



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014021563-8 A2



(22) Data do Depósito: 29/08/2014

(43) Data da Publicação: 22/03/2016

(RPI 2359)

(54) **Título:** FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS

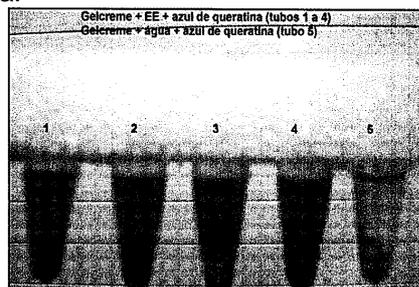
(51) **Int. Cl.:** A61K 8/66; A61Q 9/04; C12N 9/54

(52) **CPC:** A61K 8/66; A61Q 9/04; C12N 9/54

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(72) **Inventor(es):** ALEXANDRE JOSÉ MACEDO, VIVIANE CRISTINA KRUCINSKI, CARLOS TERMIGNONI, TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA, SANDRA ELISA HAAS

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS. O presente invento descreve o uso de uma enzima bacteriana (queratinase) como ativo em uma formulação cosmética para uso tópico sobre a pele íntegra e que apresenta capacidade de desempenhar duas ações: (a) agente depilatório sem a adição de outras enzimas e/ou aditivos depilatórios tradicionais na formulação e (b) promotora de absorção de fármacos. A enzima do presente invento é obtida pelo processo de fermentação usando como substrato a farinha de pena.



FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS

Campo da invenção

001 O presente invento descreve o uso de uma enzima bacteriana (queratinase) como ativo em uma formulação cosmética para uso tópico sobre a pele íntegra e que apresenta capacidade de desempenhar duas ações: (a) agente depilatório sem a adição de outras enzimas e/ou aditivos depilatórios tradicionais na formulação e (b) promotora de absorção de fármacos.

002 A enzima do presente estudo foi obtida pelo processo de fermentação usando como substrato a farinha de pena. Assim, tem-se uma fonte de produção enzimática de origem biotecnológica reprodutível (processo fermentativo) a partir de um insumo de fácil obtenção que independe de condições ambientais (enzimas vegetais dependem das condições climáticas) e que é considerado um resíduo de manejo crítico pela indústria avícola, pois não pode ser descartado livremente no meio ambiente (farinha de pena).

Estado da técnica

003 Atualmente as formulações na forma de loção disponíveis no mercado comercialmente, bem como as descritas em documentos de patentes, apresentam em sua formulação compostos químicos que promovem a depilação. Outras formulações contêm enzimas, mas não como ativo único, sendo sempre associada a outros ativos químicos.

004 A presente técnica apresenta-se como única e diferencia-se de outras patentes já estabelecidas conforme explanação abaixo:

005 Patente CN 101396328, 26/09/2007, Preparation method of cutin dispelling cosmetics and use metho: essa patente é de uma formulação cosmética esfoliante que associa papaína com queratinase, entre outros componentes, para uso em cuidados da pele. **Nosso diferencial:** nosso produto teve resultado superior à papaína e é utilizado sozinho na formulação.

006 Patente EP 0204638 (A1), 05/06/1958, Shaving Product: Essa patente relata a preparação de um produto que consiste em uma loção com um ativo

quaternário que apresenta afinidade pela queratina do pelo, amaciando o mesmo e tornando o ato de barbear mais fácil. **Nosso diferencial:** o ativo quaternário trata-se de uma classe química tradicional para o tratamento de cabelo/pelo e a presente patente descreve uma enzima para uso, a qual é de origem biotecnológica.

007 Patente JP 2004161621 A, 11/11/2002, Containing the angular conversion enzyme inhibitor and that, the skin external use medicine which become: a invenção relata um produto com um extrato de origem vegetal que inibe uma enzima envolvida no processo de queratinização. Assim, pode ser usado no pré e pós-tratamento para depilação de áreas corporais, bem como diminuir a espessura da camada de queratina da pele para facilitar a penetração de outras substâncias. **Nosso diferencial:** a fonte de obtenção do nosso extrato é através de processo fermentativo, não é de fonte vegetal.

008 Patente JP 2002201119 (A), 28/12/2000, Dehairing agent composition: trata-se de formulação para uso capilar (guanidinas, composto redutor de queratina e alto pH), provavelmente destinada ao alisamento capilar, com alguma modificação para ter, ao final, uma fórmula com pH menos agressivo. **Nosso diferencial:** nosso produto destina-se ao uso em pele.

009 Patente PI0614478-0 A, 31/07/2006, Composição Cosmética e/ou Dermatológica para a Prevenção e/ou o Tratamento das Peles Sensíveis ou Secas: produto que mescla o uso de micro-organismos probióticos (e/ou seus metabólitos) com ácidos graxos essenciais para o tratamento e a prevenção de danos à pele seca, sensível ou irritada. **Nosso diferencial:** o produto de que trata a patente BR 200614478 (A) (2013) destina-se à recomposição da epiderme em peles sensíveis ou danificadas e não se destina ao uso depilatório como é a nossa proposta.

0010 Patente WO 200478773, 16/09/2004, Stabilizing Proteins for Use in Personal Care, Cosmetic, and Pharmaceutical Products. Essa patente que se refere a um método para ativar/desativar proteases presentes em produtos cosméticos. **Nosso diferencial** é uma proposta de uma formulação para uso como agente depilatório.

0011 Patente EP 1350432, 08/10/2003, Method and Composition for the Prevention or Retarding of Staling and its Effect During the Baking Process of Bakery Products. A patente se refere a um método para prevenir ou retardar o endurecimento de produtos de panificação com o uso de, pelo menos, uma protease termoestável. **Nosso diferencial:** a patente citada relaciona-se com a área alimentícia e não a produtos de uso tópico ou afins.

0012 Patente WO200364449, 07/08/2003, Bioactive Keratin Peptides. Essa patente se refere à ação no combate ao envelhecimento e melhoras das características gerais da pele através do uso de peptídeos derivados da hidrólise de queratina de pelo humano e/ou animal. **Nosso diferencial:** a patente acima não se refere a agente depilatório ou à promoção da permeação de produtos através da epiderme.

Descrição das Figuras

Figura 1 - Tubos reacionais de azul de queratina, onde, os quatro primeiros tubos (da esquerda para a direita) são amostras e o quinto é o controle para:

- 1a) Gelcreme + EE
- 1b) Gel aristoflex + EE
- 1c) Gel carbopol + EE
- 1d) Gel goma xantana + EE

Figura 2 - Curva de calibração média da solução padrão de diclofenaco sódico

Figura 3 - Formulações utilizadas para o teste *ex vivo*, conforme descrito abaixo:

- 3a) Gelcreme Veículo
- 3b) Gelcreme Papaína
- 3c) Gelcreme EE

Figura 4a - Fotos dos animais do grupo enzima em 0, 10, 16, 22 e 26 dias com a evolução do crescimento dos pelos no período do experimento. As fotos do dia 22 e 26 representam o penúltimo dia consecutivo de aplicação da amostra e o último dia do experimento, respectivamente.

(*) Indica a codificação do animal dentro do seu grupo.

Figura 4b - Fotos de animais do grupo papaína, veículo e controle em 0, 10, 16, 22 e 26 dias mostrando a evolução do crescimento dos pelos no período do experimento. As fotos do dia 22 e 26 representam o último dia consecutivo de aplicação da amostra e o penúltimo dia do experimento, respectivamente.

(*) Indica a codificação do animal dentro do seu grupo.

Figura 5 - Grupos de animais observados, após o tratamento, no último dia do experimento, sob as perspectivas de:

- A) Enzima
- B) Papaína
- C) Veículo
- D) Controle

Figura 6 - Fotografia do experimento de Traversa *et al.* (2007) (Traversa, E.; Santelli, G. M. M.; Velasco, M V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papains's depilatory effect. *International Journal of Pharmaceutical*, v. 335, p. 163-166, 2007) em camundongo tratado com creme de papaína 0,8% em 2 cm² do dorso direito. Disponível em: <http://www.usp.br/agen/repgs/2003/pags/118.htm>

Descrição Detalhada da Invenção

0013 É um objeto da presente invenção uma formulação de loção contendo queratinase bacteriana com ação depilatória e promotora de absorção de fármacos. A bactéria *Bacillus subtilis* NP5 foi o micro-organismo produtor da enzima queratinase em meio de cultivo contendo 7,5% de farinha de pena e 0,05% de extrato de levedura em água deionizada, durante 72 horas, a 37 °C e 180 rpm. Nessas condições de cultivo obtivemos uma atividade queratinolítica de $4,91 \pm 0,30$ U.h.min⁻¹ sobre o substrato de azoqueratina e azul de queratina. A seguir, a atividade queratinolítica do sobrenadante foi avaliada antes e após incorporação em quatro veículos de uso dermatológico: Gelcreme Sepigel®, Gel Aristoflex® AVC, Gel Carbopol® e Gel Goma xantana®. Com base nas atividades obtidas, o veículo dermatológico de destaque foi o gelcreme Sepigel e o mesmo foi utilizado para os testes in vitro, em Célula de Franz Modificada, e ex vivo, em camundongos. Nos experimentos em Célula de Franz

modificada, a formulação enzimática mostrou ser capaz de exercer ação sobre a penetração de diclofenaco sódico no estrato córneo nos tempos de 15 minutos e 1 hora sem promover penetração sistêmica.

0014 Em uma realização preferencial, o micro-organismo produtor da queratinase é a bactéria *Bacillus subtilis* NP5.

0015 Em uma realização preferencial, o meio de cultivo principal é a farinha de pena, porém não se restringido a essa.

0016 A invenção pode ser mais bem compreendida pelos exemplos abaixo, de forma não limitantes.

Exemplo 1:

0017 No experimento *ex vivo*, quatro grupos de animais foram ensaiados com distintas formulações. Os animais foram divididos em quatro grupos com dez animais em cada, no qual em três grupos foram utilizadas diferentes formulações e o quarto grupo foi o controle, em que nenhum produto foi utilizado. Todos os animais tiveram seu dorso depilado antes do início do experimento. As amostras aplicadas e suas características estão na tabela 1.

Tabela 1. Grupos de animais ensaiados *ex vivo* e a formulação teste correspondente.

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

0018 Ao final do experimento, o grupo tratado com enzima microbiana (queratinase) e o grupo tratado com enzima vegetal (papaína) apresentaram

falhas de crescimento nas áreas pilosas. Os grupos veículo e controle não apresentaram essas falhas. Assim, as enzimas se mostraram efetivas na inibição do crescimento do pelo, sendo que o grupo tratado com enzima bacteriana (queratinase) teve um efeito inibitório no crescimento do pelo maior que o grupo tratado com enzima vegetal.

0019 Assim, essa queratinase microbiana obtida no nosso estudo, por sua especificidade de ação, pode ser usada como agente único em produtos depilatórios substituindo ativos tradicionais que apresentem potencial tóxico e sensibilizante, como tioglicóis e derivados. Além disso, apresentou maior efetividade do que a papaína, enzima vegetal atualmente utilizada para os mesmos fins.

Exemplo 2

0020 O experimento consistiu no ensaio somente do sobrenadante do cultivo de NP5 com azul de queratina, cujo substrato é disponível comercialmente e usado como uma referência em ensaios desta natureza (Scott, J.A.; Untereiner, W.A. Determination of Keratin degradation by fungi using Keratin azure. **Medical Mycology**, v. 42, p. 239-246, 2004). Como resultado, o sobrenadante do isolado NP5, *Bacillus subtilis*, mostrou atividade: $2,85 \pm 0,13 \text{ U.mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para o meio farinha de pena e $1,55 \pm 0,06 \text{ U.mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para o meio LB (cultivo em 72 horas).

Influência de parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção enzimática pelo *Bacillus subtilis* NP5

0021 Através do planejamento Plackett-Burmann, avaliou-se a influência de farinha de pena, glicose, extrato de levedura e proteína de soja na produção enzimática da bactéria *Bacillus subtilis* NP5. A farinha de pena e o extrato de levedura foram escolhidos para comporem os meios por serem fontes tradicionais de carbono e nitrogênio nesse tipo de cultivo; a glicose por ser tanto relacionada como um fator de inibição quanto boa fonte de carbono ou mesmo indiferente para a produção de queratinase (Adinarayana, K.; Ellaiah, P.; Prasad, D. S. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. **AAPS**

PharmSciTech, v. 4, n. 4, article 56 (<http://www.aapspharmscitech.org>), 2003; Kojima, M.; Kanai, M.; Tominaga, M. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v. 10, p. 229-235, 2006; Scott, J.A.; Untereiner, W.A. Determination of Keratin degradation by fungi using Keratin azure. **Medical Mycology**, v. 42, p. 239-246, 2004; Gupta, R.; Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006) e a proteína de soja por também ser relatada como bom substrato para a produção de queratinases por micro-organismos (Gupta, R.; Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006).

0022 Verificou-se uma tendência da farinha de pena e da glicose em influenciar o processo. Pela avaliação visual comparativa entre o meio com o isolado e seu respectivo controle, foi visível o maior consumo da farinha de pena nos frascos com presença do *B. subtilis* NP5.

0023 O experimento avaliou não somente a produção de queratinase no meio com farinha de pena associada à proteína de soja, glicose e extrato de levedura, mas também a produção obtida em meio que contendo exclusivamente farinha de pena como fonte de carbono e nitrogênio; bem como testou diferentes tempos de cultivo (24, 28, 32, 48 e 72 horas) com agitação de 150 rpm na temperatura de 30 °C. Os resultados estão na tabela 1.

0024 Na literatura são relatados cultivos com farinha de pena associado à levedura e outros nutrientes (Yoshioka, M.; *et al.* Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, 102, p. 509-515, 2007), bem como relatos variados sobre a melhor temperatura e tempo de cultivo para a produção de queratinase: Yoshioka *et al.* (Yoshioka, M.; *et al.* Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, 102, p. 509-515, 2007) e Adinarayana *et al.* (Adinarayana, K.; Ellaiah, P.; Prasad, D. S. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly

isolated *Bacillus substilis* PE-11. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 4, article 56 (<http://www.aapspharmscitech.org>), 2003) obtiveram a melhor produção em 48 horas a 37 °C para suas respectivas linhagens de *Bacillus*; Cai *et al.* (Cai, C.; Lou, B.; Zheng, X. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 1, p.60-76, 2008)) em 72 horas a 23 °C para uma linhagem de *Bacillus subtilis* mutante e Kojima *et al.* (Kojima, M.; Kanai, M.; Tominaga, M. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**,v. 10, p. 229-235, 2006) em 24 horas a 30 °C para *Bacillus pseudofirmus*. Assim, é possível ver que a variação intra-espécie é grande e depende de muitos fatores, sendo necessária a realização de diversos ensaios até encontrar a condição ideal de produção enzimática para cada cepa.

Tabela 1: Atividade queratinolítica dos sobrenadantes de NP5 em meio com farinha de pena pura e combinada.

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

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

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

0025 Em experimentos complementares aumentou-se a concentração de farinha de pena no meio, de 2% para 5% e alteraram-se as condições de temperatura e velocidade de rotação para 37 °C e 180 rpm, respectivamente. As atividades médias obtidas para os diferentes tempos de cultivo (24, 28, 32, 44, 48 e 72 horas) para os isolados e a mistura deles estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Atividade queratinolítica de sobrenadante do *Bacillus subtilis* NP5 em meio com 5% de farinha de pena.

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

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

0026 A influência do pH do meio na produção de queratinase foi avaliada. Neste experimento, testou-se o meio com 5% de farinha de pena mais q.s. de tampão fosfato em diferentes pHs: 6, 7 e 8, todos na concentração de 10 mM, para o isolado NP5. O cultivo foi feito a 37 °C e a 180 rpm. Alíquotas foram coletadas em 44, 68, 72 e 96 horas. As atividades resultantes do ensaio com o sobrenadante podem ser vistas na tabela 3 e representam a média de seis ensaios.

Tabela 3. Influência de diferentes pHs na atividade queratinolítica do sobrenadante do isolado NP5.

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

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

0027 As atividades queratinolíticas obtidas para os diferentes pHs foram comparadas entre si e com as atividades dos grupos controles através de teste ANOVA multifatorial ($\alpha = 0,05$) e indicaram que não houve diferença estatística entre os grupos. Assim, dentro das nossas condições de cultivo, o experimento demonstrou que o pH do meio entre 6,0 a 8,0 não influencia significativamente na produção de queratinase.

0028 Ainda, dentro desse rastreamento, baseados nas experiências de outros trabalhos realizados em nosso laboratório, foram realizados alguns experimentos variando uma série de fatores. Os melhores resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Atividade queratinolítica do sobrenadante de NP5 em diferentes meios de cultivo.

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

0029 Seguindo a tendência dos resultados obtidos de que a maior concentração de farinha de pena no meio de cultivo eleva a atividade queratinolítica do sobrenadante, optou-se por aumentar a concentração da mesma para 7,5%. O meio com o íon divalente Ca^{2+} foi testado visto que esse cátion estimula a produção de queratinases em alguns micro-organismos (Xie, F.; *et al.* Purification and characterization of four keratinases produced by *streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v.101, p. 344-350, 2010; Macedo, A.J.; Silva, W.O.B.; Termignoni, C. Properties of a non collagen-degradin *Bacillus subtilis* Keratinase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 180-188, 2008; Kojima, M.; Kanai, M.; Tominaga, M. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v. 10, p. 229-235, 2006; Adinarayana, K.; Ellaiah, P.; Prasad, D. S. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 4, article 56 (<http://www.aapspharmscitech.org>), 2003). A pena pura foi utilizada (Cai, C.;

Lou, B.; Zheng, X. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 1, p.60-76, 2008; Tatineni, R.; *et al.* Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1596-1602, 2008) por representar fonte de nutrição semelhante à farinha de pena. As demais condições de cultivo (temperatura e velocidade de rotação) também foram estipuladas levando em consideração os melhores resultados obtidos nos experimentos anteriores. O extrato de levedura voltou novamente ao cultivo, ainda que em baixa concentração, para ser a fonte inicial de carbono e nitrogênio (Scott, J.A.; Untereiner, W.A. Determination of Keratin degradation by fungi using Keratin azure. **Medical Mycology**, v. 42, p. 239-246, 2004) e estimular o início da produção da biomassa bacteriana. Na literatura, em cultivos semelhantes, o extrato de levedura é utilizado a partir de 0,01% (Yoshioka, M.; *et al.* Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, 102, p. 509-515, 2007) e, mesmo nessa pequena concentração, mostrou ser capaz de estimular a produção enzimática por reduzir o tempo de adaptação do micro-organismo ao meio (Mazotto, A. M.; *et al.* Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p.89-96, 2010).

0030 Assim, com base em todos os experimentos realizados alcançamos a atividade de $4,91 \pm 0,30 \text{ U.mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em azoqueratina. Visando obter o sobrenadante em maior escala para o prosseguimento do estudo, padronizamos a produção em Erlenmeyer sob agitação e temperatura controladas, nas seguintes condições:

- i) Cultivo do pré-inóculo m caldo LB a 200 rpm e 30 °C, 18 horas; com inóculo de 10^8 células de NP5;
- ii) Produção em meio de cultivo com 7,5% de farinha de pena, 0,05% de extrato de levedura e q.s. de água deionizada, a 180 rpm e 37 °C pelo período de 72 horas;

iii) Separação do extrato bruto e sobrenadante por centrifugação por uma hora a 10.000 g seguida de filtração esterilizante do sobrenadante em capela de fluxo laminar com filtro de 0,2 µm;

iv) Armazenamento da fração livre de micro-organismos a -18 °C. Essa foi a fração utilizada para os ensaios *in vitro* e *ex vivo*.

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

0031 Notadamente, em veículos dermatológicos, as emulsões clássicas são os melhores promotores de absorção (Özgüney, I. S.; *et al.* Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from, varios formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 4, article 88 (<http://www.aapspharmscitech.org>), 2006), mas, em virtude de serem compostas por muitos itens e necessitarem preparação com a ajuda de alta temperatura foram descartadas para o estudo inicial. Os quatro veículos selecionados para o ensaio tiveram como critério de seleção a simplicidade da formulação e da técnica de preparação, com a preferência por poucos itens e preparação à temperatura ambiente. Isso visou diminuir as probabilidades de algum adjuvante presente na formulação interagir com o substrato e interferir nos resultados dos ensaios, bem como evitar trabalhar com aquecimento.

0032 Assim, ensaiamos a queratinase produzida por *Bacillus subtilis* NP5 frente a quatro veículos dermatológicos de uso comum, conforme resultados mostrados na tabela 5.

Tabela 5. Atividade queratinolítica do sobrenadante de NP5 associado a veículos dermatológicos a base de polímeros.

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

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

0033 Dentro dos polímeros escolhidos, o Sepigel® caracteriza-se por ser um agente de caráter não iônico, espessante, estabilizante e emulsionante, que pode ser usado individualmente para compor formulações do tipo emulsões-géis viscosas ou ser usado como adjuvante em emulsões cremosas. É estável entre os pHs 2,0 a 12,0 (Souza, V. M. Ativos Dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos. **Tecnopress**, p.159-163, 2003) e apresenta a característica de ser considerado formador de gelcreme, por conter uma fração lipídica no seu polímero. A formulação é preparada a frio e apresenta-se opaca e leitosa. O polímero Aristoflex® AVC também tem caráter não iônico, sendo estável entre os pHs 4,0 a 9,0, originando géis de toque suave e não pegajoso, brilhantes, transparentes, com bom espalhamento e absorção rápida na pele. É preparado a frio e também pode servir como agente de consistência em emulsões (Souza, V. M. Ativos Dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos. **Tecnopress**, p.159-163, 2003). O Carbopol® é um polímero que requer neutralização para a formação de gel e tem caráter iônico. Apesar de amplamente usado, seu caráter iônico o torna incompatível com muitos ativos (Souza, V. M. Ativos Dermatológicos: um guia dos novos ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos. **Tecnopress**, p.159-163, 2003). A goma xantana é usada como agente de controle de reologia em sistemas aquosos ao aumentar a viscosidade e a estabilidade de emulsões e, eventualmente, como único agente suspensor.

0034 Dos quatro veículos, as fórmulas com Sepigel® e Aristoflex® AVC foram as únicas que se mostraram viáveis para incorporarem o EE sem prejuízo da atividade enzimática. Na figura 2 fica evidente que as formulações 1A e 1B nas replicatas de 1 a 4 apresentam uma maior coloração azul quando comparadas com os respectivos controles e os outros veículos (Fig. 1c e 1d). Assim, o gelcreme sepigel® e o gel aristoflex® foram os polímeros escolhidos para compor as novas formulações com o EE para os testes posteriores.

0035 Na tabela 6 estão apresentados os resultados do ensaio de gel e gelcreme frente ao substrato azoqueratina, utilizando o EE no lugar do excipiente original (água deionizada).

Tabela 6. Atividades queratinolíticas do sobrenadante de NP5 incorporado a gelcreme e gel e de substâncias de referência (papaína e proteinase K).

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

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

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

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

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

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

0036 Os dados da tabela 6 foram analisados por teste ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Method. Os resultados são discutidos nos próximos parágrafos.

0037 O grupo da papaína não mostrou diferença significativa entre si, o que nos permite inferir que os veículos não interferiram significativamente na atividade da papaína dentro das condições do nosso ensaio. As amostras ensaiadas no grupo Queratinase exibiram diferenças significativas entre os resultados do Gel Queratinase e do Gelcreme Queratinase ($6,38 \pm 0,54$ e $6,47 \pm 0,69$, respectivamente) quando comparadas com Queratinase ($3,59 \pm 0,79$), mas não foi significativa entre as duas fórmulas. A presença do veículo aumentou a atividade da formulação. Esta variação pode ser devida a

uma maior disponibilização do substrato (azoqueratina) para a ação da enzima. A fim de elucidar que tipo interação ocorreu, novos experimentos ensaiando individualmente os componentes das fórmulas devem ser realizados.

0038 Os grupos Queratinase e Papaína foram analisados entre si por teste ANOVA seguido de Holm-Sidak method. Os resultados foram significativamente diferentes quando comparados em relação às suas atividades em cada veículo:

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

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

0039 Confirma-se, então, que a formulação Queratinase mantém sua atividade enzimática quando incorporado à fórmula e que essa se mostrou superior à atividade da papaína nas condições do nosso ensaio. A proteinase K foi ensaiada somente pura, por se tratar de uma referência padrão (Kojima, M.; Kanai, M.; Tominaga, M. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v. 10, p. 229-235, 2006). A atividade da proteinase K foi estatisticamente significativa frente aos dois grupos, sendo mais ativa que a papaína e menos que o Queratinase. Comparando as atividades de Queratinase e da solução de papaína, temos uma relação de, aproximadamente, quatro vezes mais atividade para Queratinase do que para a papaína. Macedo *et al.* (Macedo, A.J.; Silva, W.O.B.; Termignoni, C. Properties of a non collagen-degradin *Bacillus subtilis* Keratinase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 180-188, 2008) encontrou uma relação similar comparando as atividades queratinolíticas do sobrenadante do *Bacillus subtilis* S14 com papaína frente à azoqueratina (cerca de 3,7 vezes mais atividade para S14).

0040 Com base nas atividades obtidas, o veículo dermatológico escolhido foi o gelcreme sepigel e o mesmo foi utilizado para os testes *in vitro* e *ex vivo* com ajustes de formulação quando necessário.

Ensaio biológico *in vitro* – Formulação com queratinase como Promotora de absorção de fármacos

0041 A calibração dos equipamentos para dosagem do fármaco diclofenaco foi realizada por CLAE seguindo método descrito por Ferrante *et al.* (Ferrante, M.; Andreetta, A.; Landoni, M. F. Effect of different penetration enhancers on diclofenac permeation across horse skin. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 312-315, 2010). A curva de calibração mostrou-se linear e reprodutível na faixa de 0,05 a 50 ug / mL, com R² acima de 0.9995. A curva de calibração média foi de $y = 108678x + 60947$, sendo “y” a área integrada no cromatograma e “x” a concentração (Figura 2).

0042 Visto que a escolha do líquido receptor tem como objetivo simular a circulação sanguínea *ex vivo* e que influencia na penetração cutânea das substâncias, (Sartorelli, P.; *et al.* Percutaneous Penetration Studies for Risk Assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 133-152, 2000) realizamos testes de concentração de saturação do diclofenaco em PBS e salina fisiológica e etanol a 100% (7:3 v/v). Os resultados foram de 0,25 e 10,6 mg/ml para PBS e salina, respectivamente. A fim de cumprir com as condições *sink*, optou-se pela salina. Lopes *et al.* (Lopes, P. S.; *et al.* Determination of diclofenaco sodium in Eagle’s Minimum Essential Medium with Earle’s Balanced Salt Solution. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 4, p.681-684, 2003) também utilizaram as mesmas condições.

0043 Na tabela 7 apresentamos as percentagens médias obtidas pela quantificação de diclofenaco sódico na superfície cutânea (equivalente à primeira fita, a qual reteve o fármaco que não penetrou), no estrato córneo e no líquido receptor realizadas para a formulação Gelcreme Diclofenaco e Gelcreme Diclofenaco + Queratinase nos tempos de 15 minutos, 1, 2, 4 e 12 horas.

Tabela 7: Quantificação de diclofenaco na superfície cutânea, estrato córneo e no líquido receptor após a aplicação de formulações contendo 1,5% do fármaco.

Gelcreme Diclofenaco + Queratinase					
% média em Célula de Franz					
	15 mim	1 hora	2 horas	4 horas	12 horas
Pele	$35,5 \pm 4,6^a$	$24,1 \pm 5,0^a$	$23,4 \pm 6,8$	$29,4 \pm 3,5$	$24,3 \pm 4,9$

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

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

0044 Através da tabela 7 é possível observar que houve uma diferença significativa na retenção de diclofenaco na superfície cutânea quando se compara o Gelcreme Diclofenaco + EE com o Gelcreme Diclofenaco tanto para o tempo de 15 minutos ($35,5 \pm 4,6\%$ e $47,4 \pm 4,5\%$, respectivamente) quanto para o tempo de 1 hora ($24,1 \pm 5,0\%$ e $35,2 \pm 1,3\%$, respectivamente). Para os tempos de 2, 4 e 12 horas não foram observadas diferenças significativas na percentagem de retenção na pele entre as duas fórmulas.

0045 Na avaliação da penetração no estrato córneo, observou-se uma diferença significativa no tempo de 15 minutos: Gelcreme Diclofenaco + EE ($63,9 \pm 4,7\%$) e Gelcreme Diclofenaco ($52,2 \pm 4,5\%$). Para os demais tempos, não houve diferença significativa na percentagem de penetração.

0046 A quantidade de diclofenaco encontrada no líquido receptor não mostrou diferença significativa entre as duas fórmulas em nenhum tempo estudado.

0047 O veículo gelcreme (compartimento doador) mostrou-se adequado ao teste, pois foi capaz de exercer seu efeito liberando o fármaco e o fármaco + Queratinase para os mesmos se difundirem através das camadas da pele, conforme esperado (Foldvari, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 417-425, 2000). O estrato córneo é um local de intensa atividade metabólica extracelular, principalmente devido às enzimas e

lipídeos liberados por exocitose dos corpos lamelares da camada granulosa (Forestier, J.P. Les enzymes de l'espace extra-cellulaire Du stratum corneum. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 14, p.47-63, 1992; Silva, A. P.; Silva, E. A.; Blazquez, F. J. H. Processo de queratinização no desenvolvimento do sistema tegumentar em mamíferos. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.1, p.201-207, 2008). Essas enzimas são, geralmente, hidrolases do tipo glicosidase, fosfolipase, esfingomielinase, fosfatase, estearases, sulfatases e proteases (Forestier, J.P. Les enzymes de l'espace extra-cellulaire Du stratum corneum. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 14, p.47-63, 1992). A epiderme tem mostrado expressar diversas serino proteases, as quais estão envolvidas em múltiplas atividades na pele: proliferação celular, diferenciação, homeostase da barreira lipídica e proteólise do extrato córneo (Voegeli, R.; *et al.* Profiling of serine proteases activities in human stratum corneum. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, p.191-200, 2007). Pelos dados obtidos, podemos afirmar que as queratinases presentes no sobrenadante estudado foram capazes de agir sobre a pele de porco acelerando a penetração do fármaco no tempo de 15 minutos e 1 hora na superfície cutânea e no tempo de 15 minutos para o estrato córneo. Ao mesmo tempo, pelo fato da quantificação no líquido receptor ficar próxima do erro e do desvio padrão para todos os tempos para as duas formulações, é possível inferir que ela não promove absorção sistêmica.

0048 O estrato córneo é a principal resistência à absorção percutânea de muitos fármacos, portanto, muitas substâncias são testadas visando a verificação da atuação como promotores de absorção (Özgüney, I. S.; *et al.* Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from, varios formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 4, article 88 (<http://www.aapspharmscitech.org>), 2006). Ferrante *et al.* Ferrante, M.; Andreetta, A.; Landoni, M. F. Effect of different penetration enhancers on diclofenac permeation across horse skin. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 312-315, 2010) testou 10% de uréia, 15 e 20% de ácido oléico e 5 e 10% de d-limoneno como promotores de penetração de diclofenaco dietilamino em

preparações veterinárias, obtendo sucesso, em diferentes percentuais, com todos eles. Lee *et al.* (Lee, J.; *et al.* The effects of depilatory agents as penetration enhancers on human stratum corneum structures. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 2240-2247, 2008) relata que a absorção de fármacos hidro e lipofílicos aumenta em pele humana (pele proveniente de cirurgia) quando a mesma é previamente tratada com creme depilatório a base de tioglicolato. Ainda, analisando o fato de a atividade significativa ter ocorrido nos tempos iniciais, a formulação enzimática poderá ser útil quando se necessita a ação de substâncias em curto espaço de tempo. Neste caso, com a vantagem de não induzir penetração sistêmica. Exemplos para esse uso são: a associação com peelings químicos e nos casos onde se deseja promover uma rápida absorção de um fármaco.

Ensaio biológico *ex vivo* – Formulação contendo queratinase com agente depilatório

0049 No experimento em Célula de Franz Modificada verificamos a capacidade da Queratinase em agir sobre o estrato córneo. Assim, passamos para o experimento *ex vivo* a fim de avaliar a atividade depilatória e a capacidade de promover alterações na superfície cutânea de três formulações teste: Queratinase, papaína e veículo (Figura 3). O total de quatro grupos foi utilizado no estudo, onde o quarto grupo foi o controle, onde nenhum produto foi utilizado.

0050 É sabido que o uso tópico de enzimas proteolíticas pode induzir esfoliação superficial e, com o uso contínuo, até mesmo alterar propriedades da epiderme e derme, muitas vezes, promovendo resultados semelhantes aos obtidos com o uso de alfa-hidroxiácidos (Traversa, E.; Santelli, G. M. M.; Velasco, M V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papains's depilatory effect. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 335, p. 163-166, 2007); Smith, W.P.; *et al.* Topical proteolytic enzymes affect epidermal and dermal properties. **International Journal of Cosmetics Science**, v. 29, p. 15-21, 2007). A papaína foi escolhida como comparativo por ser uma enzima proteolítica já bastante estudada e é usada em produtos cosmeceúticos de uso

tópico para aumentar a maciez e acelerar a descamação da pele (Lods; Dres; Johson, Scholz, Brooks. The future of enzymes in cosmetics, **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p.85-94, 2001), bem como ter a capacidade de produzir depilação progressiva em pH suportável à pele, retardando o crescimento do pelo (Traversa, E. Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo papaína e avaliação da sua eficácia depilatória sobre o folículo piloso. **Dissertação de mestrado**. São Paulo: USP, p. 159, 2003). A fórmula preparada somente com os componentes do veículo serviu para avaliarmos as ações que este, por si só, causaria na pele. Todas as formulações mostraram-se estáveis à temperatura ambiente pelo período do experimento.

0051 Para o experimento, trabalhamos com quatro grupos de animais, os quais eram observados diariamente quanto ao seu estado geral, manutenção da atividade física, alimentação, recuperação da anestesia e avaliação clínica visual.

0052 Quanto à aplicação da amostra, trabalhamos com a aplicação direta sobre a área, sem oclusão, por se tratar de um experimento prolongado e, também, por se tratar de um estudo que visa obter um futuro produto de uso humano dermatológico, onde a ideia de trabalhar com oclusão diária não é usual.

0053 A análise clínica diária (macroscópica) das regiões depiladas não mostrou sinal de irritação dérmica para nenhum grupo durante todo o experimento (OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **OECD Guide 404** Acute Dermal Irritation-Corrosion, 2002). Eventuais ferimentos no dorso dos animais ocorreram em virtude de incompatibilidades comportamentais entre os mesmos e, em virtude disso, separamos os animais em mais caixas.

0054 Na Figura 4 é possível acompanhar, através de fotografias, a evolução do crescimento dos pelos dos animais durante o período de aplicação das formulações em 0, 10, 16, 22 e 26 dias: 4a) animais do grupo enzima (n = 5); 4b) animais do grupo papaína, veículo e controle (n = 1 de cada grupo).

0055 Fotos dos grupos dos animais no último dia do experimento podem ser vistas na Figura 5 e foto de estudo semelhante, conduzido por Traversa *et al.* (Traversa, E.; Santelli, G. M. M.; Velasco, M V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papains's depilatory effect. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 335, p. 163-166, 2007), pode ser vista na Figura 6.

0056 Ao final do experimento, dos 5 animais do grupo Enzima, 4 apresentaram visualmente um crescimento irregular dos pelos, evidenciando a obtenção da atividade desejada (amostras Enzimas 2, 4, 5 e 7), mesclando áreas pilosas mais densas com outras mais rareadas.

0057 No grupo da Papaína, dois animais apresentaram o lado direito levemente menos denso (em pelos) do que o lado esquerdo (controle individual). Esse resultado condiz com o esperado para a papaína, cujos estudos de Traversa *et al.* (Traversa, E.; Santelli, G. M. M.; Velasco, M V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papains's depilatory effect. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 335, p. 163-166, 2007) mostram que a melhor atividade depilatória da mesma é em veículo à base de emulsão em comparação ao veículo gel, ainda quem em gel ela também apresente atividade depilatória, porém menos intensa.

0058 Para os grupos Veículo e Controle não houve diferenças significativas no crescimento dos pelos que pudessem ser observadas visualmente.

0059 Houve variação, em termos de tempo, para a retomada de crescimento de pelos dos animais, o que nos mostra como as características individuais intra-espécies podem interferir nesse processo. Em média, somente após 15 dias da depilação (início do experimento), os animais começaram a mostrar um crescimento médio mais intenso dos pelos, o que nos permite concluir que pelo o tempo de estudo esteve apropriado (26 dias).

0060 De maneira geral, pode-se inferir que os grupos tratados com enzima e papaína apresentaram áreas pilosas mais falhadas em comparação aos grupos veículo e controle e que, na formulação gelcreme, o Queratinase se mostrou mais eficiente no efeito depilatório do que a papaína. O fato, de cada animal ter

o lado esquerdo como controle individual, além do grupo controle, nos fornece evidências adicionais para essa afirmação.

0061 Na Figura 6 podemos observar uma fotografia de camundongo tratado por 30 dias com aplicação diária de 1 g de creme com papaína 0,8% em 2 cm² do dorso direito (experimento de Traversa, E.; Santelli, G. M. M.; Velasco, M V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papains's depilatory effect. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 335, p. 163-166, 2007). Também há um rareamento de pelos na região tratada, destacando que os principais diferenciais do experimento por ele conduzido em relação ao nosso foi a maior aplicação de amostra por cm² (1 g para 6 cm² no nosso experimento e 1g para 2 cm² para Traversa *et al.* (Traversa, E.; Santelli, G. M. M.; Velasco, M V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papains's depilatory effect. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 335, p. 163-166, 2007)) e o uso do veículo gelcreme no nosso estudo e o uso de creme por ele.

Reivindicações

- 1) FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS, **caracterizada por** uma formulação de loção contendo queratinase bacteriana com ação depilatória e promotora de absorção de fármacos.
- 2) FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** utilizar *Bacillus subtilis* NP5 como meio de cultivo e compreender ainda o uso de farinha de pena, extrato de levedura, água deionizada.
- 3) FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada por** um cultivo de 72 horas a 37 °C e 180 rpm.
- 4) FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada por** compreender opcionalmente um gel não iônico e/ ou gelcreme não iônico.

Figuras

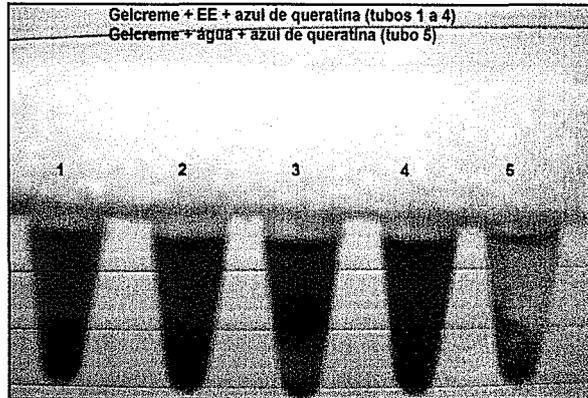


Figura 1a

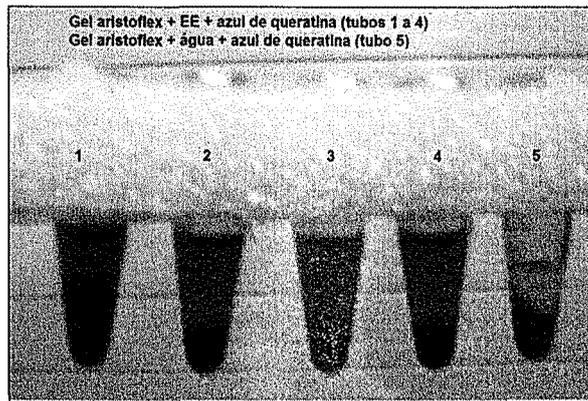


Figura 1b

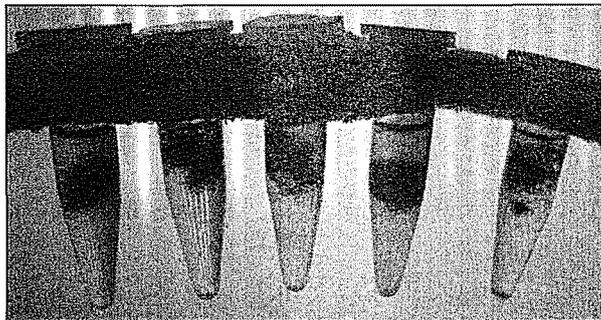


Figura 1c

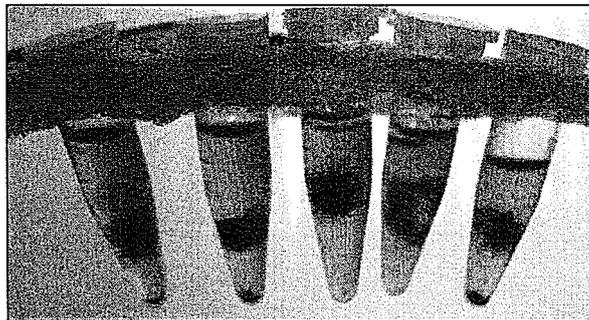


Figura 1d

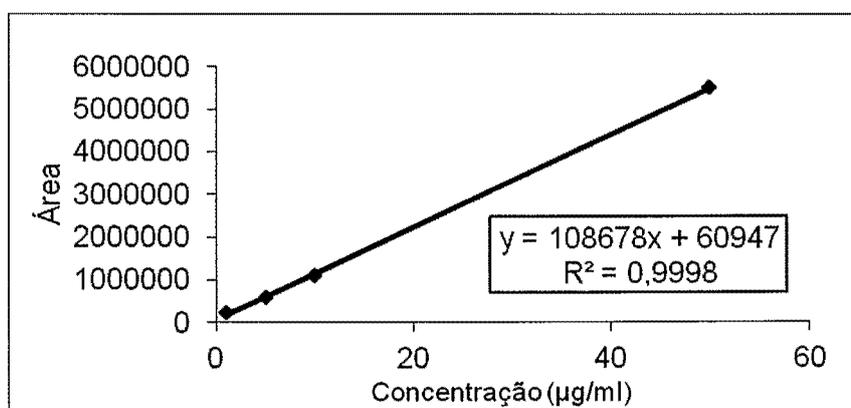


Figura 2

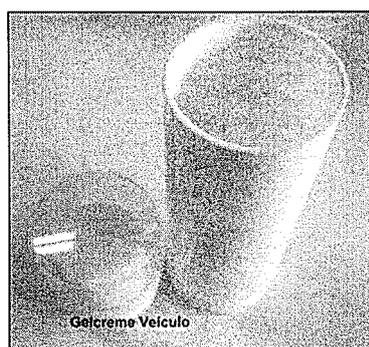


Figura 3a

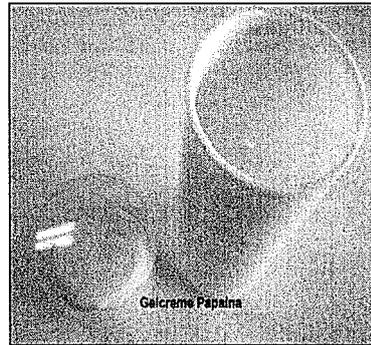


Figura 3b

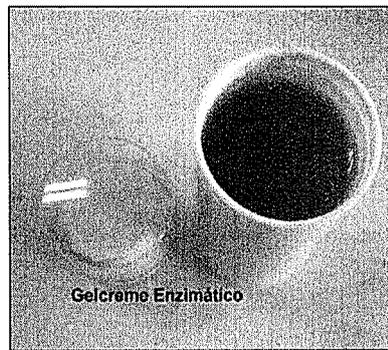


Figura 3c

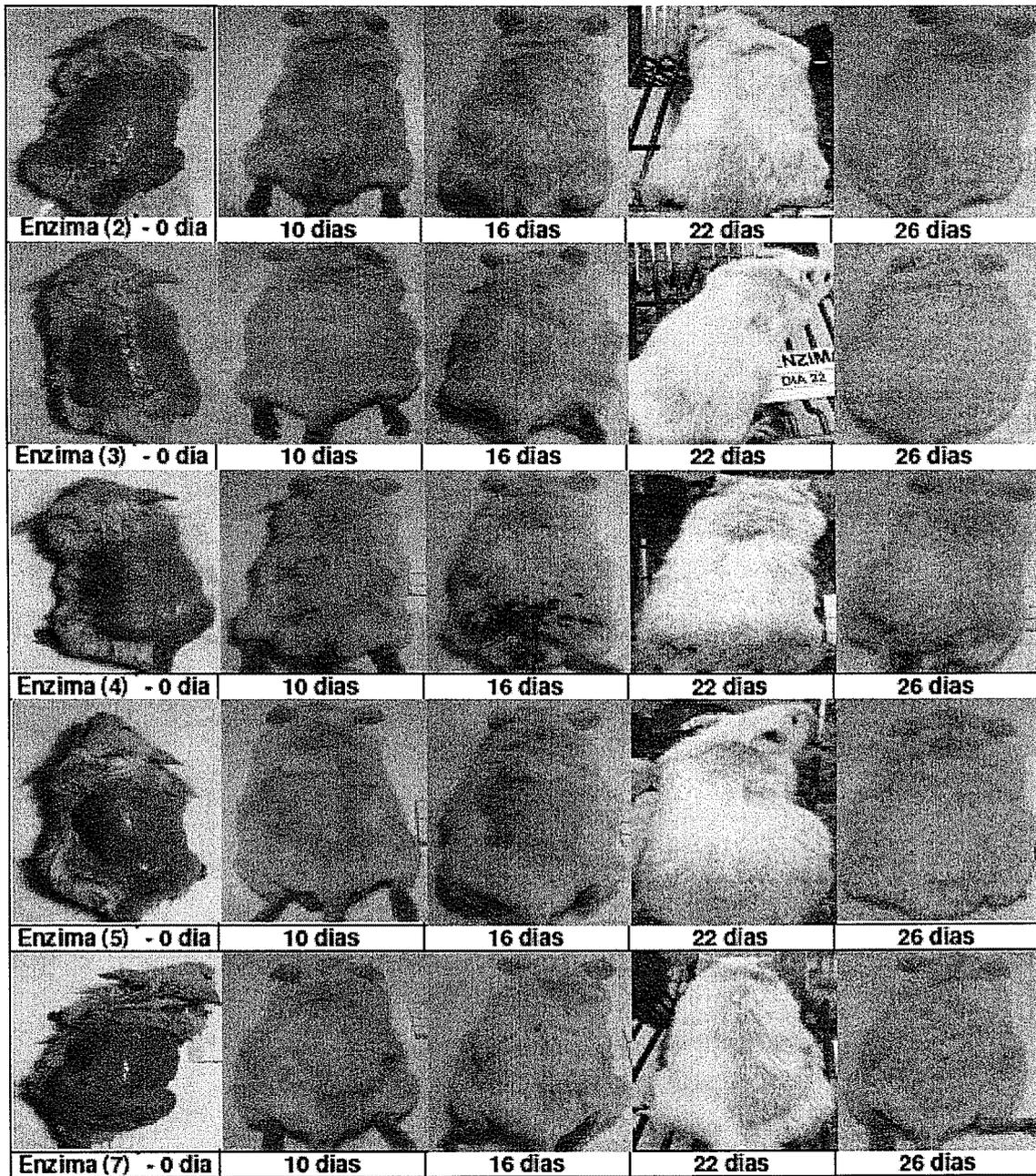


Figura 4a

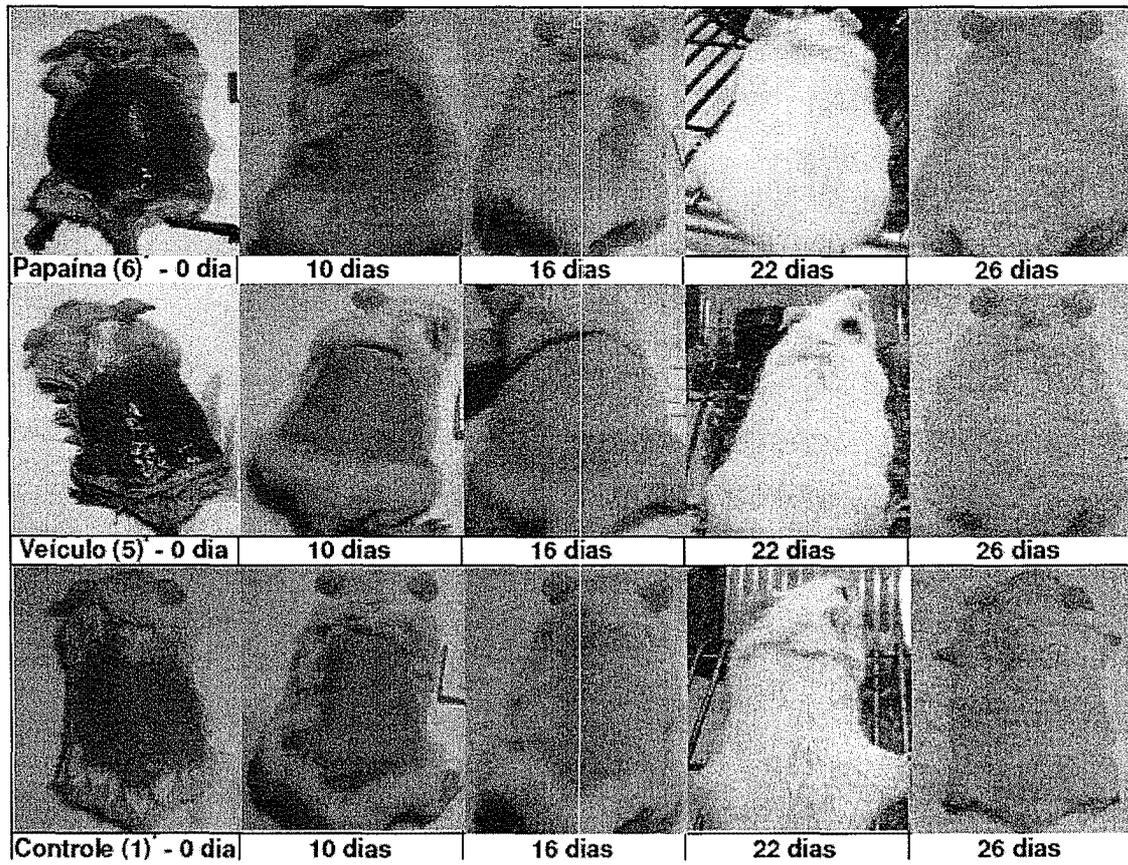


Figura 4b

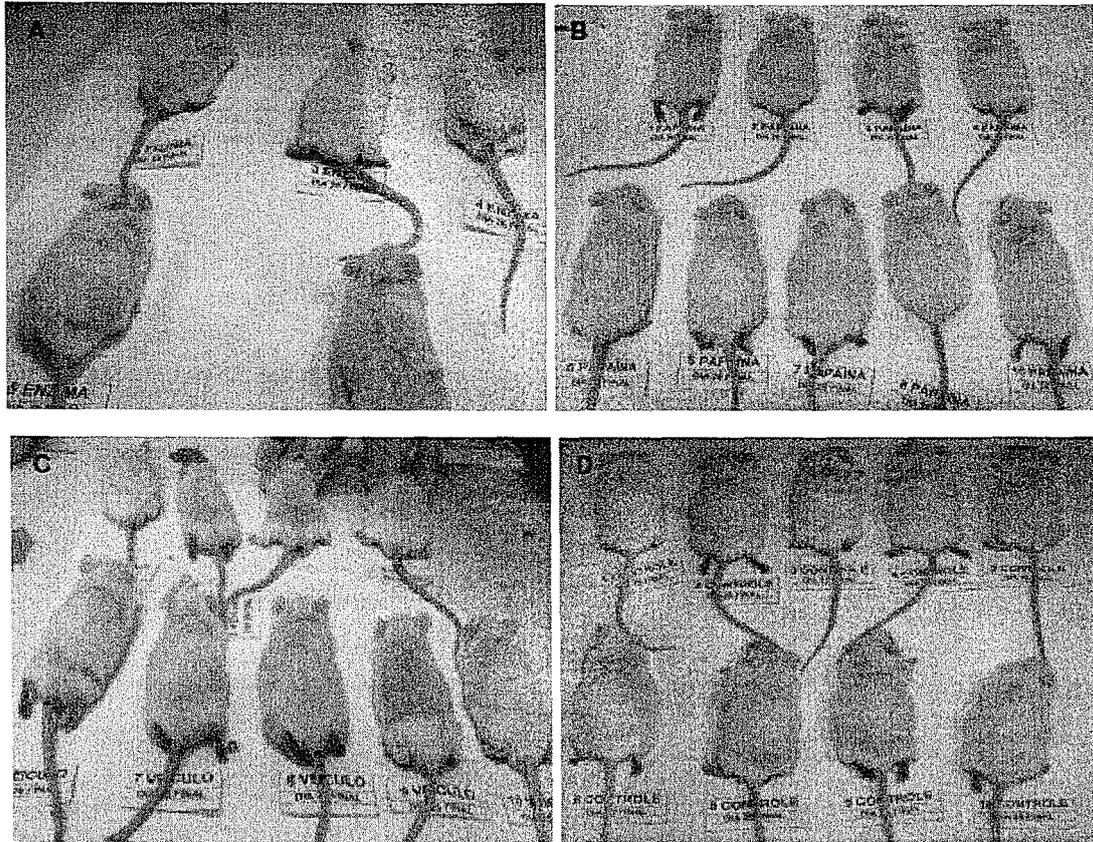


Figura 5

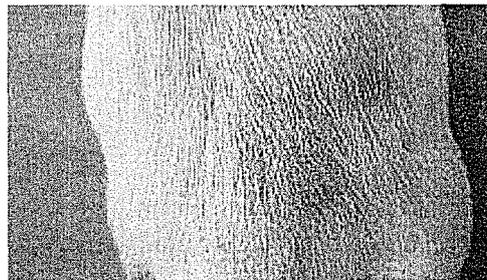


Figura 6

Resumo

FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LOÇÃO CONTENDO QUERATINASE MICROBIANA COMO ÚNICO AGENTE DE AÇÃO DEPILATÓRIA E PROMOTORA DE ABSORÇÃO DE FÁRMACOS

O presente invento descreve o uso de uma enzima bacteriana (queratinase) como ativo em uma formulação cosmética para uso tópico sobre a pele íntegra e que apresenta capacidade de desempenhar duas ações: (a) agente depilatório sem a adição de outras enzimas e/ou aditivos depilatórios tradicionais na formulação e (b) promotora de absorção de fármacos. A enzima do presente invento é obtida pelo processo de fermentação usando como substrato a farinha de pena.