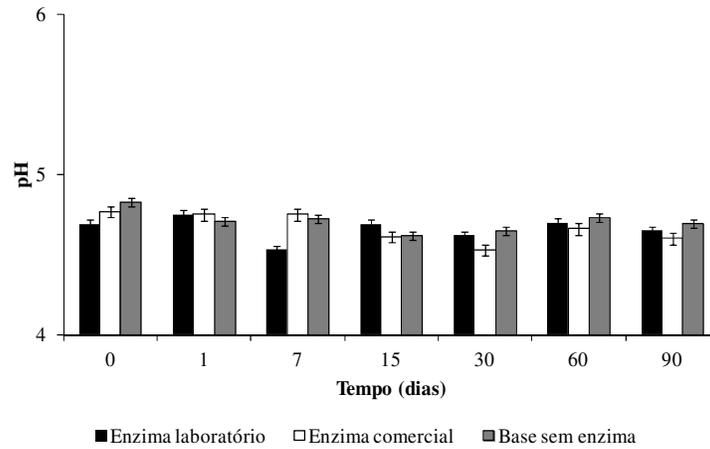


Figura 8. Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

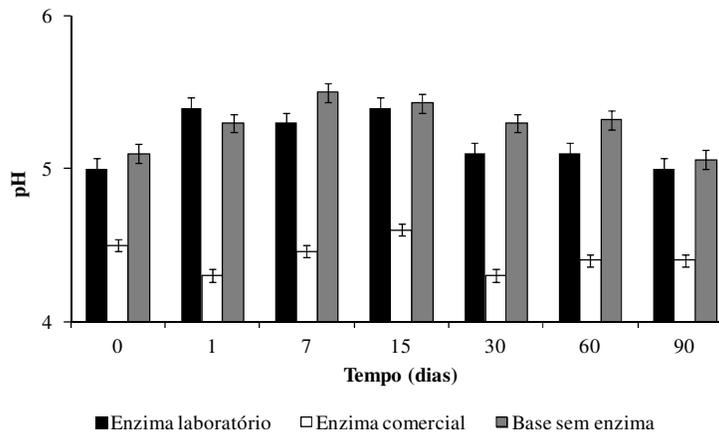


Figura 9. Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

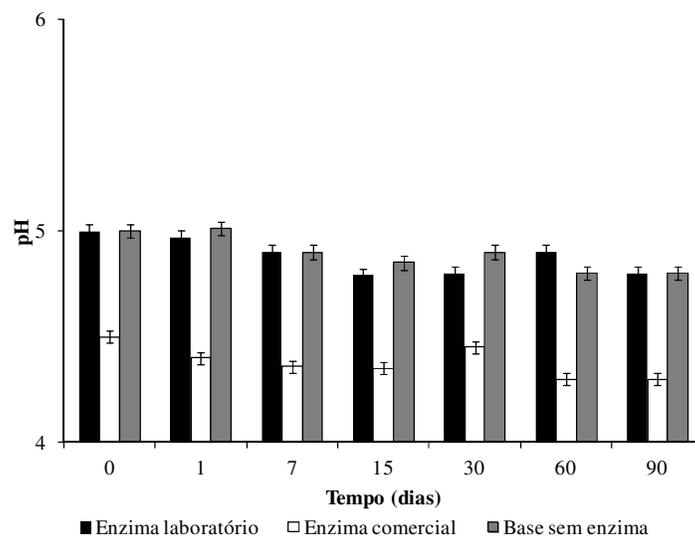


Figura 10. Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

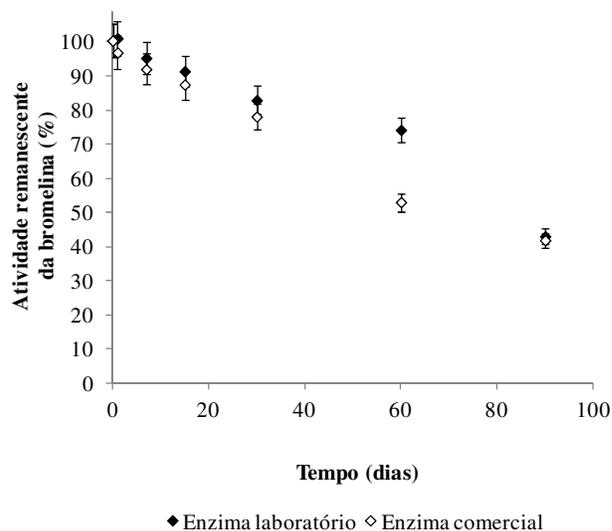


Figura 11. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

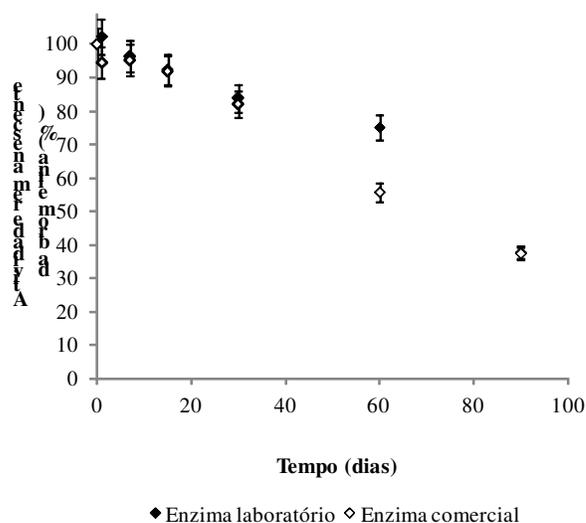


Figura 12. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

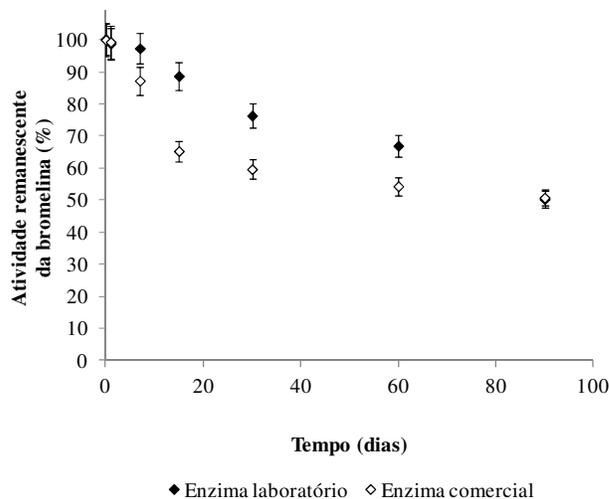


Figura 13. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

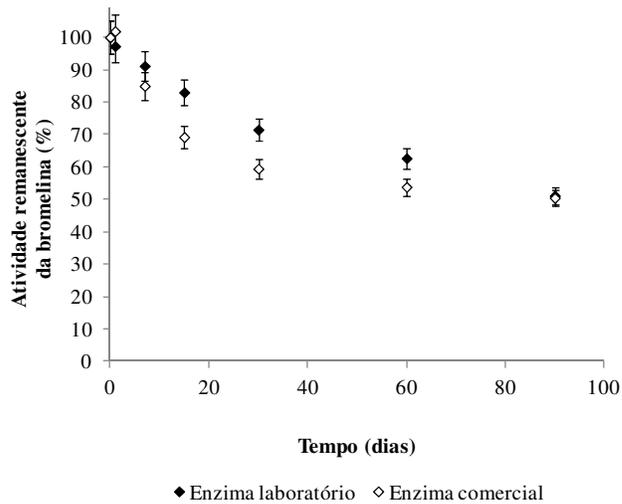


Figura 14. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

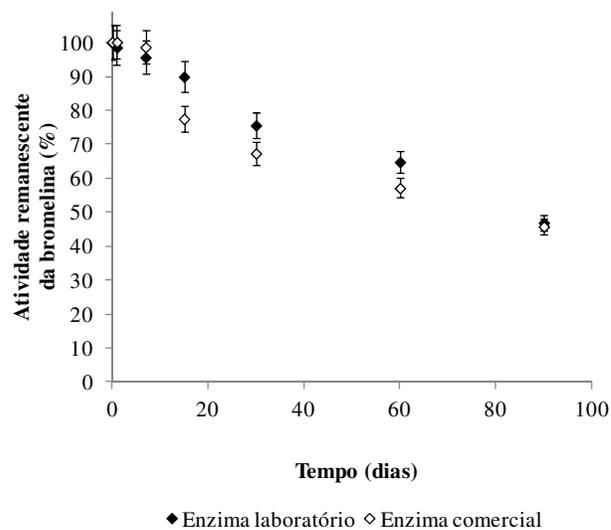


Figura 15. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente com luz solar indireta. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

4.2.2.2. Temperatura ambiente sem incidência de luz

A condição de temperatura ambiente sem incidência de luz solar tem como principal objetivo ser um controle, uma vez que a luz ultravioleta, juntamente com o oxigênio, origina a formação de radicais livres, podendo desencadear reações de óxido-redução (ANVISA, 2004).

A seguir encontram-se apresentados os resultados das formulações creme Lanette, loção Lanette, gel de Carbopol, creme Chemyunion e loção Chemyunion: características organolépticas (aspecto, cor, odor e sensibilidade ao tato) nas Tabelas 11 a 15; variações de pH nas Figuras 16 a 20 e variações da atividade enzimática de bromelina nas Figuras 21 a 25.

Tabela 11. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 12. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 13. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 14. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 15. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz.

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
90	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

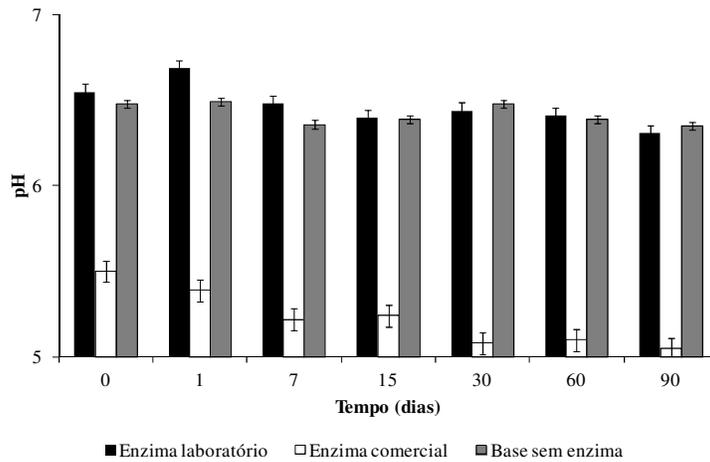


Figura 16. Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

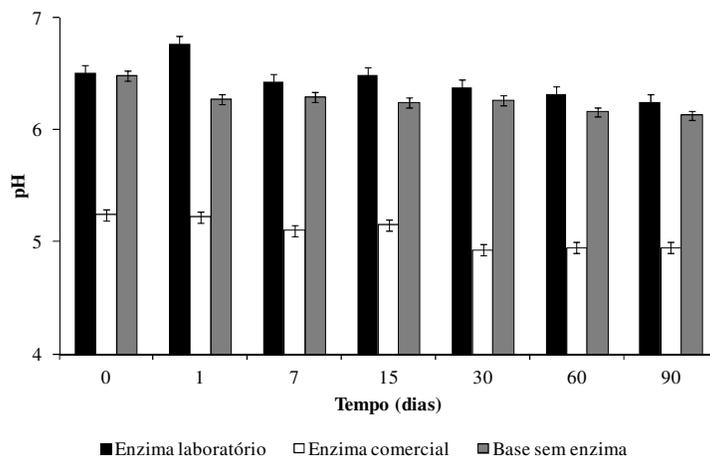


Figura 17. Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

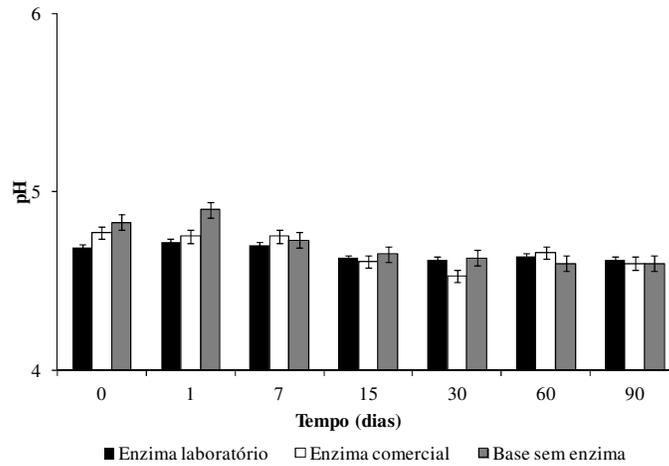


Figura 18. Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

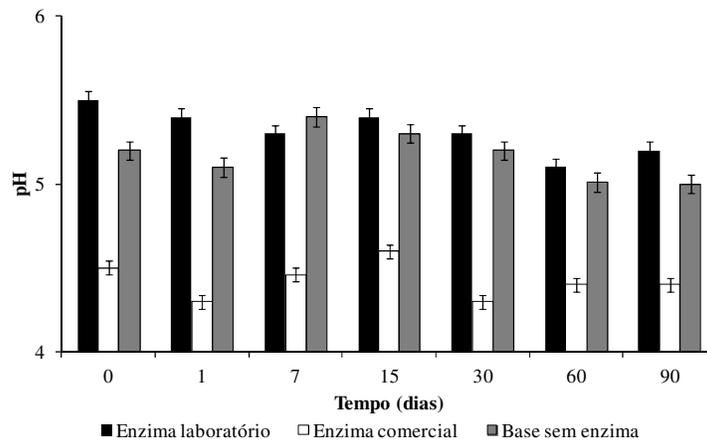


Figura 19. Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

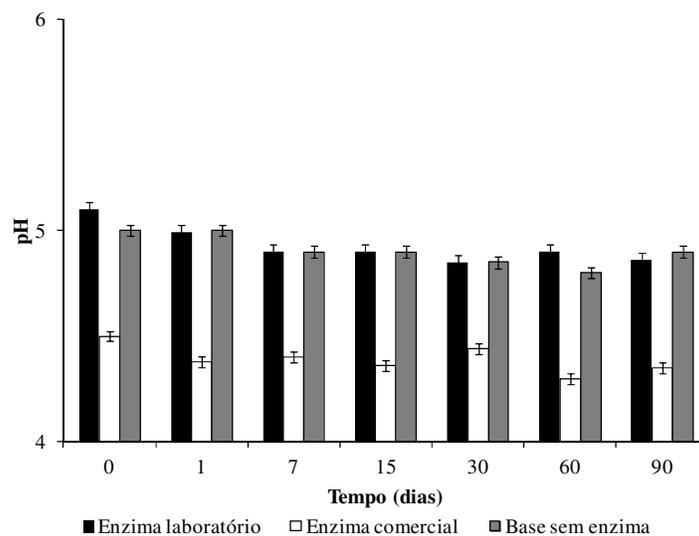


Figura 20. Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

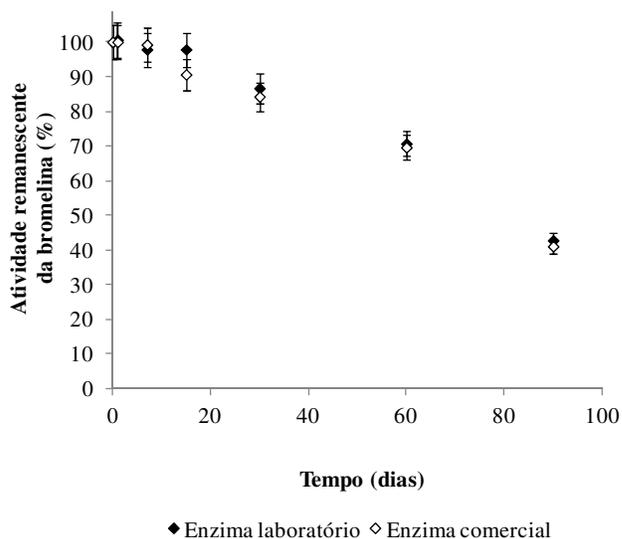


Figura 21. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

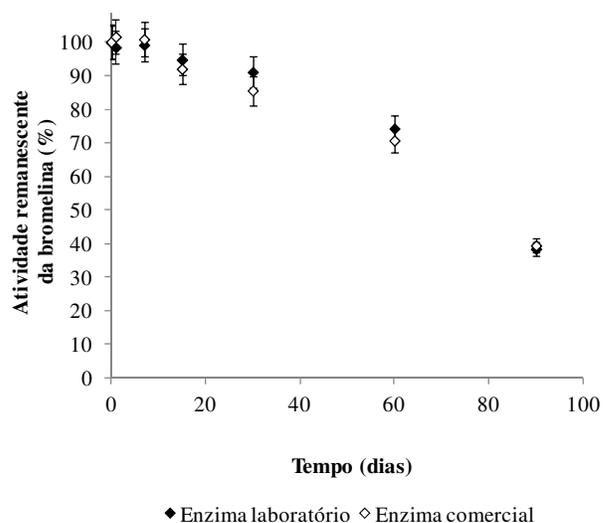


Figura 22. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

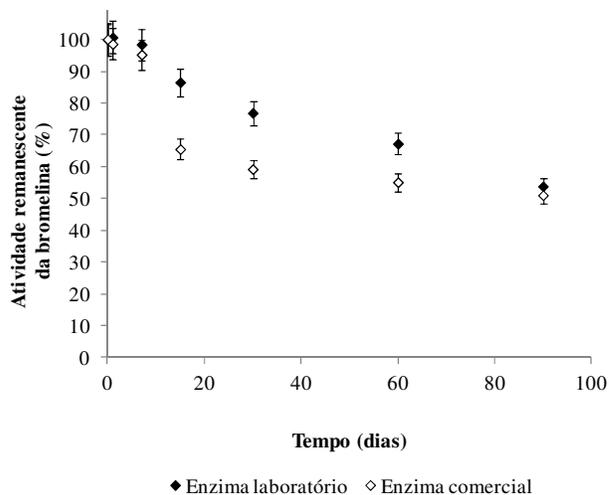


Figura 23. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

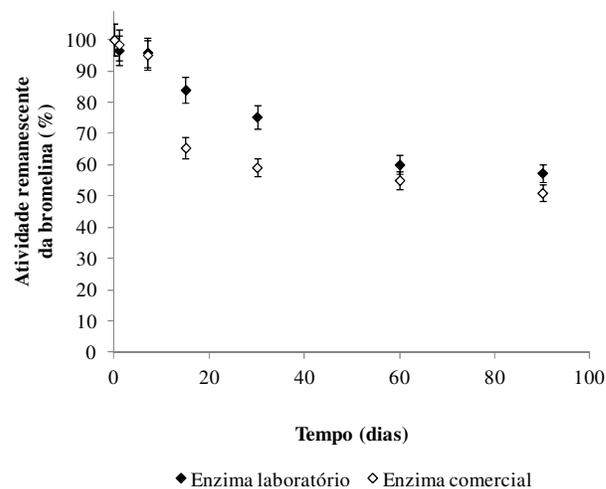


Figura 24. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

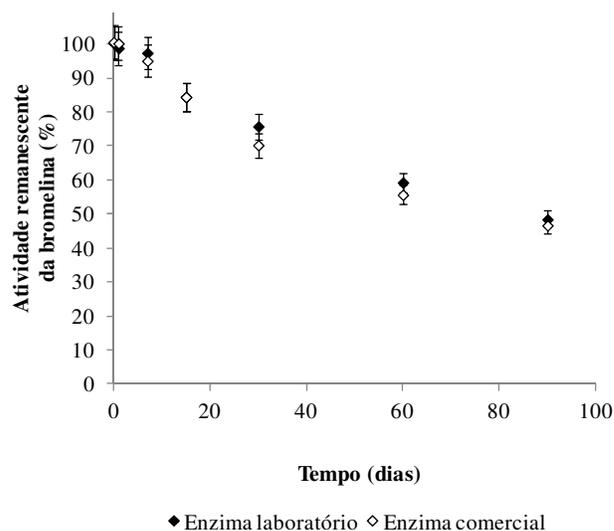


Figura 25. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura ambiente sem incidência de luz. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

4.2.2.3. Estufa (37°C)

Temperaturas mais elevadas tendem a acelerar reações físico-químicas e químicas, ocasionando alterações em atividade de componentes, viscosidade, aspecto, cor e odor do produto. Problemas gerados em função de temperaturas elevadas podem ser decorrentes também de não conformidades no processo de fabricação, armazenamento ou transporte do produto. Segundo recomendado por ANVISA (2004), os limites de temperatura mais freqüentemente praticados, para testes em estufa, durante o desenvolvimento de bases cosméticas são 37, 40, 45 ou 50 °C, com desvio de ± 2 °C. Nessas condições, a ocorrência de alterações físico-químicas é freqüente e até mesmo esperada, portanto os resultados obtidos devem ser avaliados cuidadosamente.

De acordo com Rasheedi et al. (2003) e Khan et al. (2003), a temperatura ótima da bromelina encontra-se ao redor de 37 °C, escolheu-se esta temperatura para a realização destes experimentos de estabilidade acelerada em temperaturas elevadas.

A seguir encontram-se apresentados os resultados das formulações creme Lanette, loção Lanette, gel de Carbopol, creme Chemyunion e loção Chemyunion: características organolépticas (aspecto, cor, odor e sensibilidade ao tato) nas Tabelas 16 a 20; variações de pH nas Figuras 26 a 30 e variações da atividade enzimática de bromelina nas Figuras 31 a 35.

Tabela 16. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
15	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
30	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
60	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N
90	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 17. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
15	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
30	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
60	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N
90	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 18. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
15	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
30	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
60	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N
90	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 19. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
15	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
30	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
60	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N
90	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 20. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
15	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
30	N	LM	LM	N	N	LM	LM	N	N	N	N	N
60	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N
90	N	M	M	N	N	M	M	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

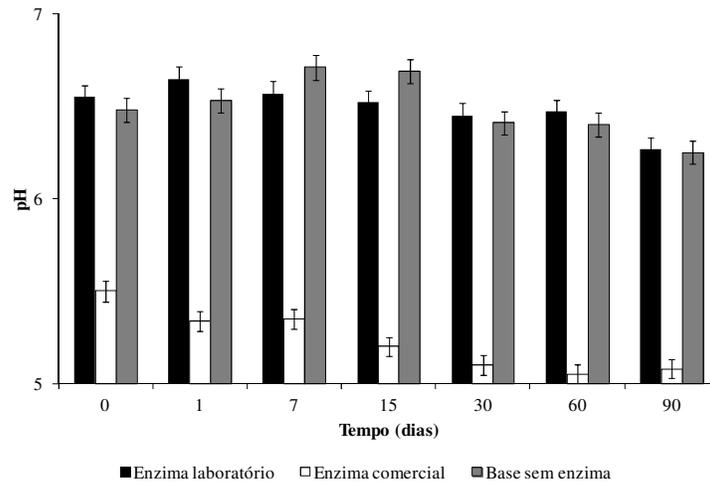


Figura 26. Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

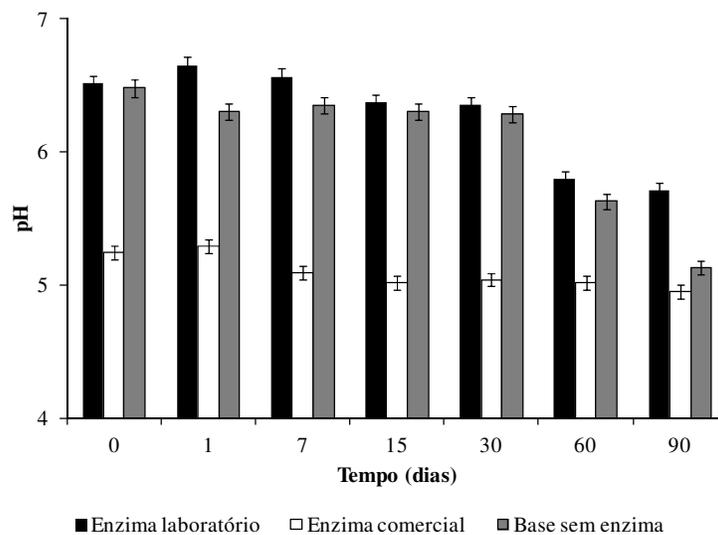


Figura 27. Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

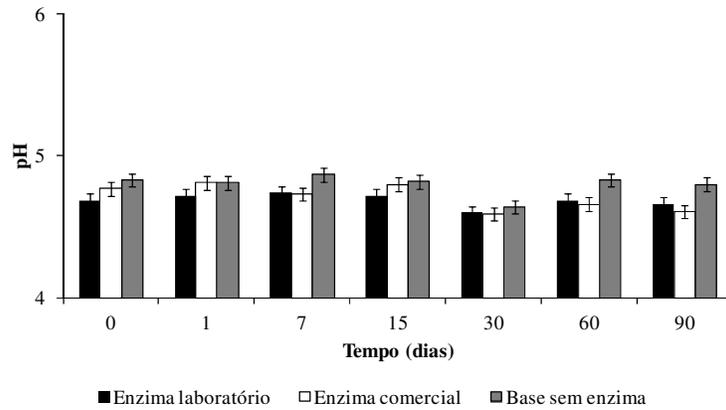


Figura 28. Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

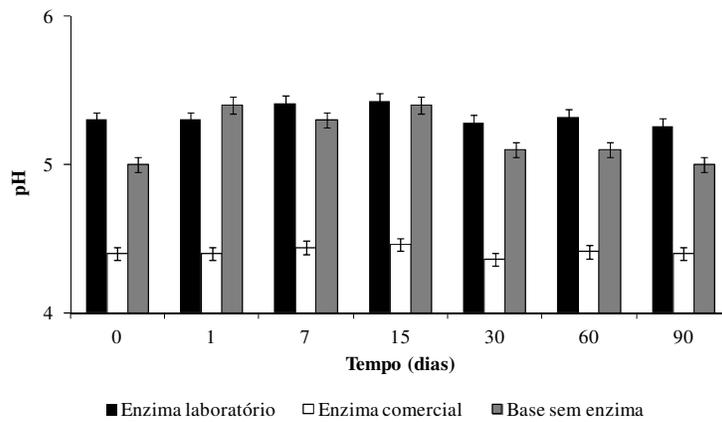


Figura 29. Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

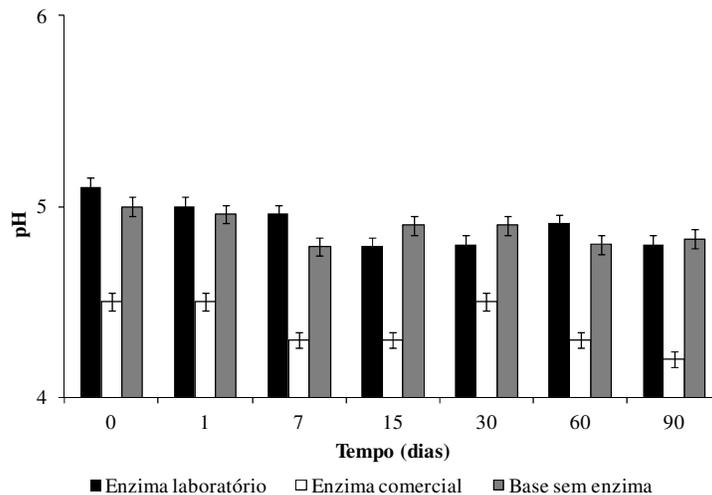


Figura 30. Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

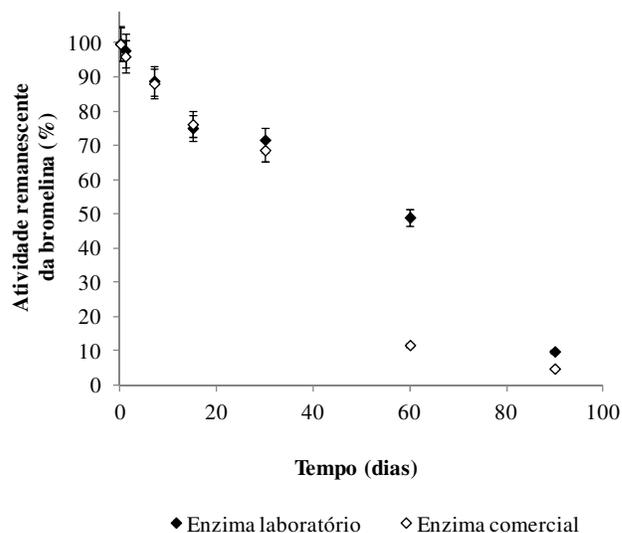


Figura 31. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

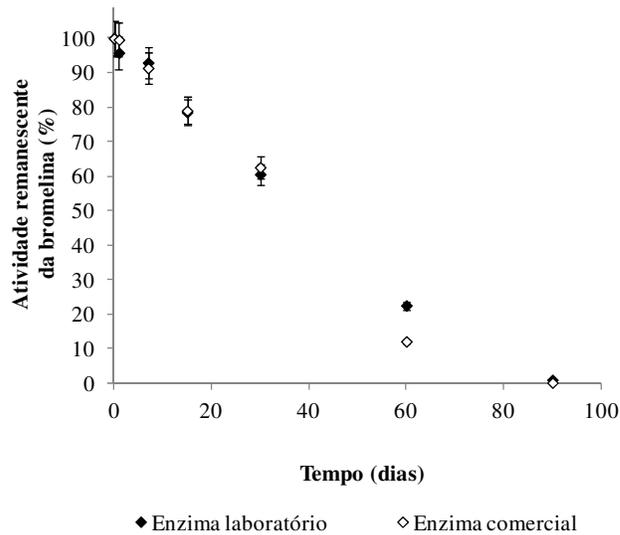


Figura 32. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

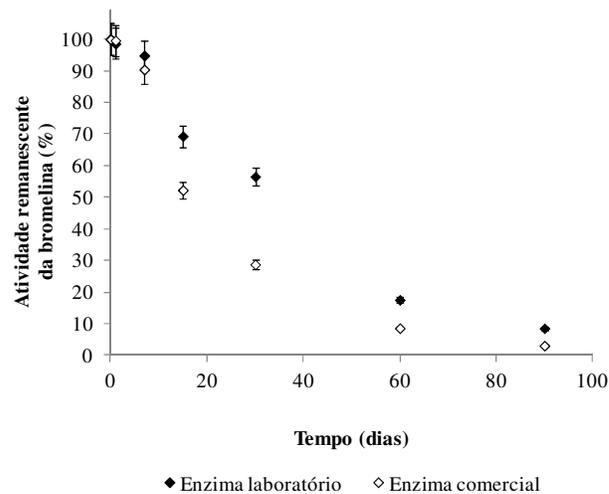


Figura 33. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

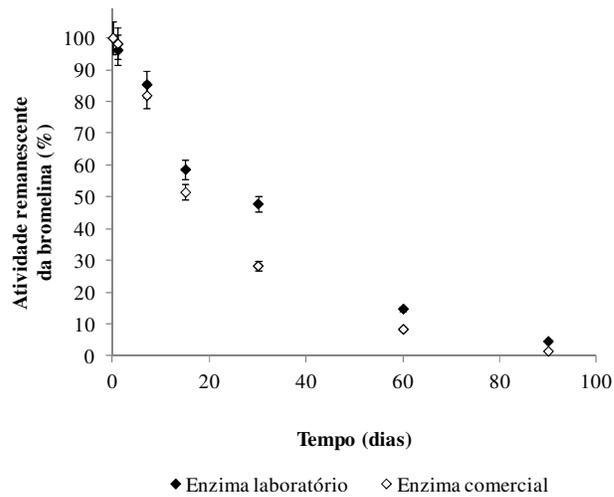


Figura 34. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

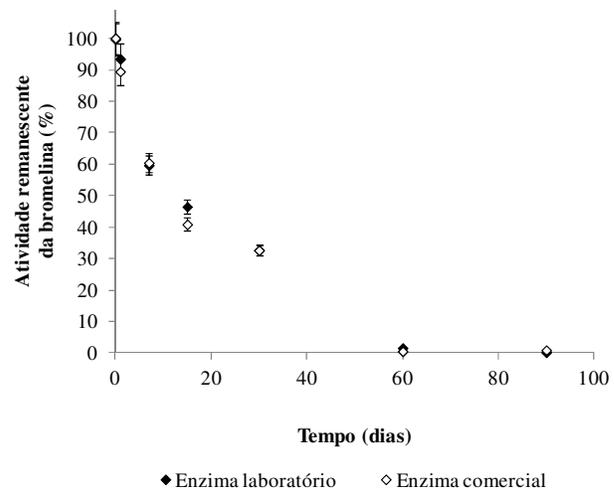


Figura 35. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 37°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

4.2.2.4. Geladeira (4°C)

Baixas temperaturas aceleram possíveis alterações físicas como turvação, precipitação, cristalização. Problemas gerados, em função de temperaturas baixas, podem ser decorrentes também de não-conformidades no processo de fabricação, armazenamento ou transporte do produto (ANVISA, 2004).

Segundo o recomendado por ANVISA (2004), estes limites de temperatura mais utilizados, durante o desenvolvimento de produtos, são em geladeira ($5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), em freezer ($-5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, ou $-10\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$).

A seguir encontram-se apresentados os resultados das formulações creme Lanette, loção Lanette, gel de Carbopol, creme Chemyunion e loção Chemyunion: características organolépticas (aspecto, cor, odor e sensibilidade ao tato) nas Tabelas 21 a 25; variações de pH nas Figuras 36 a 40 e variações da atividade enzimática de bromelina nas Figuras 41 a 45.

Tabela 21. Características organolépticas do creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 22. Características organolépticas da loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 23. Características organolépticas do gel de Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 24. Características organolépticas do creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

Tabela 25. Características organolépticas da loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C

Tempo (dias)	<i>Enzima laboratório</i>				<i>Enzima comercial</i>				<i>Base sem enzima</i>			
	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato	Aspecto	Cor	Odor	Sensibilidade ao tato
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Não modificado; LM: Levemente modificado; M: modificado.

Na incorporação da bromelina purificada em laboratório ou comercial, a cor da base apresentou leve coloração amarelada, e esta, no tempo zero, foi considerada como padrão inicial para o decorrer do teste.

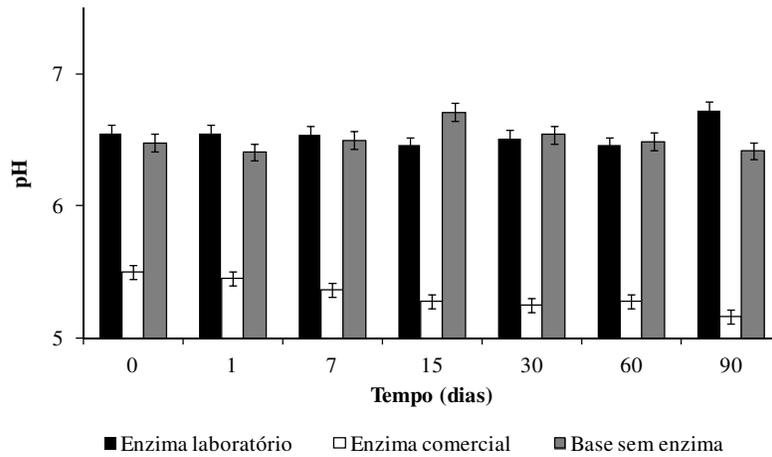


Figura 36. Perfil de pH no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

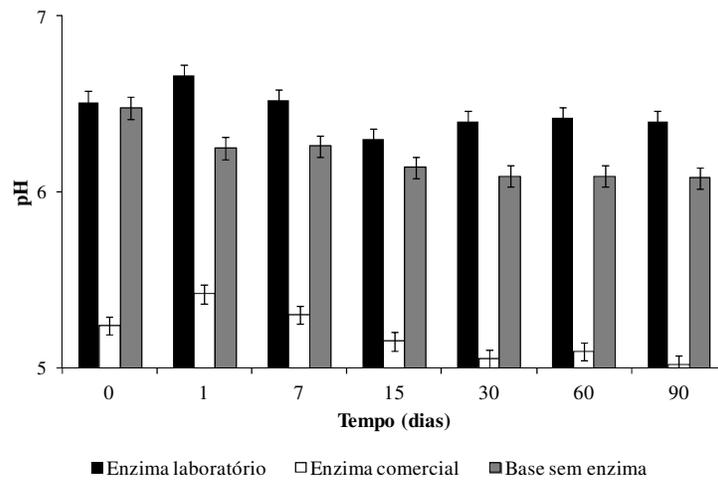


Figura 37. Perfil de pH na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

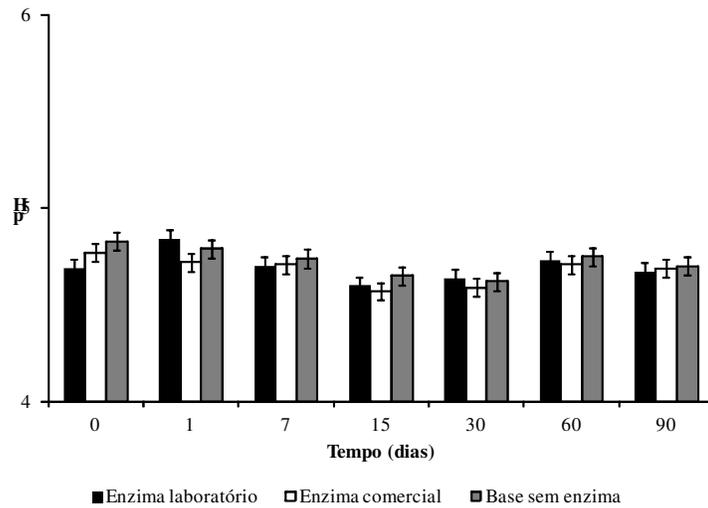


Figura 38. Perfil de pH no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

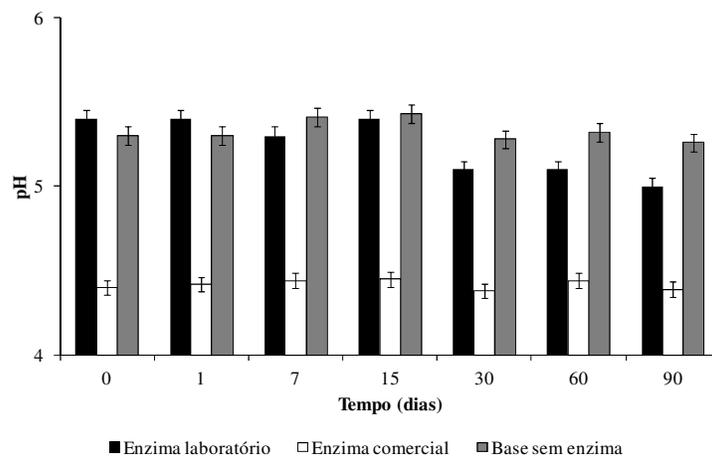


Figura 39. Perfil de pH no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

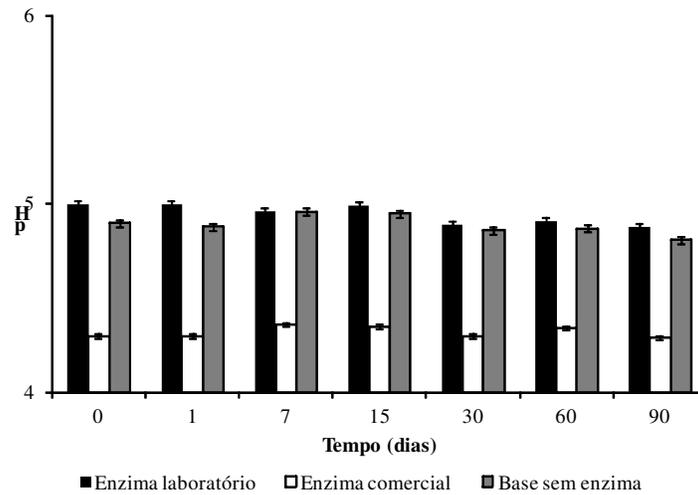


Figura 40. Perfil de pH na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

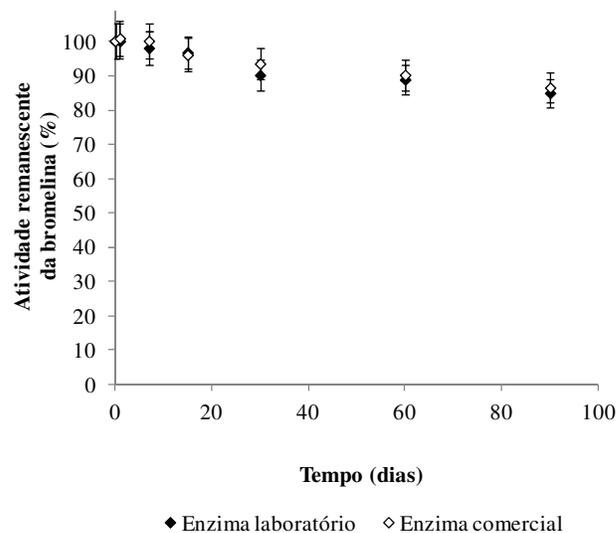


Figura 41. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

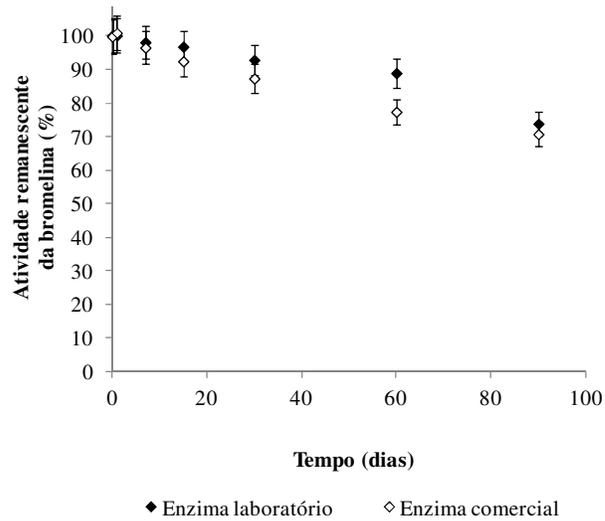


Figura 42. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Lanette durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

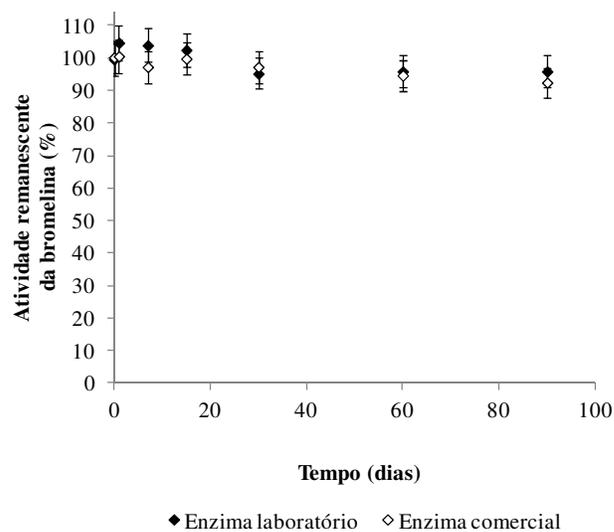


Figura 43. Perfil de atividade enzimática da bromelina no gel Carbopol durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

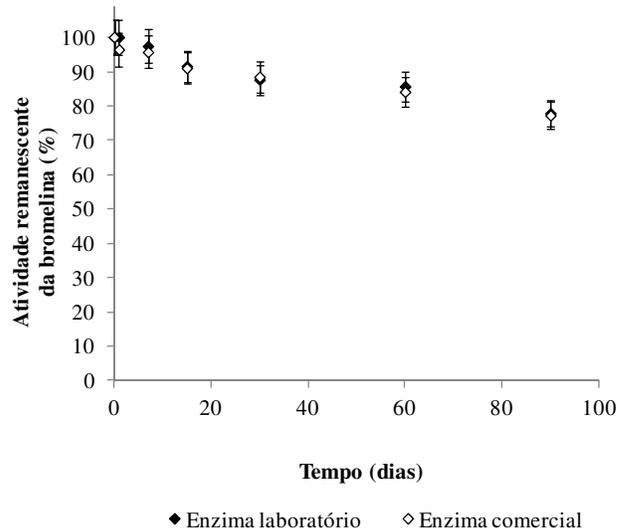


Figura 44. Perfil de atividade enzimática da bromelina no creme Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

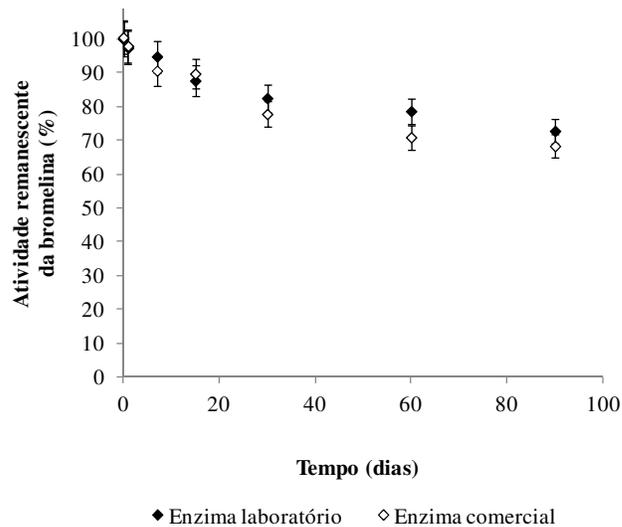


Figura 45. Perfil de atividade enzimática da bromelina na loção Chemyunion durante o teste de estabilidade à temperatura de 4°C. As barras de erro correspondem a intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

4.2.3. Discussão geral

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 26, a temperatura é um fator de extrema importância na estabilidade de formulações contendo bromelina, pois temperatura elevada (estufa 37°C) fez com que a enzima degradasse e perdesse praticamente toda a sua atividade ao longo dos 90 dias de teste (Figuras 31-35), em todas as bases estudadas, sejam elas com a enzima purificada no laboratório ou a enzima comercial. Por sua vez quando as bases foram mantidas em baixa temperatura (geladeira 4°C) foi a condição em que houve menor perda de atividade ao longo do teste (Figuras 41-45). A temperatura ambiente, a perda de atividade enzimática foi intermediária aos valores obtidos em estufa e geladeira. A incidência ou ausência de luz não foi significativa em termos de perda de atividade enzimática (Figuras 11-15, Figuras 21-25 e Tabela 26).

Tabela 26. Resumo das atividades remanescentes de bromelina nas bases dermatológicas estudadas após 90 dias de teste de estabilidade.

Base	T_{amb} com luz (%)	T_{amb} sem luz (%)	Estufa: 37°C (%)	Geladeira: 4°C (%)
Creme Lanette ¹	41,5	41,0	5,0	87,2
Creme Lanette ²	42,7	42,4	9,6	84,9
Loção Lanette ¹	38,5	39,5	0,0	71,8
Loção Lanette ²	37,5	38,5	0,9	73,8
Gel Carbopol ¹	51,2	51,3	2,5	92,3
Gel Carbopol ²	50,4	54,0	8,9	95,5
Creme Chemyunion ¹	50,0	51,2	2,5	77,5
Creme Chemyunion ²	51,2	57,0	4,6	77,7
Loção Chemyunion ¹	44,7	45,9	0,0	67,6
Loção Chemyunion ²	46,8	48,7	0,0	72,3

¹ Base com bromelina comercial.

² Base com bromelina purificada em laboratório.

As características organolépticas (cor e odor) das formulações contendo bromelina comercial ou bromelina purificada no laboratório também sofreram alterações com o

aumento da temperatura. Em temperatura ambiente (Tabelas 6-15) estas características foram levemente modificadas a partir do 60º dia de teste e em estufa (Tabelas 16-20) estas alterações iniciaram-se a partir do 7º dia. Em geladeira não houve alteração das características organolépticas, como apresentado nas Tabelas 21-25.

Creme e loção Lanette e gel de Carbopol são formulação aniônicas (carga negativa), então produtos incorporados de carga positiva podem desestabilizar a formulação, logo, estas formulações aceitam bem produtos de carga negativa. Segundo Bartholomew et al. 2003, o pI da bromelina é 4,6, então, no pH das bases aniônicas estudadas (creme Lanette 6,5, loção Lanette 6,5 e gel de Carbopol 4,8) a bromelina estava carregada negativamente, sendo assim compatível com as formulações aniônicas .

No gel de Carbopol o pH é mais baixo, em torno de 5,0 e este apresentou o melhor resultado de estabilidade em termos de atividade enzimática (Tabela 26). Acredita-se que este resultado correu pelo fato do gel de Carbopol ser a base mais ácida, uma vez que o abacaxi é uma fruta ácida, mantendo-se assim a enzima ativa por mais tempo e mais próxima do pH natural.

Os valores de pH não variaram significativamente ao longo do estudo para todas as formulações estudadas em todas as condições de armazenamento, porém apresentaram uma leve tendência de queda (Figuras 6-10, 16-20, 26-30 e 36-40). As formulações contendo bromelina comercial apresentavam valores de pH mais baixos pois a enzima comercial foi liofilizada em pH ácido.

Os cremes apresentaram melhores resultados de estabilidade enzimática do que as loções (Tabela 26), pois as loções são mais ricas em água e a bromelina se autodegrada em meio aquoso.

Os perfis de estabilidade enzimática foram muito semelhantes entre a enzima purificada em laboratório e a enzima comercialmente disponível como pode ser observado nas Figuras 11-15, 21-25, 31-35 e 41-45.

Maiores reduções na atividade enzimática ocorreram nos testes realizados em estufa a 37 °C, que justamente é a temperatura ótima da bromelina (RASHEEDI et al., 2003 e KHAN et al., 2003). Acredita-se que tal perda de atividade tenha ocorrido devido a autodegradação (autodigestão ou autólise) da bromelina, por se encontrar em condição de máxima atividade.

Miura (2012) estudou o efeito dos adjuvantes técnicos EDTA dissódico, cloridrato de cisteína e propilenoglicol no aumento da atividade proteolítica da papaína em géis de Carbopol. A autora realizou teste de estabilidade acelerada das bases contendo papaína nas temperaturas de 5°C, 26°C e 45 °C durante sessenta dias e concluiu que houve boa estabilidade física, porém observou-se perda dos valores de atividade proteolítica (5°C – 30%, 26°C – 32% e 45°C – 39%). Com o uso dos adjuvantes técnicos houve aumento considerável na atividade proteolítica inicial, porém não ocorreu a manutenção desta atividade ao longo do tempo de estudo de estabilidade acelerada.

Baby e colaboradores (2007) realizaram teste de estabilidade acelerada em emulsões óleo/água contendo extrato de *Trichilia catigua* Adr. Juss e *Ptychopetalum olacoides* Bentham durante 90 dias. Os resultados apresentaram aceitável estabilidade a 24°C com e sem a presença de luz com perda de aproximadamente 10% de flavonoides totais e a 5°C houve perda de aproximadamente 5% de flavonoides totais. A 40°C houve degradação acelerada, com perda de aproximadamente 39% de flavonoides totais.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Neste trabalho demonstrou-se que foi possível purificar bromelina extraída de casca de abacaxi utilizando precipitação por sulfato de amônio (40-80% saturação), seguido por dessalinização, liofilização e cromatografia em DEAE-Sepharose e 75% da enzima pôde ser recuperada ativa após todas as etapas de extração e purificação. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose em pH 7,0 foi capaz de separar polissacarídeos da bromelina na etapa de eluição. O ajuste do modelo de Langmuir-Freundlich para dados de adsorção tanto para proteína total quanto para atividade, mostraram a presença de efeitos de cooperatividade entre o ligante DEAE e a bromelina. Foi possível incorporar bromelina em creme e loção Lanette, creme e loção Chemyunion e gel de Carbopol com atividade proteolítica remanescente de 84,9%, 73,8%, 95,5%, 77,7% e 72,3% respectivamente após 90 dias de teste, onde a bromelina permaneceu mais estável em termos de características organolépticas e atividade em gel de Carbopol quando armazenada em geladeira (4°C).

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema. Assim, as sugestões àqueles que darão continuidade a este trabalho são:

- 1) Teste de citotoxicidade *in vitro* da bromelina purificada no laboratório e comparação com a bromelina comercial;
- 2) Teste de citotoxicidade *in vitro* da bromelina purificada no laboratório e comercial incorporadas nas bases dermatológicas estudadas neste trabalho;
- 3) Estudar o efeito da adição de adjuvantes técnicos visando a potencialização e a manutenção da atividade proteolítica da bromelina nas bases estudadas;
- 4) Atividade anti-inflamatória e cicatrizante *in vivo* da bromelina incorporada nas bases dermatológicas estudadas neste trabalho.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS

AHLE, N. W.; HAMLET, M. P. Enzymatic frostbite eschar debridement by bromelain. *Annals of Emergency Medicine*, v. 16, p. 1063-1065, 1987.

ALLEN Jr, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

ANVISA. Séries Temáticas: Cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, volume 1, Maio 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>. Acessado em 13 de Dezembro de 2012.

AUTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 83-89, 2008.

BABY, A. R. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato comercial de *Trichilia catiguá* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 405-412, 2007.

BAHDE, R.; PALMES, D.; MININ, E.; STRATMANN, U.; DILLER, R.; HAIER, J.; SPIEGEL, H-U. Bromelain ameliorates hepatic microcirculation after warm ischemia. *Journal of Surgical Research*, v. 139, p. 88-96, 2007.

BANOV, D. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo extrato seco de *Ginkgo biloba* L. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. The pineapple: botany, production and uses. Wallingford-UK:CABI Publishing, 2003.

BHUI, K.; PRASAD, S.; GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. *Cancer Letters*, v. 282, p. 167-176, 2009.

BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva J. C. C., editor. *Cirurgia vascular: guia ilustrado*. São Paulo, 2004. Disponível em bapbaptista.com/feridasLeila.pdf. Acessado em 18 de Dezembro de 2012.

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

BRESOLIN, I. T. L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; CARO, J. R.; SANTOS, F. P.; CASTRO, M. P.; BUENO, S. M. A. Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: Purification of human IgG by negative chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 17-23, 2009.

BRESOLIN, I. T. L.; BUENO, S. M. A. Evaluation of Amino Acid O-Phosphoserine as Ligand for the Capture of Immunoglobulin G from Human Serum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 167, p. 632-644, 2012.

BRESOLIN, I. T. L.; FIORITTI, R. F.; BUENO, S. M. A. IgG purification by negative chromatography in amine-based ligands: A comparison of L-lysine and poly-L-lysine. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2277-2285, 2011.

BRESOLIN, I. T. L.; SOUZA, M. C. M.; BUENO, S. M. A. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto ω -aminodecyl-agarose. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 2087-2093, 2010.

CAMARGO, S. M. P. L. O. Estudo combinado do ultra-som pulsado de baixa intensidade e da papaína na cicatrização de úlcera por pressão no atendimento domiciliar. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CANNON, B. C.; CANNON, J. P. Management of pressure ulcers. *American Journal of Healthy-System Pharmacy*, v. 61, p. 1895-1905, 2004.

CESARETTI, I. U. R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. *Pelle Sana*, v. 2, p. 10-12, 1998.

CLONIS, Y. D. Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop. *Journal of Chromatography A*, v. 1101, p. 1-24, 2006.

CORRÊA, N.M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, p.74-78, , 2005.

CORZO, C. A.; WALISZEWSKI, K. N.; WELTI-CHANES J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry*, v. 133, p. 631-635, 2012.

CREMASCO, M. A. Fundamentos de transferência de massa, 2ª edição. Campinas-SP: Editora Unicamp, 734 pp., 2002.

CUTLER, P. Protein purification protocols. Totowa-New Jersey: Humana Press, 2004.

DÂNGELO, J. G.; FATINNI, C. A. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 2ª edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988.

DEALEY, C. Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras. São Paulo: Atheneu, p.1-21, 1996.

DECLAIR, V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoléico. Jornal Brasileiro de Medicina, v. 82, p. 36-41, 2002.

DEUTSCHER, M. P. Methods in Enzymology. Academic Press, 1990.

DEVAKATE, R. V.; PATIL, V. V.; WAJE, S. S.; THORAT, B. N. Purification and drying of bromelain. Separation and Purification Technology, v. 64, p. 259-264, 2009.

DRAELOS, Z. Cosméticos em Dermatologia. 2ª edição. Porto Alegre: Revinter, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350-356, 1956.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Current Situation and Medium-Term Outlook for Tropical Fruits (Report) 2005. Disponível em: http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/218/en/Sit_web_e.pdf. Acessado em 12 de Dezembro de 2012.

FERREIRA, J. F.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. The Effect of pH on Bromelain Partition from *Ananas comosus* by PEG4000/Phosphate ATPS. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, p. 125-132, 2011.

FERREIRA, L.A.; LEITE, J.P.V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Editora Atheneu, p. 206-251, 2008.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v. 35, p. 203-206, 2008.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 8ª edição. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1989.

FREIMAN DE OLIVEIRA, L. Os avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde. Alimentos e Nutrição, v. 12, p. 215-226, 2001.

GAUTAM, S. S.; MISHRA, S. K.; DASH, V.; GOYA, A. K.; RATH, G. Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 34, p. 67-76, 2010.

GENNARO, A.R. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

GOMES, F. S. L.; CARVALHO, D. V. Tratamento de ferida: Revisão da literatura. Revista Mineira de Enfermagem, v. 6, p. 67-72, 2002.

HADGRAFT, J. Skin deep. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, p. 291-299, 2004.

HALE, L. P.; GREER, P. K.; TRINH, C. T.; JAMES, C. L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. International Immunopharmacology, v. 5, p. 783-793, 2005.

HARRACH, T.; ECKERT, K.; MAURER, H. R.; MACHLEIDT, I.; MACHLEIDT, W.; NUCK, R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. Journal of Protein Chemistry, v. 17, p. 351-361, 1998.

HAX, G. Comparando os efeitos da utilização da papaína e AGE em lesões cutâneas: estudo experimental. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica e Ciências da Saúde) - PUC-RS, 2009.

JOHNSON, R. D.; ARNOLD, F. H. Multipoint binding and heterogeneity in immobilized metal affinity chromatography. Biotechnology and Bioengineering, v. 48, p. 437-443, 1995.

KELLY, G. S. Bromelain: A literature review and discussion of its therapeutic applications. *Alternative Medicine Review*, v. 1, p. 243-257, 1996.

KETNAWA, S.; RAWDKUEN, S.; CHAIWUT, P. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. *Biochemical Engineering Journal*, v. 47, p. 205-211, 2010.

KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K.; J. BIOSCI. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain enzymes, *Journal of Biosciences*, v. 28, p. 709-714, 2003.

LADISCH, M. R. *Bioseparations Engineering: Principles, practice and economics*. New York: Wiley, 735 pp., 2001.

LEONARDI, G. R. *Cosmetologia Aplicada*. São Paulo: Livraria e Editora Medfarma, 2004.

MACIEL, E. A. F. Prevalência de feridas em pacientes internados em um hospital filantrópico de grande porte de Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 58, p. 1234-1245, 2001.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. S3-S17, 2002.

MIURA, D. Y. Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de géis de papaína destinados ao tratamento de feridas. Dissertação (Mestrado em Ciências aplicadas a produtos para a saúde) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

MORAES, A. M.; AUGUSTO E. F. P.; CASTILHO, L. R. Processo de purificação dos produtos. Em MORAES, A. M.; CASTILHO, L. R.; BUENO, S. M. A. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica*. São Paulo: Editora Roca, p. 289-320, 2008.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, p. 307-310, 1981.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. *Methods in Enzymology*, v. 45, p. 475-485, 1976.

MURAKAWA, T.; YAMAGATA, H.; TSURUTA, H.; AIZONO, Y. Cloning of cold-active alkaline phosphatase gene of a psychrophile, *Shewanella sp.*, and expression of the recombinant enzyme. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, p. 754-761, 2002.

MURATA, K.; KUSAKABE, I.; KOBAYASHI, H.; AKAIKE, M.; PARK, Y. W.; MURAKAMI, K. Studies on coagulation of soy milk protein by commercial proteinases. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 51, p. 385-389, 1987.

NAPPER, A. D.; BENNETT, S. P.; BOROWSKI, M.; HOLDRIDGE, M. B.; LEONARD, M. J.; ROGERS, E. E.; DUAN, Y.; LAURSEN, R. A.; REINHOLD, B.; SHAMES, S. L. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochemical Journal*, v. 301, p. 727-735, 1994.

ORSINI, R. A. Bromelain. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 118, p. 1640-1644, 2006.

OTA, S.; HORIE, K.; HAGINO, F.; HASHIMOTO, C.; DATE, H. Fractionation and some properties of the proteolytically active components of bromelains in the stem and the fruit of the pineapple plant. *The Journal of Biochemistry*, v. 71, p. 817-830, 1972.

PEREIRA, A. L. Revisão sistemática da literatura sobre produtos usados no tratamento de feridas. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, 2006.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª edição. Barueri-SP: Editora Manole Ltda, 444 pp., 2005.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Técnica farmacêutica e farmácia galênica. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3º ed, v. II, p. 183-207, 1990.

QUEIROZ, M. B. R. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* (L.) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com o gel de diclofenaco sódico. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2008.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA JR, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. *Journal of Chromatography B*, v. 807, p. 61-68, 2004.

RASHEEDI, S.; HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry*, v. 68, p. 1097-1100, 2003.

REDDY, M.; GILL, S. S.; KALKAR, S. R.; WU, W.; ANDERSON, P. J.; ROCHON, P. A. Treatment of pressure ulcers: a systematic review. *Journal of the American Medical Association*, v. 300, p. 2647-2662, 2008.

ROEP, B. O.; VAN DEN ENGEL, N. K.; VAN HALTEREN, A. G.; DUINKERKEN, G.; MARTIN, S. Modulation of autoimmunity to beta-cell antigens by proteases. *Diabetologia*, v. 45, p. 45, 686-692, 2002.

ROLIM, A.; OISHI, T.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extrat of Brazilian plants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 308, p. 107-114, 2006.

ROXAS, M. The role of enzyme supplementation in digestive disorders. *Alternative Medicine Review*. v. 13, p. 307-314, 2008.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BONDE, J. S. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, p. 25-54, 1989.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKY, P. *Iniciação à Química Cosmética*. São Paulo: Tecnopress, 2002.

SCHULTZ, G. S.; SIBBALD, R. G.; FALANGA, V.; AYELLO, E. A.; DOWSETT, C.; HARDING, K.; ROMANELLI, M.; STACEY, M. C.; TEOT, L.; VANSCHIEDT, W. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration*, v. 11, n. 2, supplement, 2003.

SCOPES, R. K. *Protein purification: Principles and practice*, 3ª edição. New York: Springer-Verlag, 422 pp., 1993.

SECOR JR, E. R.; SINGH, A.; GUERNSEY, L. A.; MCNAMARA, J. T.; ZHAN, L.; MAULIK, N.; THRALL, R. S. Bromelain treatment reduces CD25 expression on activated CD4+ T cells in vitro. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 340-346, 2009.

SILVA, F. V.; SANTOS, R. L. A.; FUJIKI, T. L.; LEITE, M. S.; FILETI, A. M. F. Design of automatic control system for the precipitation of bromelain from the extract of pineapple wastes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 1033-1040, 2010.

SILVEIRA, E.; SOUZA JR, M. E.; SANTANA, J. C. C.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 26, p. 149-157, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; KEZDY, F. J. Characterization of the pineapple stem proteases (bromelain). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 167, p. 678-686, 1975.

SIMMONS, J. V. *Cosméticos: formulación, preparación y aplicación*. Madrid: Madrid Vicente, 2000.

SINGH, L. R.; DEVI, T. P.; DEVI, S. K. Purification and Characterization of a Pineapple Crown Leaf Thiol Protease. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 34, p. 25-43, 2004.

SIQUEIRA, V.L. Estratégias de proteção microbiológica de cosméticos. *Cosmetics and Toiletries*, v. 16, p. 100-104, 2004.

SOARES, P.; COELHO, D.; MAZZOLA, P.; SILVEIRA, E.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; PESSOA JR, A.; TAMBOURGI, E. B. Studies on bromelain precipitation by ethanol, poly(ethylene glycol) and ammonium sulphate. *Chemical Engineering Transactions*, v. 24, p. 979-984, 2011.

SONG, M. M.; NIE, H. L.; ZHOU, Y. T.; ZHU, L. M.; BAO, J. Y. Affinity adsorption of bromelain on Reactive Red 120 immobilized magnetic composite particles. *Separation Science and Technology*, v. 46, p. 473-482, 2011.

SPADARO, A. C. C. Em Fundamentos de Cromatografia. Editado por BONATO, P. S.; COOLLINS, C. H., BRAGA, G. L. Campinas-SP: Editora da UNICAMP, p. 103-136, 2006.

TAKAHASHI, N.; YASUDA, Y.; GOTO, K.; MIYAKE, T.; MURACHI, T. Multiple molecular forms of stem bromelain. Isolation and characterization of two closely related components, SB1 and SB2. *The Journal of Biochemistry*, v. 74, p. 355-373, 1973.

THOMAS, D. R. Prevention and treatment of pressure ulcers. *Journal of the American Medical Directors Association*, v.7, p. 46-59, 2006.

TOMANKOVA, O.; KOPECNY, J. Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. *Animal Feed Science and Technology*, v. 53, p. 71-80, 1995.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 7, p. 71-76, 1989.

WHARTON, C. W. The structure and mechanism of stem bromelain: Evaluation of the homogeneity of purified stem bromelain, determination of the molecular weight and kinetic analysis of the bromelain-catalysed hydrolysis of N-benzyloxy-carbonyl-L-phenylalanyl-L-serine methyl ester. *Biochemical Journal*, v. 143, p. 575-586, 1974.

YAMADA, B. F. A. Terapia tópica de feridas: limpeza e desbridamento. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 33, p. 133-140, 1999.