



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

(11) PI 0705059-3 B1

(22) Data do Depósito: 28/06/2007

(45) Data de Concessão: 31/05/2016



(54) Título: HIDROLISADOS DE QUERATINA, PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO OS MESMOS

(51) Int.Cl.: A61K 8/65; C12S 3/14; C12R 1/07; C12R 1/125; A61Q 5/00; A61Q 19/00; A61Q 3/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) Inventor(es): ALANE BEATRIZ VERMELHO, ANA LÚCIA VAZQUEZ VILLA, ANA MARIA MAZOTTO DE ALMEIDA, EDILMA PARAGUAI DE SOUZA DIAS, ELISABETE PEREIRA DOS SANTOS

Relatório Descritivo

HIDROLISADOS DE QUERATINA, PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO OS MESMOS

5

Campo da Invenção

A presente invenção relata um processo para a hidrólise de queratina através de processos microbiológicos e/ou enzimáticos. Em especial a queratina é oriunda de penas de animais, como por exemplo, o frango e são submetidas a hidrólise por uma cepa de *Bacillus sp.*

10

Os hidrolisados apresentam peso molecular menor que 500 Da, o que os torna ideais para aplicações cosméticas, em especial para aplicações em composições para tratamentos re-constitutivos da fibra capilar.

15

Antecedentes da Invenção

É sabido que a queratina possui grande valor na indústria cosmética pro sua ação sobre a fibra capilar. Os hidrolisados de queratina podem ser preparados por hidrólise ácida ou alcalina, ou por digestão enzimática. A função da hidrólise química ou enzimática é de dividir as cadeias peptídicas em peptídeos menores com pesos moleculares mais baixos.

20

A queratina de partida usualmente utilizada pode ter várias origens: pode ser derivada de fibras de cabelo humano, lã, pêlos, penas e chifres.

O estado da técnica possui diversos documentos relativos a hidrolisados de queratina, e seu uso em cosméticos.

25

A patente US 7,220,405 descreve a formulação de cosméticos a base de peptídeos, como condicionadores e colorações para cabelo, hidratantes corporais, corantes cutâneos e corantes para unhas. Peptídeos têm sido descritos como sendo capazes de se ligar com alta afinidade a cabelos, pele e unhas. Dessa forma este trabalho visou o desenvolvimento de produtos de cuidado pessoal contendo peptídeos, provenientes de colágeno, elastina, soja, caseína, seda entre outros, acoplados ao agente ativo do produto diretamente ou via um espaçador.

30

Nesta patente se usa também hidrolisados de várias proteínas, mostrando a eficiência destes peptídeos na cosmética, mas não usa queratina de penas hidrolisadas nem usa o método enzimático para hidrólise das proteínas citadas.

5 A patente US 4,186,188 descreve uso de tripsina para hidrolisar proteínas de uma forma geral, gerando polipeptídios de 200 a 2000 Da com carga positiva que podem ser utilizados em formulações cosméticas pra cabelos, unhas e pele.

A tripsina é uma peptidase que não tem ação sobre a queratina, logo,
10 ela não pode ser usada para hidrolisar queratina. Em nosso trabalho a hidrólise da queratina é feita por queratinases e peptidases com atividade sobre a queratina, produzidas por *B. subtilis* AMR durante a fermentação de penas de frango. Por isto nosso método enzimático-microbiológico apresenta uma maior especificidade, pois a queratinase atua diretamente no polímero de queratina.

15 Os documentos US 2006/134092 e US 5,395,613 descrevem peptidases (trabalho de caracterização enzimática) produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* e *Micrococcus sedentarius* capazes de degradar proteínas altamente resistentes a desnaturação e degradação, entre elas a queratina, prion (primeiro trabalho) e colágeno (segundo trabalho).

20 As patentes acima citadas objetivam a descrição de uma peptidase de *Bacillus* ou *Micrococcus sedentarius* para a degradação de proteínas de difícil degradação como a queratina. Nosso trabalho faz uso de outro microrganismo, o *Bacillus subtilis* cepa AMR queratinolítico, para a degradação de queratina. O objetivo de nosso trabalho não foi recuperar a enzima e sim utilizar os produtos
25 de hidrólise para a adição em formulações cosméticas.

A patente US 6,858,215 apresenta um método para o tratamento de tecidos hiper-queratinizados em mamíferos empregando enzimas proteolíticas desenvolvidas originalmente para a hidrólise de proteínas associadas a alimentos e atualmente é comumente usada para amaciar carne e melhorar o
30 sabor da comida. A composição do produto desenvolvido nesta patente possui essas enzimas amaciantes, que suavizam e esfoliam formações hiper-queratinizadas na pele, como calosidades, granulos, ressecamento, pele escamosa e queratoses sem prejudicar os tecidos adjacentes pela lise seletiva

de tecidos hiper-queratinizados. As enzimas utilizadas (de 1 a 15% na formulação) foram a subtilisina Carlsberg e uma peptidase fúngica de *Aspergillus oryzae*.

5 Esta patente também descreve um produto cosmético e farmacêutico atuando sobre um tecido queratinizado. Porém, nesta patente o processo enzimático visa a hidrólise da queratina "*in situ*", suavizando tecidos hiper-queratinizados como calos. Nossa patente utiliza o produto de hidrólise enzimática de queratina de penas através da ação de peptidases e queratinases de *B. subtilis* AMR em formulação cosmética para cabelos. A
10 patente dos autores acima usa as enzimas diretamente na pele.

A patente US 4,591,497 apresenta um removedor de odor e desodorizante que contém como componente efetivo hidrolisado de material constituído de queratina (de 0,1 a 10% com peso de 200-5000 Da), de pêlo aminal, penas, unhas, cascos, chifres e escamas. A hidrólise da queratina foi
15 alcançada por métodos conhecidos, usando ácidos, álcalis ou enzimas. O composto age efetivamente sobre mercaptanas e sulfeto de hidrogênio removendo seu odor.

O uso de hidrolisados de queratina da patente acima tem um objetivo diferente do apresentando por nosso trabalho. A obtenção deste hidrolisado
20 também emprega uma metodologia diferente. Enquanto o trabalho acima utilizou hidrólise ácida, alcalina ou enzimática, nós utilizamos hidrólise enzimática-microbiológica.

Os documentos US 5,262,307, CA 1108542 e US 4,390,525 descrevem o pré-tratamento do material contendo queratina (penas, cabelos, etc...) com
25 um agente redutor, ou tratamento ácido, seguido da digestão enzimática da queratina desnaturada obtida na primeira fase do processo. Na primeira patente o pré-tratamento é feito com sulfito em solução aquosa (a 60-100 graus) para a desnaturação da queratina. Na segunda, antes da hidrólise enzimática na presença de uréia a queratina é submetida a condições ácidas a
30 temperatura de 80°C. A terceira patente descreve o desenvolvimento de um hidrolisado de queratina contendo pelo menos dois grupos mercapto por molécula e com peso molecular entre 2.000 a 20.000 Da, apropriada para aplicações cosméticas para cabelos, em especial fixadores. O hidrolisado é

preparado pela redução da queratina em solução aquosa em condições alcalinas contendo mercaptano e sulfito, seguido por hidrólise enzimática. Os oligopeptídeos alcançados no final dos processos descritos podem ser utilizados em cosméticos.

5 Nas patentes citadas é feita hidrólise enzimática da queratina previamente reduzida em condições alcalinas ou na presença de sulfito ou parcialmente hidrolisada em ácido. No nosso trabalho, a queratina hidrolisada é obtida da degradação microbiana e enzimática de penas inteiras sem qualquer tratamento químico prévio.

10 Algumas patentes que tratam da hidrólise da queratina por métodos físicos estão descritas abaixo:

A patente US 5,772,968 descreve um sistema, incluindo aparelhos e métodos, para hidrolisar materiais a base de queratina como carcaças não aproveitadas, cabelos, penas entre outros, para a obtenção de produtos
15 protéicos úteis e comercializáveis. Este "sistema de hidrólise" faz uso de uma aparelhagem que promove a quebra da queratina através de aquecimento, expansão, agitação, mistura e secagem. A alta temperatura adicionada ao processo de mistura das penas (material queratinolítico selecionado para o trabalho), num tubo condutor com parafuso, leva a hidrólise do substrato. O
20 objetivo da hidrólise da queratina é aumentar a sua digestibilidade e que ela possa ser utilizada como suplemento alimentar animal.

A patente US 4,172,073 descreve a hidrólise de queratina obtida de estruturas de animais, utilizando vapor saturado à alta pressão, obtendo por fim
25 uma farinha solúvel em água e excelente para uso em alimentação animal, uma vez que é digestível por pepsina.

Estas patentes descrevem processos físicos (temperatura, ação mecânica, alta pressão) para quebrar a molécula de queratina de forma que ela possa ter sua digestibilidade aumentada, ou seja, objetivando seu uso alimentar. Nosso trabalho propõe a hidrólise microbiana e enzimática de
30 queratina de penas, num processo que não requer gastos com aquecimento, tendo como objetivo aplicar os pequenos fragmentos peptídicos gerados em cosméticos de uso capilar.

Algumas patentes que tratam da hidrólise queratina por métodos químicos estão descritas abaixo.

O documento US 2007/0065506 descreve o uso de queratina e seus derivados (50-60.000 Da) como suplemento administrado oralmente para a
5 redução do estresse oxidativo e os benefícios disto como promoção da saúde da pele e promover a resposta antiinflamatória. Os derivados de queratina produzidos foram filamentos intermediários de queratina S-sulfonado, queratina com alto teor de enxofre S-sulfonado e peptídeos de queratina hidrolisada S-sulfonados. Os derivados de queratina foram obtidos de cabelo humano, lã,
10 fibra animal, cascos e chifres, por oxidação parcial.

A queratina nesta patente foi obtida de mamíferos, enquanto foi utilizada penas de frango em nosso trabalho. O tratamento da queratina na patente acima foi químico, enquanto utilizamos métodos enzimático-microbiológicos. O produto final é também completamente diferente.

15 O documento US 2007/128134 apresenta um derivado de queratina solúvel em água e suas aplicações. O derivado de queratina foi obtido pelo tratamento alcalino de penas seguido pela exposição à irradiação em comprimento de onda de alta energia, levando a obtenção de peptídeos com peso molecular entre 5000 a 50.000 Da.

20 O documento US 2004/0210039 relata um processo para solubilizar queratina de materiais constituídos por queratina como penas de frango. A queratina foi solubilizada utilizando sulfito sob condições alcalinas. Neste processo os resíduos de cisteína são parcialmente modificados pela alquilação e a queratina é parcialmente hidrolisada. Esta queratina parcialmente
25 hidrolisada, com peso molecular entre 1.000 e 10.000 Da, e pode ser utilizada para a produção de filmes.

A patente US 5,679,329 descreve o desenvolvimento de uma composição cosmética contendo proteína do leite (0,02% - 15%) e/ou proteínas hidrolisadas do leite e queratina hidrolisada (0,1 – 10%) com peso molecular
30 entre 100 a 200.000 Da. A queratina hidrolisada pode ser obtida pela hidrólise de cabelos, lã, pele, sedas, penas, escamas, cascos e chifres. Neste trabalho a queratina utilizada foi oriunda da hidrólise ácida moderada (fragmentos de aproximadamente 100.000 Da encontrados no KERASOL comercializado pela

CRODA) e controlada (fragmentos de aproximadamente 150 Da obtidas no produto CROQUAT WKP também comercializada pela CRODA) de casco bovino. O produto final é preferencialmente mousse utilizado para fixar penteados.

5 A patente US 5,154,916 descreve a adição de hidrolisado de queratina com peso molecular de 50.000 Da em máscaras para cílios utilizando como base uma cera, melhorando as propriedades de cobertura dos cílios, a estabilidade e comprimento dos cílios. A queratina para hidrólise pode ser obtida de cabelos, lã, cascos, chifres, pêlos, sedas e penas. Foi usada
10 preferencialmente queratina de pele hidrolisada por hidrólise alcalina moderada na concentração entre 0,05 a 5%.

A patente US 4,839,168 descreve a formulação de cosméticos de uso capilar contendo extrato de planta (preferencialmente de videiro, alecrim e hamadriade), extraído com solvente polar e um composto polipeptídico (com
15 peso entre 100 a 100.000 Da) incluindo queratina, hidrolisado de queratina, seda e hidrolisado de seda. A queratina utilizada é proveniente de cabelo humano, lã e penas e foi extraída por métodos de oxidação e redução, e hidrolisada por hidrólise ácida. O produto objetiva melhorar as características sensoriais dos cabelos.

20 A patente US 4,818,520 descreve o uso de hidrolisados de queratina, obtidos de material queratinizado como penas de aves, que podem ser úteis na formulação de produtos que reduzem linhas de expressão para pele, hidratantes, mascaras de pele, xampu, loção para barbear, fortalecedor de unhas e condicionadores. O hidrolisado é obtido por aquecimento de farinha de
25 penas em solução alcalina, sob refluxo, seguido de resfriamento, filtração e acidificação com ácido clorídrico e nova filtração, aquecimento e evaporação. Por fim é feita uma nova etapa com tratamento alcalino seguido de neutralização e assim se obtém queratina hidrolisada líquida.

30 As patentes US 4,465,664 e US 4,460,566 descrevem a composição de produtos para cabelos contendo pelo menos um tipo de derivado de material a base de queratina, como pêlo animal, cabelo humano, lã, unha, penas, cascos, chifres entre outros. Os derivados de queratina foram obtidos por oxidação (que converte as pontes dissulfeto a ácido sulfônico) ou redução (que produz

derivados com grupos tiol) da queratina e usados na concentração de 0,01-10% e 0,1-10%, respectivamente, e tamanho entre 30.000 a 100.000 Da. O produto final da primeira patente tem efeito hidratante sobre o cabelo.

5 A patente US 3,970,614 relata a solubilização de material a base de queratina como penas de frangos, pêlos, cabelos e cascos, através do tratamento com N, N-metilformamida a alta temperatura para produzir um hidrolizado protéico apropriado para uso como suplemento alimentar animal e humano e como matéria-prima na indústria de alimentos.

10 A principal diferença entre as patentes descritas acima e a metodologia desenvolvida por nosso grupo, é o processo utilizado para a hidrólise de queratina, enquanto as patentes acima descritas utilizam hidrólise química (ácida e/ou alcalina, ou utilizando N, N -dimetilformamida), ou reações de oxidação e redução, a nossa utiliza hidrólise enzimática-microbiana, além da fonte de queratina também ser diferente em alguns casos. Enquanto alguns
15 destes trabalhos utilizam queratina proveniente de cascos bovinos e pele, usamos queratina de penas de frango. Nosso produto utiliza apenas queratina hidrolisada com peso molecular inferior a 500 Da, o que facilita a adsorção e penetração dos pequenos fragmentos peptídicos na fibra capilar. O produto final também tem objetivo diferente de algumas das patentes acima.

20 O artigo de Roddick (Roddick-Lanzilotta, A & Kelly R. 2006. Protecting the Hair with Natural Keratin Biopolymers. *Cosmetics & Toiletries*, 121 (5)) descreve duas estratégias para produção de biopolímeros de queratina intacta e peptídeos de queratina provenientes de lã de ovelha para aplicação em cosméticos de uso capilar. Este polímero se liga a sítios preferenciais na fibra protegendo o cabelo de danos, além de conter propriedades antioxidantes. A
25 produção da queratina envolve etapas de purificação para obtenção de queratina intacta (55 kDa), que tem propriedades para formação de filmes que podem ser aplicados em cosméticos. Os peptídeos de baixo peso molecular, capazes de entrar no córtex da fibra capilar, foram obtidos da *Croda Chemicals Europe*, ou seja, obtidos por hidrólise química.
30

A obtenção da queratina intacta citada no trabalho acima não foi o alvo do nosso trabalho, apesar de queratina intacta de penas (aproximadamente 10 kDa) ter sido encontrada no sobrenadante de cultura do microrganismo

utilizado (dado não mostrado). O artigo cita etapas de purificação o que onera a produção da proteína. O hidrolisado utilizado por eles foi obtido por hidrólise química, enquanto a do nosso trabalho foi por hidrólise microbiana.

Na literatura há uma ampla quantidade de trabalhos relatando a
 5 degradação de penas por microrganismos queratinolíticos através de fermentação submersa das penas objetivando utilizar o hidrolisado de queratina obtido como suplemento protéico alimentar na dieta de animal. Em contrapartida, nosso trabalho visou aplicar estes hidrolisados provenientes da digestão microbiana em formulações cosméticas para uso capilar, uma
 10 finalidade inédita para esses produtos da fermentação das penas. Abaixo estão listadas as patentes, teses e artigos científicos utilizando a hidrólise microbiológica de penas para obtenção de hidrolisados de queratina para uso em rações. Nenhum dos documentos citados abaixo utiliza o microorganismo *Bacillus subtilis* cepa AMR.

15 Os principais documentos são US 6,214,576, US 5,887,000, US 5,186,961, US 5,063,161 e US 4,908,220.

Maciel, J. L. Produção de hidrolisados protéicos de penas de frango utilizando bactérias queratinolíticas. 2006. Dissertação de Mestrado. UFRGS.

20 Grazziotin A., Pimentel, F. A., Sangali, S., Jong, E. V. and Brandelli, A. 2007. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresour. Technol.* 98(16):3172-5.

Geun-Tae Parka, Hong-Joo Sonb, 2007. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological Research* (in press).

25 Mio Kojima, M., Kanai, M., Tominaga, M., Kitazume, S., Inoue, A. and Horikoshi, K. 2006 Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA 30-01. *Extremophiles* 10: 229–235.

30 Brandelli, A. & Riffel, A. 2005. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN: 0717-3458.

El-Refai, H. A., AbdelNaby, M. A., Gaballa, A., El-Araby, M. H. & Abdel Fattah, A. F. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40: 2325-2332.

Grazziotin, A., Pimentel F.A., de Jong, E.V. and Brandelli A. 2005. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*, article in press.

5 Suntorsuk, W. & Suntorsuk, L. 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*, 86: 239-243.

Nam, G., Lee, D., Lee H., Lee, N., Kim, B., Choe, E., Hwang, J., Suhartono, M. T., and Pyun, Y. 2002.

10 Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch Microbiol* 178 :538–547.

Longshaw, C. M., Wrright, J. D., Farrel, A. M. & Holland, K. T. 2002. *Kyptococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. *Journal of Applied Microbiology* 93:810-816.

15 Muhsin, T. M., & Hadi, R. B. 2002. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge *Mycopathologia* 154: 185–189.

20 Yamamura, S., Yasutaka, M., Quamrul, H., Yokoyama, K. & Tamiya, E. 2002. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenetrophomonas* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 1138-1143.

Kim, J. M., Lim, W. J., Suh, H. J. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*, 37: 287-291.

25 el-Naghy, M. A., el-Ktatny, M. S., Fadi-Allah, E. M. & Nacer, W. W. 1998. Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. *Mycopathologia*, 14(2): 77-84.

Dalev, P., Ivanov, I. & Liubomirova. 1997. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. *J. Sci Food Agric*, 73: 242-244.

30 Singh, C. J. 1997. Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. *Mycopathologia*, 137: 13-16.

Santos, R. M. D. B., Firmino, A. A. P. & Félix, C. R. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus fresenius*. *Curr Microbiol*, 33(6): 340-370.

Lin, X., Lee, C., Casale, E. S. & Shih, J. H. 1992, Purification and characterization of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3271-3275.

5 **Objetivos da Invenção**

É um objeto da presente invenção um processo de hidrólise de queratina, compreendendo as etapas de:

a) misturar:

10 a.1) de 10^6 a 5×10^7 células/mL de pelo menos uma bactéria da espécie *B. subtilis*;

a.2) de 0,1% a 5% p/p de um material contendo fibras de queratina;

a.3) de 0,005% a 10% p/p de meio de cultivo;

15 onde o pH do meio está compreendido na faixa que vai de 7,5 a 8,5;

b) manter a mistura em a) em uma temperatura que varia de 20°C a 35°C e sob agitação;

c) separar o sobrenadante obtido em b);

d) separar os peptídeos hidrolisados do sobrenadante da etapa c);

20 Em uma realização preferida da invenção, o *B. subtilis* é o *B. subtilis* cepa AMR.

Em uma realização preferida da invenção, o material contendo fibras de queratina é pena de frango.

Em uma realização preferida da presente invenção, o pH é 8,0.

25 Em uma realização preferida da presente invenção, o meio de cultivo compreende extrato de levedura, peptona, KCl, sacarose ou mistura dos mesmos.

Em uma realização preferida da presente invenção, a mistura é mantida em uma temperatura de 28°C e sob agitação de 300 rpm.

30 Em uma realização preferida da presente invenção, a separação do sobrenadante é feita por centrifugação, em especial por centrifugação a 4.000 rpm por 20 min.

Em uma realização preferida da presente invenção, a separação dos peptídeos hidrolisados é feita por ultrafiltração

É um adicional objeto da presente invenção um processo opcional de preparação do material contendo fibras de queratina compreendendo pelo menos uma etapa de lavagem e/ou delipidação.

Em uma realização preferida, as penas de frango são lavadas com detergente e água, secas, delipidadas com uma mistura de clorofórmio:metanol e secas.

É um adicional objeto da presente invenção um hidrolisado de queratina com peso molecular compreendido na faixa que vai de 500 a 1000 Da. Em especial, o hidrolisado de queratina é obtido pelo processo da presente invenção.

É um adicional objeto da presente invenção uma composição cosmética compreendendo um hidrolisado de queratina em uma concentração que varia de 0,0001% p/p a 20% p/v.

Em uma realização preferida da presente invenção, a composição cosmética é aplicada sobre tecidos queratinosos, como cabelo, pele e/ou unhas.

Em uma realização preferida da presente invenção, a composição cosmética é um xampu.

Em uma realização preferida da presente invenção, a composição cosmética é um creme condicionador.

Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra o MALDI-TOF do sobrenadante de cultura do *B. subtilis*, AMR em meio de penas após 120h de cultivo, mostrando os peptídeos derivados da queratina da pena.

A Figura 2 mostra o MALDI TOF dos hidrolisados de queratina da CRODA obtidos de cascos de porcos

A Figura 3 mostra a zimografia com gelatina e queratina do sobrenadante de *Bacillus subtilis* em penas demonstrando a presença de enzimas proteolíticas e queratinolíticas.

A Figura 4 mostra o HPTLC dos hidrolisados de queratina de penas por degradação microbiana. 1- controle de glicina; 2-peptídeos recolhidos pela membrana de 1000 Da; 3- peptídeos recolhidos pela membrana de 500 Da; 4- hidrolisado comercial Queratan.

5 A Figura 5 mostra o SDS-PAGE do material retido e filtrado pela membrana de 1000 Da pelo processo de ultrafiltração em AMICON. Coloração: nitrato de prata.

A Figura 6 mostra o zimograma do material retido e filtrado pela membrana de 1000 Da pelo processo de ultrafiltração em AMICON. Coloração:
10 coomassie blue.

A Figura 7 mostra o fluxograma da metodologia empregada, exemplificando o tratamento ao qual as mechas foram submetidas.

A Figura 8 mostra a avaliação do teor de hidratação para as mechas secas sem calor (temperatura ambiente). Grupo de mechas: 1 – cabelo virgem;
15 2 - cabelo tingido; 3 – cabelo tingido com luzes, 4 – cabelo tingido com alisamento; e 5 – cabelo totalmente descolorado.

A Figura 9 mostra a avaliação do teor de hidratação para as mechas secas com calor e placa térmica. Grupo de mechas: 1 – cabelo virgem; 2 -
cabelo tingido; 3 – cabelo tingido com luzes, 4 – cabelo tingido com alisamento;
20 e 5 – cabelo totalmente descolorado.

A Figura 10 mostra a representação gráfica dos resultados da análise sensorial para o grupo de mechas secas sem calor.

A Figura 11 mostra a representação gráfica dos resultados da análise sensorial para o grupo de mechas secas com calor.

25

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui descritos não tem o intuito de limitar o escopo da invenção, e sim somente de exemplificar uma forma preferida de realizar a invenção. Qualquer outra forma de realização semelhante e/ou equivalente
30 deve ser interpretada como dentro do escopo da invenção.

Material contendo fibras de queratina

Um material contendo fibras de queratina adequado de acordo com a presente invenção pode ser escolhido do grupo que compreende fontes naturais de fibras de queratina como por exemplo cabelo, penas, cascos, unhas, chifres e similares. As penas são um material de partida preferencial, especialmente penas de frango, galinha, patos, gansos ou outras aves, como por exemplo subprodutos da indústria avícola.

A fibra de queratina é preferencialmente submetida a um pré-tratamento tais como limpeza, lavagem, delipidação, corte, moagem, secagem ou combinações dos mesmos. Esse pré-tratamento tem a finalidade de facilitar o manuseio da fibra de queratina e pode melhorar a eficiência geral do processo e pode também influir na qualidade do produto final.

B. subtilis

A bactéria útil na presente invenção é a espécie *Bacillus subtilis*. Em especial, a espécie útil na presente invenção pode ser escolhida dentre diversas variantes. A mais adequada é a variante *B. subtilis* cepa AMR.

Composição Cosmética

Um técnico no assunto pode escolher a forma apropriada, e também o método de preparo, baseado no conhecimento da área, levando em conta a natureza dos ingredientes utilizados, em especial sua solubilidade, e também o uso pretendido pela composição.

As composições de acordo com a presente invenção podem estar na forma de soluções aquosa, misturas álcool-água, ou oleosas, emulsões óleo-em-água, água-em-óleo ou emulsões múltiplas, géis aquosos ou oleosos, produtos anidros, ou dispersões de uma fase oleosa em uma fase aquosa compreendendo nanopartículas, como nanoesferas e nanocápsulas, ou vesículas lipídicas iônicas (lipossomos) e/ou não-iônicas.

Quando a composição de acordo com a invenção é uma emulsão, a proporção da fase oleosa pode variar, por exemplo de 5% a 80% por peso, preferencialmente de 5% a 50% por peso total da composição. Os óleos, emulsificantes e co-emulsificantes usados na composição são escolhidos dentre aqueles usados convencionalmente no campo técnico correspondente. O emulsificante e o co-emulsificante podem estar presente na composição em

uma proporção variando de 0,3% a 30% por peso, preferencialmente de 0,5% a 20% por peso relativo ao peso total da composição.

Para aplicações no cabelo, a composição pode preferencialmente estar na forma de cremes, loções, géis, emulsões ou mousses, ou na forma de aerossóis, compreendendo um propelente pressurizado. Ela pode estar na forma de uma loção para cuidados capilares, um xampu ou condicionador, um sabonete líquido e/ou sólido, um produto para modelar o cabelo (gel modelador, mousse, laquê), um xampu coloridor, uma composição para alisamento, um creme espumante. Também pode estar na forma de uma tintura, para ser aplicada com pincel ou pente.

Para aplicações nas unhas, a composição pode, preferencialmente ser um produto como um esmalte colorido, um esmalte base, ou outro produto para ser aplicado sob ou sobre outro produto, um removedor de esmalte, ou um produto para proteger, fortalecer e/ou reparar as unhas.

Para aplicações na pele, a composição pode preferencialmente ser mais ou menos viscosa, e pode ter a aparência de, por exemplo, um creme branco ou colorido, uma pomada, uma loção, uma pasta.

As composições podem ser aplicadas por qualquer meio adequado, como pincéis, sprays, ou com os dedos, por exemplo.

As composições também estão associadas a processos para cuidado, tratamento, fortalecimento e/ou reparação de substratos queratínicos, onde a composição definida na presente invenção é aplicada sobre a pele, cabelos (incluindo cílios) e/ou unhas, opcionalmente seguida de rinsagem.

Para efeitos dessa invenção a expressão "cuidado de substratos queratínicos" significa uma composição direcionada a melhorar a aparência e/ou a superfície de substratos queratínicos. O cuidado de tais substratos pode consistir em tornar o cabelo mais suave e menos quebradiço.

Para efeitos dessa invenção a expressão "fortalecer e/ou reparar substratos queratínicos" significa uma composição direcionada a conservar e/ou restaurar as propriedades físicas e/ou mecânicas de tais substratos, que podem se manifestar como por exemplo: rigidez dos substratos queratínicos, que confere maior consistência, e também um toque mais agradável, resultando em um aumento do volume das fibras queratínicas e também

facilidade na modelagem e manutenção do penteado; melhor elasticidade e/ou resistência a forças mecânicas aplicadas, como por exemplo durante o pentear.

O hidrolisado de queratina obtido não causa interferência na cor do produto onde ele é aplicado (xampu e creme rinse) uma vez que possui uma coloração clara, diferente de muitos hidrolisados disponíveis no mercado que possuem tonalidade forte e podem influenciar a cor final do produto. O hidrolisado da presente invenção pode estar presente na formulação cosmética em uma proporção de 0,0001% p/p a 20% p/p.

Principais Vantagens

As principais vantagens do hidrolisado apresentado nesta invenção em relação ao estado da técnica são:

- Obtenção de peptídeos da massa molecular menor;

O uso de peptídeos de 500 Daltons de massa molecular permite uma melhor penetração dos peptídeos na cutícula do cabelo. As preparações existentes no mercado apresentam peptídeos na faixa de 980-1300 Daltons.

- Uso de tecnologia limpa

Os processos biocatalisados por enzimas são menos poluentes. As características destes processos industriais e a biodegradabilidade apresentada pelos seus efluentes atendem às exigências das normas ISO 9000 e ISO 14001, que estabelecem padrões para a qualidade de produtos e norteiam as características dos processos de produção, dando ênfase ao menor consumo energético, ao baixo impacto ambiental e à maior qualidade dos produtos. Neste contexto é importante ressaltar que o processamento enzimático de matérias primas resulta em produtos de maior valor agregado.

- O uso de microrganismo como produtores diretos do biocatalizador (enzima) no sistema de produção dos hidrolisados de queratina.

O uso de microrganismos nos sistemas de produção dos hidrolisados de queratina é vantajoso por que, pode-se facilmente obter grandes populações de microrganismos e conseqüentemente mais enzima, reduzindo o tempo de degradação das penas, além de se ter um controle da produção em todas as fases. Outras vantagens são que os microrganismos podem ser geneticamente melhorados, aumentando a quantidade e/ou qualidade do biocatalizador produzido, permitindo também sempre selecionar cepas de alta atividade.

- O meio de crescimento é barato

O meio de crescimento é barato devido a abundância de matéria prima no Brasil (resíduos agro-industriais da indústria avícola). Portanto é um método que ainda tem a vantagem de potencialmente poder aproveitar um dos principais resíduos gerados pelas atividades industriais brasileiras.

- Favorece a reciclagem de materiais podendo gerar acordos produtivos entre empresas

A indústria cosmética pode fazer um importante link com a indústria avícola para aproveitamento destes resíduos, evitando que os mesmos sejam incorporados em rações animais ou poluindo o ambiente. O sistema de compostagem que a indústria usa das penas e da cama de frango é inviável para absorver toda a produção nacional.

Exemplo 1. Preparo das Penas de frango

As penas utilizadas no meio de cultura foram penas de frango brancas lavadas com detergente em água corrente, secas a 60°C e delipidadas com clorofórmio: metanol (1:1 v/v) por 1h sob agitação de 300 rpm a temperatura ambiente. A delipidação foi feita em Becker de 4 litros com 1/3 do volume do mesmo em penas com 1L da solução de clorofórmio: metanol 1;1 (v/v). Em seguida as penas foram removidas e secas overnight a 60°C. A penas foram adicionadas inteiras no meio de cultura como principal fonte de carbono e nitrogênio.

Exemplo 2. Microrganismo e condições de cultura

Para obtenção dos hidrolisados de queratina utilizou-se o *Bacillus subtilis* cepa AMR, isolado pelo nosso laboratório de resíduos agro-industriais da indústria avícola RICA e atualmente depositado na coleção de cultura da Fundação Oswaldo Cruz com o numero de registro 1266. Este microrganismo foi escolhido devido a sua intensa atividade queratinolítica para penas de frango. O bacilo foi cultivado em meio extrato de levedura (extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, KCl 2,0% e sacarose 2,0%;) por 2 dias a 28°C sob agitação constante (300 rpm) para obter massa celular e lavados com salina (2x 3000rpm/20min) para remoção dos componentes do meio antes de serem inoculados nos meio contendo penas a 1%.Em seguida as células foram transferidas para meio PBS pH 8,0 (NaH₂PO₄ 0,06M e K₂HPO₄ 0,04M) com 1% de penas de frango (preparadas segundo o

procedimento descrito no item anterior) e suplementado com 0,01% de extrato de levedura. A amostra foi cultivada neste meio durante 5 dias a 28°C sob agitação de 300 rpm. Ao término da fermentação do bacilo no meio contendo penas como principal fonte de carbono e nitrogênio, o sobrenadante foi recolhido por centrifugação a 4.000 rpm por 20 minutos (MAZOTTO, A. M. 2005. Queratinases de *Bacillus licheniformis* AMR isolado da indústria avícola. 2005. Trabalho monográfico (Bacharel em Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes/UFRJ, Rio de Janeiro, 2005).

10 Exemplo 3. Análise dos peptídeos presentes no meio de cultura por MALDI-TOF

Foram feitas análises em MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionisation – Time of flight) para detecção de peptídeos no sobrenadante de cultura (obtido segundo o item anterior) gerados pela hidrólise de penas pelas peptidases do *B.subtilis* AMR. O sobrenadante contendo 4,99 mg/ml de proteínas dosadas pelo método de Lowry (LOWRY, O. H.; ROSEMBROUGH, N. J.; FARR, A. L. AND RANDALL,RJ.1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. **193** (1): 267 – 275), foi parcialmente purificadas em ZipTip C₁₈. O ZipTip C₁₈ foi equilibrado com uma solução de acetonitrila (ACN) 100% seguida pela lavagem com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Após este processo, os peptídeos foram fixados na resina do ZipTip C₁₈, lavados com TFA 0,1% para remoção de sais, fosfatos e/ou DMSO que causam ruído na leitura. A eluição foi feita com 0,1% de TFA em ACN 50%. As amostras purificadas foram incorporadas as matrizes de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (5 μ g/mL em TFA 0,1% em ACN 50%) 1:1. A mistura foi então aplicada na placa para análise por MALDI-TOF. Análise em MALDI-TOF revelou fragmentos com massa molecular de 800-1100 Dalton no sobrenadante bruto das culturas (Figura 1) (Mazotto, 2005).

O mesmo procedimento de preparação realizado para o sobrenadante de cultura foi também feito para a preparação comercial da CRODA diluída 100x. O perfil de pequenos fragmentos peptídicos observado no sobrenadante de cultura do bacilo foi também observado na preparação comercial da CRODA (Figura 2) (Mazotto, 2005).

Exemplo 4. Separação dos hidrolisados de queratina de penas de frango e análise dos aminoácidos e peptídeos gerados por HPTLC

O sobrenadante de cultura além de conter os peptídeos oriundos da hidrólise das penas, apresentava também as queratinases e peptidases secretadas pelo *Bacillus subtilis* AMR. A figura 3 mostra dois zimogramas com gelatina e queratina do sobrenadante de cultura bruto concentrado 20X em membrana de diálise overnight contra polietilenoglicol. As zimografias foram preparadas segundo metodologia descrita por Heussen & Dowdle (HEUSSEN, C. & DOWDLE, E. B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. Anal. Biochem, **102**:196-202.), porém utilizando gelatina (Merck) e queratina extraída de penas de frango com DMSO como substratos incorporados a malha de poliacrilamida a 12,5%.

Para ter uma preparação contendo apenas os peptídeos, o sobrenadante foi submetido a ultrafiltração, usando o sistema AMICON, com o objetivo de separar os peptídeos de até 500 e 1000 Dalton através de membranas de celulose regenerada Millipore de 500 e 1000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit), respectivamente. A figura 4 mostra estes peptídeos e aminoácidos e os compara com uma preparação comercial de queratina de penas hidrolisada da POLYTECHNO denominado **Queratan**, através de HPTLC (high performance thin layer chromatography) e revelado com ninhidrina, mostrando que a queratina de penas hidrolisadas pelo *B. subtilis* AMR tem um padrão de aminoácidos e peptídeos semelhante ao da preparação comercial usada. Observa-se também que o Queratan possui, em adição, peptídeos com massa molecular maior (Fig.6, linha 5). Comparativamente nosso procedimento é melhor por ter apenas peptídeos de baixa massa molecular que tem um poder de penetração melhor na fibra capilar. Como controle foi utilizado uma solução de glicina (1 mg/ml), um aminoácido presente em alta concentração nas penas, 76,6 g/kg (DALEV, P. 2000. Utilization of biodegradable keratin and collagen- containing wastes through enzymatic treatment. Wolfsburg. Orbiti Association).

No HPTLC foram aplicadas 10 µL de peptídeos separados do sobrenadante com membrana de 500 e 1000 Da.

Durante a ultrafiltração ficaram retidas nas membranas basicamente proteínas com massa molecular acima do seu limite de exclusão, incluídos as enzimas e moléculas de queratina solubilizadas, porém não hidrolisadas (com peso molecular de aproximadamente 10 kDa). O retido pela membrana e os peptídeos menores que seu limite de exclusão (filtrado) foram examinados por SDS-PAGE (LAEMMLI, V. K. 1970. Cleavage of structural during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**: 680-685.) e corado pelo método de coloração por nitrato de prata (figura 5) e zimografia (HEUSSEN, C. & DOWDLE, E. B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. Anal. Biochem, **102**:196-202.), como mostrado na figura 6. O SDS-PAGE mostrou a presença de proteínas apenas no retido pela membrana (foram aplicadas 30 µL de amostra), um resultado esperado, uma vez que peptídeos e aminoácidos (foram aplicados 60 µl de amostra) estão fora do limite de detecção da técnica, o mesmo é válido para a zimografia. Esta mostrou que houve perda de atividade do sobrenadante de cultura durante o processo de ultrafiltração, quando comparado com a zimografia do sobrenadante antes da ultrafiltração (figura 3 e figura 6). O SDS-PAGE e a zimografia mostraram a completa ausência de proteínas na fração peptídica confirmando que não houve contaminação do hidrolisado com proteínas e enzimas proteolíticas respectivamente.

Exemplo 5. Aplicação cosmética dos peptídeos de hidrolisado de pena de frango

Os peptídeos de peso molecular menores que 500 Dalton obtidos através da ultrafiltração em AMICON (membrana 500 NMWL), foram incorporados em duas bases cosméticas: um xampu suave e um creme rinse com enxágüe, ambos contendo 10% do material filtrado através de membrana de AMICON de 500 NMWL.

Xampu suave com 10% de hidrolisado microbiano de penas de frango contendo peptídeos menores que 500 Da

Lauril éter sulfato sódio.....	30%
Decil poliglicosídeo.....	5%
Lauril poliglicosídeo.....	5%

	Surfax ácido.....	3%
	Dietanolamida de ácido graxo de côco.....	4%
	Phenochen ou Phenova.....	0,5%
	Germal 115	0,2%
5	Hidrolisado de queratina	10%
	Unistab 569	0,2%
	Essência de erva-doce	0,5%
	Água destilada q.s.p	100 ml

O Germal requer aquecimento (80°C) para a sua dissolução em água
 10 destilada. Após a dissolução do Germal, os demais componentes foram
 adicionados a solução. O poliglicosídeos devem ser aquecidos para
 incorporação a solução anterior. A homogeneização deve ser feita lentamente
 para evitar formação de espuma. Finalizar adicionando o hidrolisado
 microbiano de penas, o Unistab 569 e a essência. completar o volume final,
 15 homogeneizando.

**Creme rinse com enxágüe com 10% de hidrolisado microbiano de penas
 de frango contendo peptídeos menores que 500 Da**

FASE OLEOSA

	Álcool cetoestearílico.....	5%
20	Phenova	0,5%
	Cloreto de cetiltrimetilamonio.....	0,5%

FASE AQUOSA

	Germal 115	0,2%
	Essência erva-doce	0,5%
25	Corante	0,2%
	Hidrolisado de queratina	10%
	Água destilada q.s.p.....	100ml

Todos os componentes da fase oleosa foram aquecidos (75°C) juntos e
 homogeneizados até completa dissolução. Em outro recipiente o germal foi
 30 dissolvido sob aquecimento a 80°C. Após atingir as temperaturas, a fase
 oleosa foi acrescida a fase aquosa, sob agitação, até emulsificar. A solução
 obtida foi colocada em banho frio, homogeneizada e acrescida das demais
 substâncias da fase aquosa.

Estes produtos foram aplicados em mechas de cabelos virgem e quimicamente tratados, previamente lavados e desengordurados e durante 5 semanas, submetidos ao tratamento com o xampu suave e creme rinse, contendo o hidrolisado microbiano de queratina, e a secagem com calor seguida de placa térmica de 180°C e a temperatura ambiente, com a finalidade de avaliar o grau de hidratação das fibras capilares.

As mechas foram separadas em 5 grupos diferentes. Estes são compostos por mechas de cabelos virgens, tingidos, tingidos com alisamento, tingido com luzes (descoloração) e totalmente descolorados. Cada grupo contém quatro mechas, sendo duas com os hidrolisados de queratina a 10% e duas mechas controles. Antes da realização dos ensaios todas as mechas foram devidamente lavadas com xampu de lauril sulfato de sódio 2%, e enxaguadas com água destilada. Esse procedimento visou eliminar quaisquer materiais adsorvidos ao fio, evitando-se interferência no ensaio. Abaixo está ilustrado o fluxograma da metodologia utilizada para o processo de tratamento e medição da hidratação (figura 7).

Os ensaios de medição de hidratação foram realizados em aparelho CORNEOMETHER marca CM 825. Foram realizados em paralelo, no mesmo grupo de mechas, ensaios controle com as bases cosméticas sem os peptídeos de hidrolisado de pena de frango. As formulações foram manipuladas no Laboratório de Farmacotécnica da UNESA – Campus Rebouças. Foi aplicado teste sensorial para avaliação do brilho e emoliência do cabelo.

Exemplo 6. Medida da Hidratação

O processo de medição de hidratação das mechas foi realizado a cada sete dias num período de cinco semanas no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) da Farmácia Universitária da UFRJ. Para isso, foi utilizado o aparelho CORNEOMETHER marca CM 825. A função deste aparelho é avaliar a quantidade de água evaporada através da fibra capilar por variação de campo. O método está baseado na grande variabilidade do vapor da constante dielétrica da água a qual é registrada automaticamente no aparelho. O valor medido é dado em Unidade Arbitrária de Hidratação (UA), sendo utilizado para a medição das mechas do cabelo. A temperatura e a umidade do ambiente

foram sempre monitoradas e as mesmas estavam em torno de 25°C e 42% de umidade, respectivamente.

Para cada grupo, foram feitas 5 medições de hidratação e utilizou-se a média de cada avaliação para apresentar e discutir os resultados. A Análise de Variância ANOVA foi utilizada para avaliar estatisticamente o teor final de hidratação na estrutura capilar com peptídeos hidrolisados de queratina de pena de frango, em relação à formulação sem o hidrolisado, ou seja, grupo controle.

Após os tratamentos de hidratação entre os diferentes tipos de mechas observaram-se os graus de hidratação a seguir: (tabela 1)

Tabela 1: Teor de hidratação obtido por cada tipo de cabelo.

Grupo de Mechas	Tipos de tratamento				
	A	B	C	D	E
1 – Virgem	7,363	8,236	8,108	7,454	7,836
2- Tingido	7,181	8,145	8,126	7,017	7,654
3 – Tingido com luzes	7,09	7,781	7,526	7,017	7,29
4 – Tingido com alisamento	6,454	7,761	6,563	7,09	6,399
5 – Totalmente descolorado	7,181	7,672	7,563	7,036	7,326

A – mecha ponto zero (lavada somente com lauril sulfato de sódio) e seca sem calor (naturalmente); B – mecha lavada com xampu e condicionador de peptídeos hidrolisados de proteínas 10% e seca com calor e chapinha; C - mecha lavada com xampu e condicionador de peptídeos hidrolisados de proteínas 10%, e seca sem calor (naturalmente); D – mecha controle (lavada com xampu e condicionador controle) seca com calor e chapinha; E - mecha controle (lavada com xampu e condicionador controle) seca sem calor (naturalmente). Esses resultados das médias foram obtidos no final das cinco semanas.

As figuras 10 e 11 representam à média dos resultados da avaliação de hidratação do grupo de mechas secas sem calor (figura 8) e com calor e placa térmica (figura 9). Para ambas as situações foram feitas comparações entre o teor de hidratação das mechas controle, ponto zero e com peptídeo hidrolisado de proteína 10%.

Observou-se que o grupo de mechas tratadas com preparação controle não apresentou hidratação significativa como às tratadas com peptídeo hidrolisado de proteínas de pena de frango a 10%. A média de hidratação obtida pelo grupo de mechas tratadas com a formulação controle durante as duas avaliações (secando com calor e sem calor) foi inferior à do grupo tratado com o peptídeo hidrolisado a 10%. Inclusive as mechas que foram submetidas

ao calor obtiveram menor grau de hidratação do que as que secaram naturalmente em temperatura ambiente. Esse dado confirma que a base utilizada na formulação não interferiu na hidratação. Desta forma, torna-se claro a importância dos componentes peptídicos (queratina hidrolisada) na estrutura capilar, proporcionando um grau maior de hidratação. Isso se dá devido à função que esses componentes têm em proteger, enriquecer ou reparar as fibras do cabelo tornando-as mais hidratadas, pois os fragmentos de aminoácidos e de polipeptídeos das proteínas hidrolisadas que são compostos de um agrupamento de aminoácido e apresenta peso molecular baixo, parecem se ligar a queratina do cabelo, restaurando a estrutura protéica danificada (PAOLA, M.V.R.V. Cabelos Étnicos. COSMETICS & TOILETRIES, São Paulo, Brasil, v. 11, p. 36-44, Mai/jun 1999.).

Para a análise estatística dos resultados, foi empregado o método de análise de variância ANOVA, a partir do qual foi possível observar que as comparações entre mechas do ponto zero com as mechas controle com calor e placa térmica e sem calor, secas naturalmente (temperatura ambiente) não apresentaram resultados significativos ao nível de 5%, também não apresentou resultado significativo, as mechas com o hidrolisado de peptídeos sem calor, secas naturalmente. Porém as mechas que utilizaram o peptídeo hidrolisado de proteína 10% tiveram um teor de hidratação significativo ao nível de 5%. Isto confirma de forma mais consistente os resultados obtidos anteriormente através do método das médias.

Através dos resultados foi observado que o cabelo virgem por estar com sua cutícula intacta obteve um grau maior de hidratação, uma vez que permite que o produto permaneça em sua estrutura. Já em relação aos cabelos tratados quimicamente foi observado que o teor de absorção é maior quanto menor for o grau de agressão em sua estrutura capilar (EXPÓSITO, F. Tricologia. Espanha, Madri, ed. Eldesa, 50-58p, 1995).

Descolorir ou tratar os cabelos com produtos para permanente faz diminuir a quantidade de cistina da fibra capilar. Descolorações drásticas levam também a perda de tirosina e metionina (SCANAVEZ, C. 2001. Alteração na ultraestrutura do cabelo induzidas por cuidados diários e seus efeitos nas propriedades da cor. Tese de Doutorado sob orientação da profa. Inês Joekes.

Instituto de Química - UNICAMP.). O uso de produtos com hidrolisados de queratina pode minimizar essa perda e melhorar as características do cabelo.

O método de medição utilizado tem como função verificar o grau de hidratação da superfície cutânea e como a avaliação foi feita para verificar o grau de hidratação da haste capilar, pode ter ocorrido alguma interferência nos resultados, uma vez que, a estrutura capilar apresenta algumas diferenças em relação à pele como, por exemplo, um menor grau hídrico (PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. *Biologia da Pele. Estética-Cosmética; Cosmetologia; Biologia Geral*, São Paulo: Organização Andrei Ltda, 373-379p, 1998.

5

10 BOTELHO, A, J. Avaliação da hidratação capilar em cabelos alisados utilizando preparação cosmética com extrato de algas marinhas. 2006. 61 f. Trabalho monográfico (Graduação em Farmácia)- Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2006). Para confirmação dos resultados obtidos, seria necessária posteriormente, a realização da análise da estrutura capilar através da

15

microscopia eletrônica.

Exemplo 7. Análise sensorial

Foi feito também um teste para avaliação sensorial das mechas para verificar o grau de brilho e emoliência.

As avaliadoras (total de 20 pessoas) analisaram as mechas (ponto zero) com as de controle e as testes, para verificar qual delas tinha maior brilho e emoliência. A avaliação foi cega, pois as avaliadoras não sabiam qual formulação estava sendo usada. Antes de ser feito o teste as avaliadoras passaram por um processo de higienização das mãos, para retirada de qualquer produto engordurante que pudesse interferir na análise, sendo

20

25 respondido qual grupo apresentava maior ou menor grau de brilho e emoliência.

Diante da avaliação sensorial realizada para verificar qual das mechas (com hidrolisado a 10% e controle) apresentava maior brilho e emoliência, foram obtidos resultados distintos de acordo com o tipo de secagem realizada.

30

Para o grupo de mechas secas sem calor (a temperatura ambiente) foi observado que o maior percentual de preferência das avaliadoras (65%) foi pelas mechas que haviam sido tratadas com os peptídeos hidrolisados de proteína a 10% e um menor (35%) não foi capaz de optar por qual dos grupos

apresentava maior brilho e emoliência (Figura 10). Em contrapartida, para o grupo de mechas secas com calor e placa térmica foi observado que o maior percentual de preferência das avaliadoras (90%) foi pelas mechas que haviam sido tratadas com o hidrolisado de peptídeo a 10% e um menor (10%) não foi capaz de optar por qual dos grupos apresentava maior brilho e emoliência (Figura 11). Estes resultados foram fundamentais para avaliar o quanto o uso do peptídeo hidrolisado de proteína interferiu na estrutura capilar tornando-a mais sedosa e brilhosa.

As figuras 14, 15 e 16 mostram dois grupos de cabelo (quimicamente tratado) controle e tratado com calor.

Na visão do consumidor o brilho está diretamente relacionado com um cabelo saudável, pois quanto maior for o brilho mais saudável será o cabelo (SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI. P. Avaliação do Brilho do Cabelo. Cosmetics & Toiletries, Melrose Park IL, Estados Unidos, v.14, p. 52 – 56, set/out. 2002).

Ao utilizar produtos cosméticos hidratantes nos cabelos, os mesmos são responsáveis por aumentar a quantidade de água no fio ou formar uma barreira que dificulte a perda de água, pois o teor de umidade dos cabelos influencia nas propriedades físicas como: carga estática, rigidez, brilho e volume (POZEBON, D. Análise do cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elemento traços e aplicações. Química Nova, Florianópolis, v. 22, n. 6, p. 830-840, 1999. BOTELHO, A, J. Avaliação da hidratação capilar em cabelos alisados utilizando preparação cosmética com extrato de algas marinhas. 2006. 61 f. Trabalho monográfico (Graduação em Farmácia)- Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2006).

REINVIDICAÇÕES

1. Processo de hidrólise de queratina **caracterizada** por compreender as etapas de:

a) misturar:

a.1) de 10^6 a 5×10^7 células/mL de pelo menos uma bactéria da espécie *B.subtilis* cepa AMR;

a.2) de 0,1% a 5% p/p de um material contendo fibras de queratina;

a.3) de 0,005% a 10% p/p de meio de cultivo;

onde o pH do meio está compreendido na faixa que vai de 7,5 a 8,5;

b) manter a mistura em a) em uma temperatura que varia de 20°C a 35°C e sob agitação;

c) separar o sobrenadante obtido em b);

d) separar os peptídeos hidrolisados do sobrenadante da etapa c);

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela concentração da bactéria do item a.1) ser 10^7 células/mL.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo material contendo fibras de queratina ser escolhido do grupo que compreende cabelo, penas, cascos, unhas, chifres e mistura dos mesmos.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelas penas serem escolhidas do grupo que compreende penas de frango, galinha, patos, gansos e mistura dos mesmos.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo material contendo fibras de queratina estar na concentração de 1% p/p.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo meio de cultivo compreender extrato de levedura, peptona, KCl, sacarose ou mistura dos mesmos.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo meio de cultura estar na concentração de 5%.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo pH ser 8,0.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela temperatura ser 28°C.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela agitação ser 300 rpm.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela separação mencionada em c) ser realizada por meio de centrifugação.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela separação mencionada em d) ser realizada por meio de ultrafiltração.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender uma etapa adicional de preparação do material contendo fibras de queratina antes do mesmo ser utilizado na etapa a).

14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pela etapa adicional compreender um ou mais passos escolhidos do grupo que compreende:

- a) lavagem;
- b) secagem;
- c) delipidação; e
- d) misturas de a), b) e/ou c).

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pela etapa de lavagem ser realizada com um

detergente adequado.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pela etapa de delipidação compreender o uso de uma mistura clorofórmio:metanol numa razão que vai de 0,5:1 a 3:1.

17. Hidrolisado de queratina, com peso molecular de 500Da a 1000Da, **caracterizado** por ser obtido pelo processo descrito nas reivindicações 1 a 16.

Voyager Spec #1=>AdvBC(32,0.5,0.1)->NR(2.00)->BC->NR(2.00)[BP = 1080.9, 190]

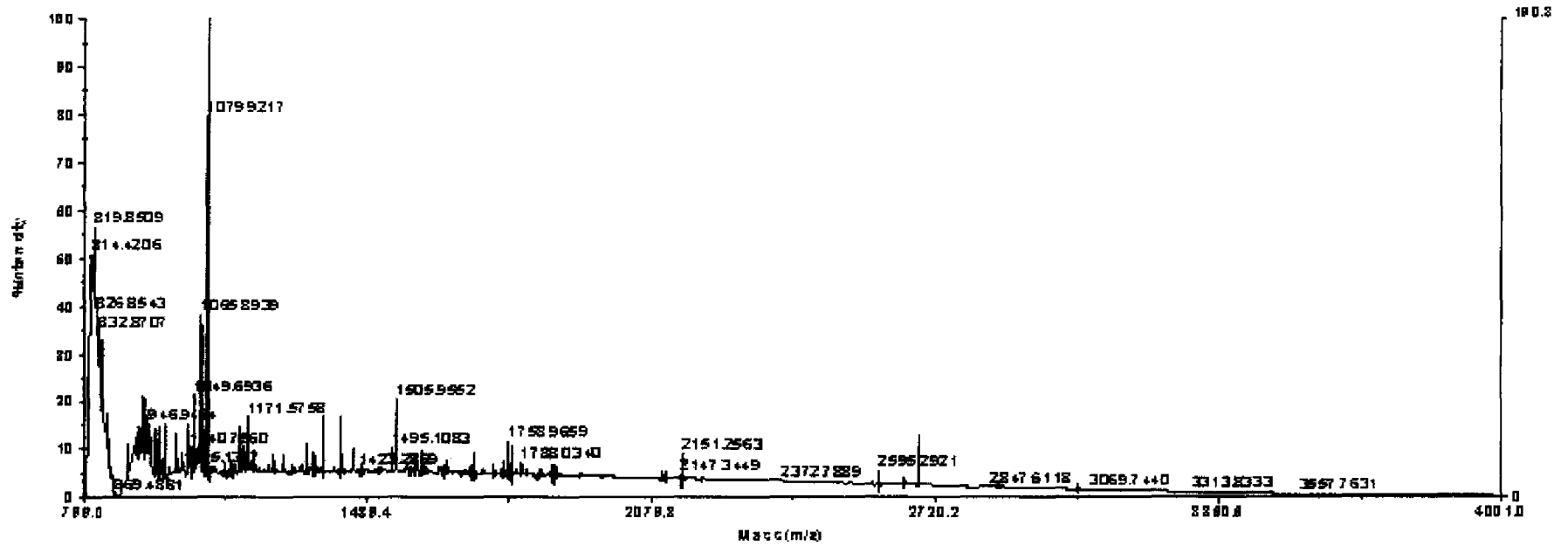


FIGURA 1

Voyager Spec #1 => AdvBC(32,0.5,0.1)F> NR(2.00)F> BC=> NR(2.00)F> BC=> NR(2.00)F> BC(BP = 303.7, 1186)

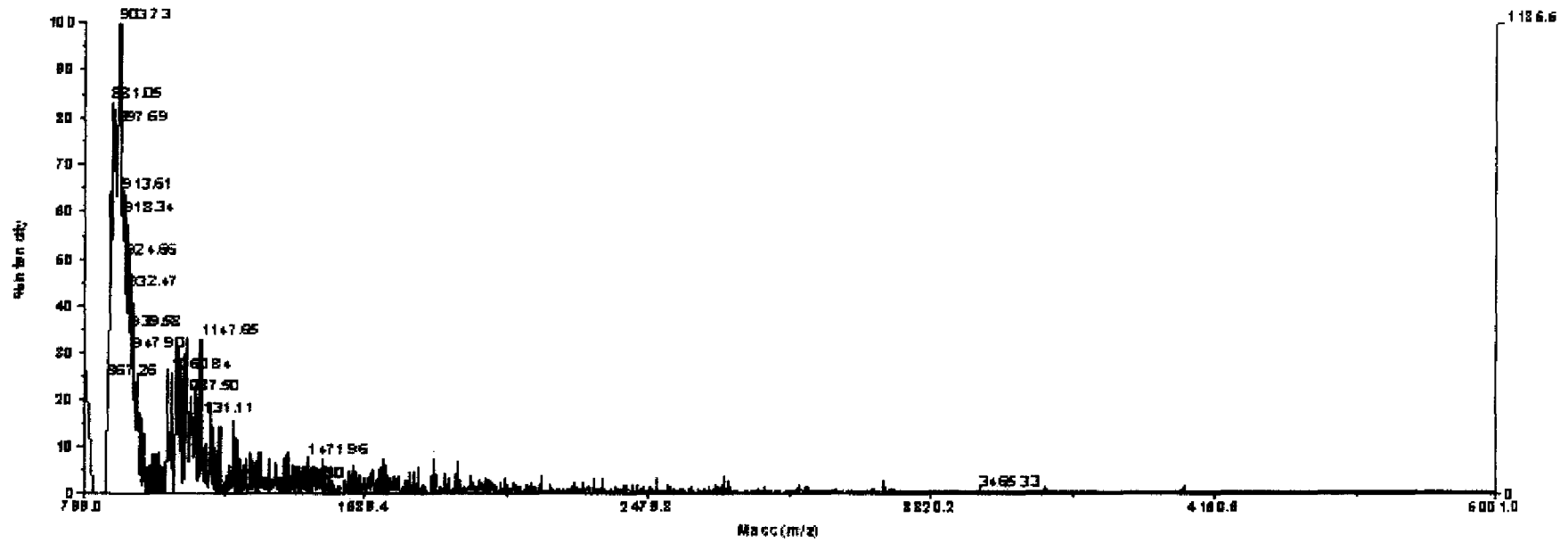


FIGURA 2

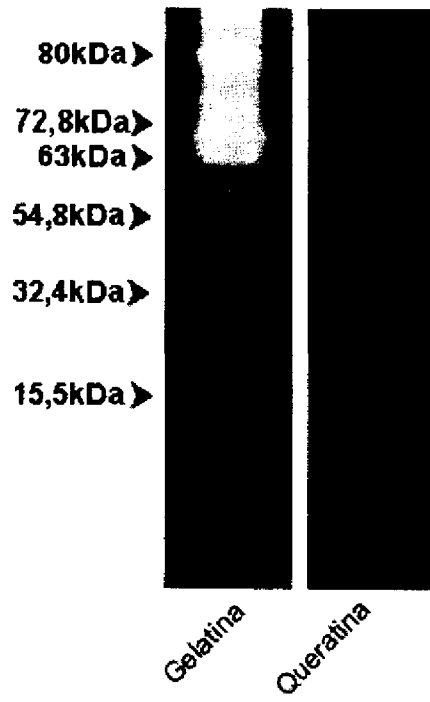


FIGURA 3

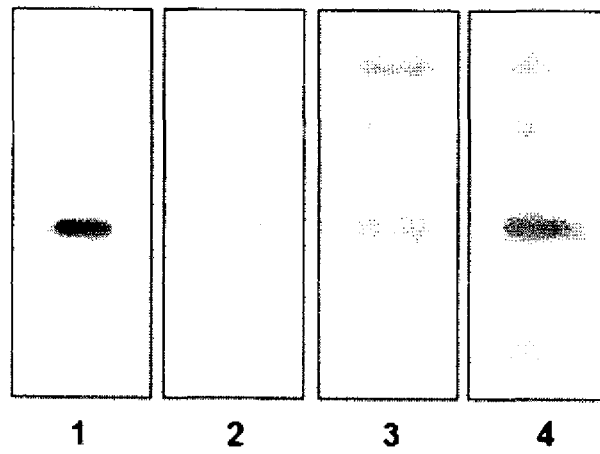


FIGURA 4

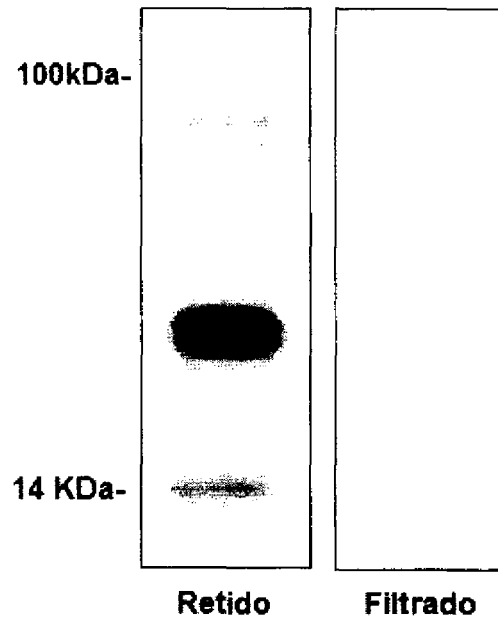


FIGURA 5

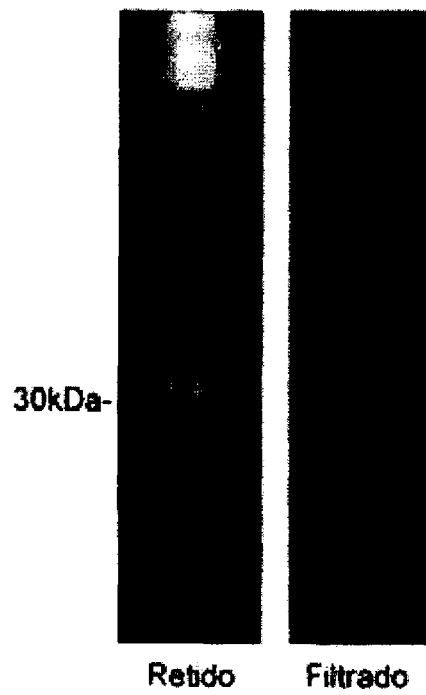


FIGURA 6

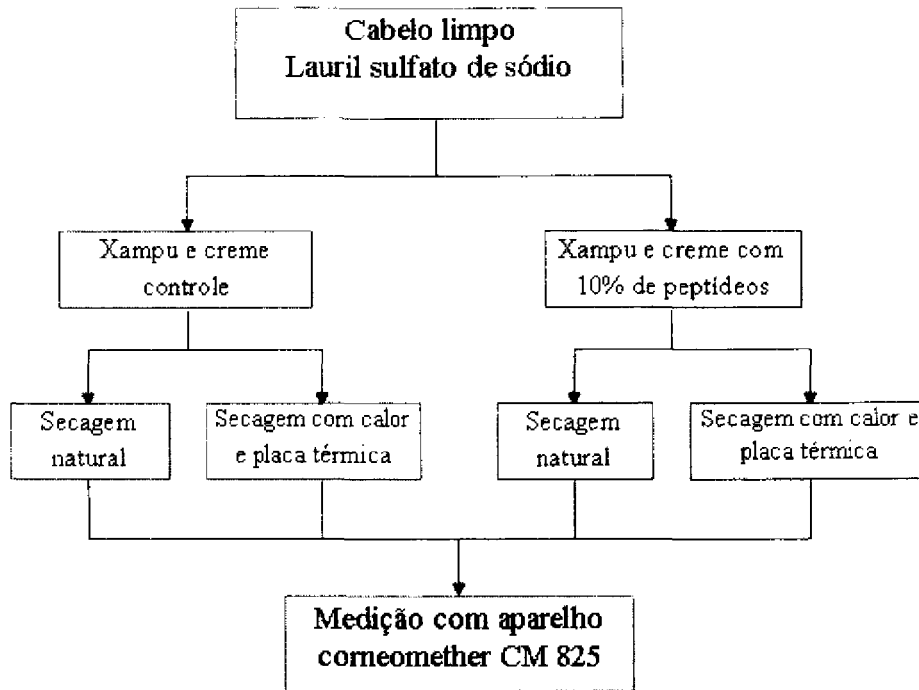


FIGURA 7

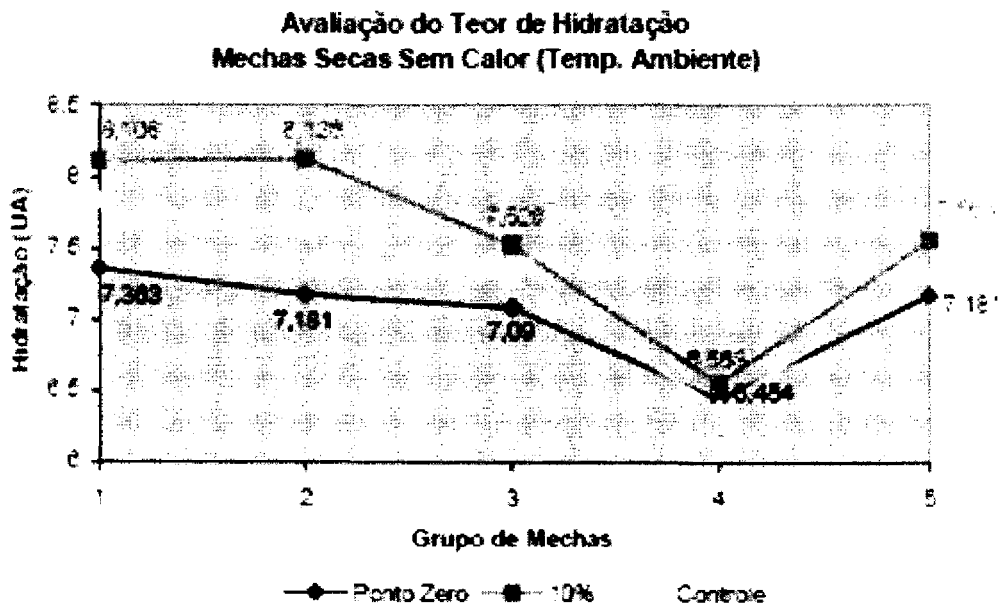


FIGURA 8

**Avaliação do Teor de Hidratação
Mechas Secas Com Calor e Chapinha**

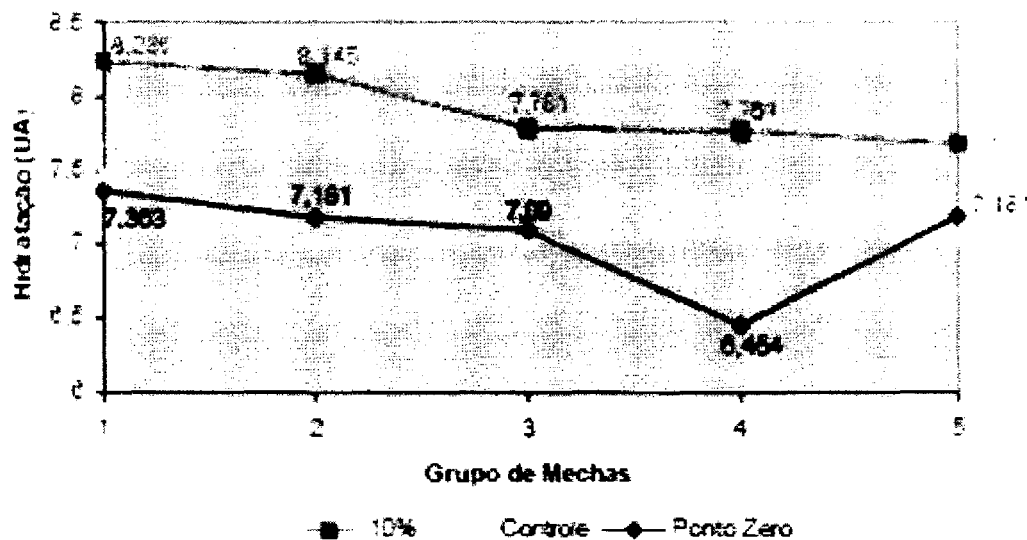


FIGURA 9

**Avaliação Sensorial
Aspectos: brilho e maciez**

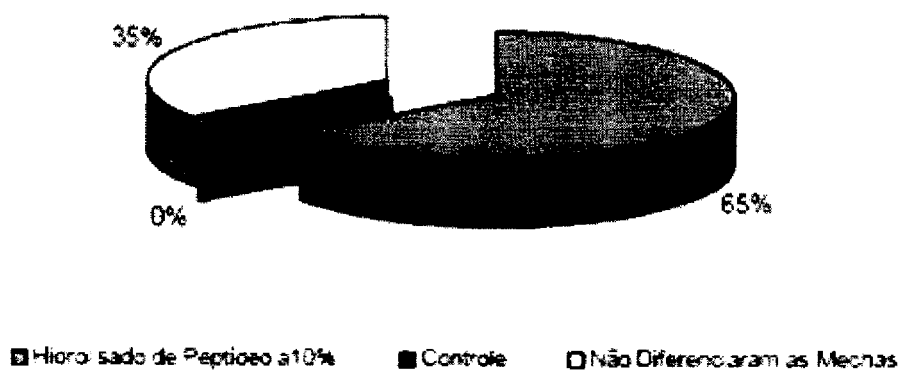


FIGURA 10

Avaliação Sensorial
Aspectos: brilho e maciez

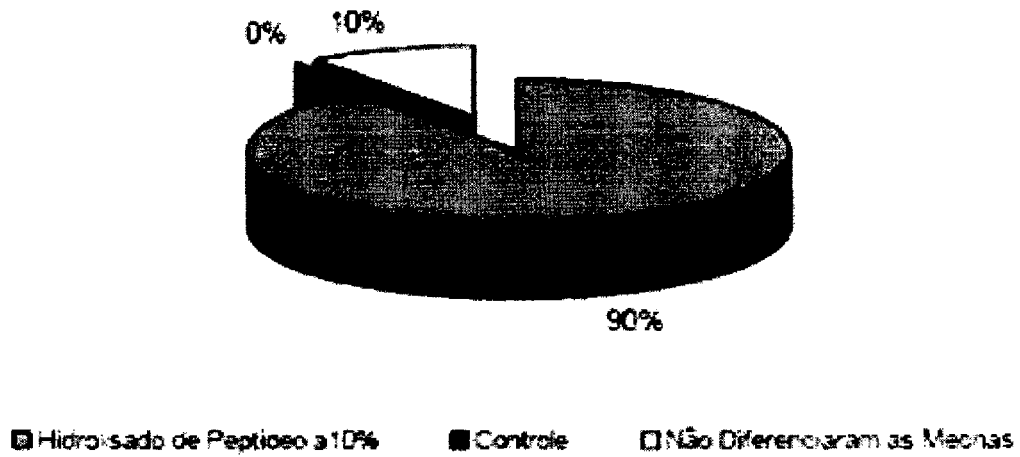


FIGURA 11

Resumo**HIDROLISADOS DE QUERATINA, PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO E
COMPOSIÇÕES COSMÉTICAS CONTENDO OS MESMOS**

5

A presente invenção relata um processo para a hidrólise de queratina através de processos microbiológicos e/ou enzimáticos. Em especial a queratina é oriunda de penas de animais, como por exemplo o frango e são submetidas a hidrólise por uma cepa de *Bacillus sp.*

10

Os hidrolisados apresentam peso molecular menor que 500 Da, o que os torna ideais para aplicações cosméticas, em especial para aplicações em composições para tratamentos re-constitutivos da fibra capilar.