

CAROLINA BOTELHO LOURENÇO

**“ESTUDO DA ESTABILIDADE DA BROMELINA COMERCIAL
EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA BOTELHO LOURENÇO

**“ESTUDO DA ESTABILIDADE DA BROMELINA COMERCIAL
EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carolina Botelho Lourenço
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestra em Biociências e Tecnologia de
Produtos Bioativos, na área de
Fármacos, Medicamentos e Insumos
para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L934e Lourenço, Carolina Botelho, 1983-
Estudo da estabilidade da bromelina comercial em
formulações cosméticas / Carolina Botelho Lourenço. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Priscila Gava Mazzola.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Bromelina. 2. Estabilidade. 3. Cosméticos. I.
Mazzola, Priscila Gava, 1979-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of Commercial Bromelain Stability in Cosmetic Formulations

Palavras-chave em Inglês:

Bromelain

Stability

Cosmetics

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Priscila Gava Mazzola [Orientador]

Elias Basile Tambourgi

Edgar Silveira Campos

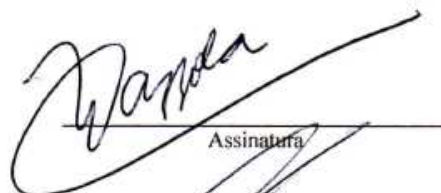
Data da defesa: 07-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 07 de Fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi



Assinatura

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos



Assinatura

Dra. Angela Faustino Jozala

Assinatura

Dra. Marili Villa Nova Rodrigues

Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Eliana e Carlos, pelos bons conselhos, encaminhamento e muito trabalho em benefício dos nossos estudos. Aos meus irmãos Carlos Eduardo, pelas orientações e exemplo, e Fernando, pelos bons momentos e amizade sempre. Ainda, este trabalho é dedicado ao meu marido, Mario, meu companheiro e amor de toda a vida, por tudo que ele representa para mim, e para a nossa pequena Alice, que nascerá deste amor daqui a poucos meses.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, sem os quais eu não teria tido oportunidade de estudar e me graduar. Agradeço por todo o esforço que fizeram para que nos tornássemos pessoas de bem e capazes de sermos independentes em nossas vidas.

Aos meus irmãos, que me deram as melhores lembranças que tenho da minha infância, foram meus companheiros de jornada e arrancaram de mim as melhores risadas. Em especial, ao meu irmão Carlos Eduardo, que incutiu em mim a motivação para os estudos e, sobretudo, para o mestrado.

Ao meu marido, Mario, que me aguentou e aguenta nos momentos de insanidade e que, por muitas vezes, passou os fins de semana sozinho para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos, com os quais troquei muitas ideias e que me emprestaram os ouvidos e seus pensamentos nos momentos de dúvidas e incertezas.

À Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda., empresa que acreditou na minha capacidade de realização e me concedeu a valiosa oportunidade de estudar, sendo tolerante com minhas necessidades neste período de construção de conhecimento e cedendo seu espaço para muitos de meus testes. Sem esta ajuda, este trabalho certamente não teria sido finalizado.

E finalmente, à Prof^a. Dr^a. Priscila Gava Mazzola, que, sem me conhecer, aceitou me orientar neste projeto e acreditou na minha proposta de trabalho. Agradeço pelas conversas, conselhos, risadas e orientações, tanto para este estudo, quanto para a vida, nos muitos momentos em que encontrei nela uma amiga.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. JUSTIFICATIVA	11
2. INTRODUÇÃO	11
2.1. BIOQUÍMICA	11
2.1.1. ATIVIDADES TERAPÊUTICAS	12
2.1.2. ATIVIDADES TERAPÊUTICAS DE INTERESSE COSMÉTICO	12
2.1.2.1. AÇÃO ANTICELULITE	12
2.1.2.2. AÇÃO DERMOCALMANTE	13
2.1.2.3. PEELING BIOLÓGICO	13
2.1.3. TOXICIDADE	13
2.1.4. OBTENÇÃO DA ENZIMA	14
2.1.5. ESTABILIDADE DA BROMELINA	14
2.2. COSMÉTICOS E O ESTUDO DE ESTABILIDADE	15
2.2.1. AVALIAÇÃO DA COR	16
2.2.2. AVALIAÇÃO DO VALOR DE pH	17
2.2.3. AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE E REOLOGIA	17
2.2.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DO CONTEÚDO PROTEICO	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. ESTUDO DE ESTABILIDADE	21
4.2. FORMULAÇÕES	22
4.2.1. DEFINIÇÃO DA FÓRMULA DA EMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA	23
4.2.1.1. PROCEDIMENTO DE PREPARO DA EMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA	23
4.2.2. DEFINIÇÃO DA FÓRMULA DO GEL DE CARBOPOL® 980	25
4.2.2.1. PROCEDIMENTO DE PREPARO DO GEL DE CARBOPOL® 980	25
4.2.3. DEFINIÇÃO DA FÓRMULA DA DISPERSÃO AQUOSA	26
4.2.3.1. PROCEDIMENTO DE PREPARO DA DISPERSÃO AQUOSA	26
4.3. ANÁLISES	26

4.3.1.	ANÁLISES DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ENZIMA	27
4.3.1.1.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	27
4.3.1.1.1.	VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	27
4.3.1.2.	ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS	28
4.3.1.2.1.	VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE BRADFORD	29
4.3.1.3.	ATIVIDADE ESPECÍFICA	29
4.3.2.	ANÁLISES DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES	29
4.3.2.1.	CENTRIFUGAÇÃO	29
4.3.2.2.	ANÁLISE DE COR OBJETIVA	30
4.3.2.3.	ANÁLISE DE VALOR DE pH	30
4.3.2.4.	ANÁLISES DE VISCOSIDADE E REOLOGIA	30
5.	RESULTADOS	31
5.1.	VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	31
5.2.	VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE BRADFORD	32
5.3.	RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS	34
5.3.1.	ANÁLISES DE CENTRIFUGAÇÃO	34
5.3.2.	COR OBJETIVA	35
5.3.3.	VALOR DE pH A 25°C	39
5.3.4.	VISCOSIDADE A 25°C	42
5.3.5.	REOLOGIA A 25°C	44
5.3.6.	ATIVIDADE ESPECÍFICA	46
6.	DISCUSSÃO	49
7.	CONCLUSÕES	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	ANEXO I	60

LISTA DE TABELAS

1. Componentes utilizados no preparo das formulações emulsão óleo em água, gel de Carbopol®980 e dispersão aquosa.	22
2. Fórmula para Emulsão óleo em água, com as concentrações dos Componentes e ordem de adição de cada um.	23
3. Fórmula para o gel de Carbopol®980, com as concentrações dos componentes e ordem de adição de cada um.	25
4. Fórmula da dispersão aquosa, com as concentrações dos Componentes e ordem de adição de cada um.	26
5. Esquema da curva analítica para doseamento do conteúdo proteico	28
6. Verificação da validade do método da atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato para as emulsões.	31
7. Verificação da validade do método da atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato para os géis.	31
8. Verificação da validade do método da atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato para as dispersões	32
9. Verificação da validade do método de Bradford para as emulsões.	32
10. Verificação da validade do método de Bradford para os géis.	33
11. Verificação da validade do método de Bradford para as dispersões.	33
12. Variação da viscosidade para emulsões, no início do estudo e após 180 dias de incubação.	42
13. Variação da viscosidade para os géis, no início do estudo e após 180 dias de incubação.	43
14. Valor de recuperação de viscosidade após cisalhamento para emulsões.	44
15. Valor de recuperação de viscosidade após cisalhamento para os géis.	45
16. Resultados Teste <i>t</i> de Student, 95% IC, para resultados de análise de cor das amostras após 180 dias de incubação.	60
17. Resultados Teste <i>t</i> de Student, 95% IC, para resultados de análise de pH das amostras após 180 dias de incubação.	61
18. Resultados Teste <i>t</i> de Student, 95% IC, para resultados de análise de viscosidade das amostras após 180 dias de incubação.	62
19. Resultados Teste <i>t</i> de Student, 95% IC, para resultados de análise de reologia das amostras após 180 dias de incubação.	63
20. Resultados Teste <i>t</i> de Student, 95% IC, para resultados de análise de atividade específica das amostras após 180 dias de incubação.	64

LISTA DE FIGURAS

1. Espaço de cor L*a*b*	16
2. Princípio de Operação do Viscosímetro.	18
3. Hélice dentada cortante de dispersão utilizada no preparo das formulações deste estudo.	24
4. Variação total da cor para emulsões, em função do tempo de armazenamento.	35
5. Variação total da cor para os géis, em função do tempo de armazenamento.	37
6. Variação total da cor para as dispersões, em função do tempo de armazenamento.	38
7. Variação do valor de pH para emulsões, em função do tempo de armazenamento.	39
8. Variação do valor de pH para os géis, em função do tempo de armazenamento.	40
9. Variação do valor de pH para as dispersões, em função do tempo de armazenamento.	41
Variação da atividade específica para as emulsões, no início do estudo e após 180 dias de incubação.	41
Variação da atividade específica da bromelina para os géis, no início do estudo e após 180 dias de incubação	47
Variação da atividade específica da bromelina para a dispersão 0,5%, em função do tempo de armazenamento.	51

RESUMO

Bromelina é o nome dado a um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas em vários tecidos, como talo, fruto e folhas do abacaxi (*Ananas comosus*), e de demais espécies da família *Bromeliaceae*. O uso da bromelina nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas está baseado em sua atividade proteolítica. Na indústria cosmética, tem sido muito utilizada, principalmente nos tratamentos de pele, com os apelos de agente de limpeza, renovação celular, *anti-aging*, *peeling* biológico, clareamento e anticelulite. O presente trabalho estudou a estabilidade da bromelina comercial em formulações cosméticas, por meio da avaliação do conteúdo proteico, medida da atividade enzimática, das alterações de viscosidade e reologia, valor de pH e cor das formulações selecionadas. A bromelina comercial foi incorporada em três concentrações, 0,5%, 1,0% e 2,0%, em fórmulas base de emulsão óleo em água, gel de Carbopol® 980 e dispersão aquosa e mantidas armazenadas por seis meses. Amostras de cada formulação foram submetidas a diferentes temperaturas e intensidades de iluminação. Avaliações do conteúdo proteico foram realizadas através do método de Bradford e a atividade enzimática foi verificada utilizando azocaseína como substrato. Após 180 dias de incubação, os resultados mostraram que a cor de todas as amostras sofreu alteração, que foi dependente da temperatura e da concentração de bromelina presente. As emulsões e as dispersões sofreram menor alteração de cor do que os géis. Não foram observadas relações entre as variações de pH e a temperatura e luminosidade para todas as amostras. Para as emulsões com teor de bromelina de 2,0%, maiores alterações na viscosidade foram verificadas ao término dos seis meses de estudo. Para os géis, a viscosidade apresentou comportamento mais constante, não sendo fortemente influenciada pelas condições de temperaturas e luminosidade. A presença da bromelina nas emulsões contribuiu para o aumento da recuperação da viscosidade após submissão a forças de cisalhamento. A atividade específica das amostras foi reduzida ao longo dos seis meses para todas as amostras em estudo. As emulsões e as dispersões apresentaram atividade específica superior ao término de seis meses em relação aos géis, para os quais a atividade final a 45°C chegou quase a zero. O gel demonstrou ser a pior base para veiculação da bromelina com finalidade cosmética, pois apresentou a menor manutenção das características iniciais tanto relacionadas à formulação quanto em relação à integridade da bromelina. As dispersões aquosas e as emulsões apresentaram-se mais estáveis ao longo de 180 dias de avaliações, nas condições de 5°C, ao abrigo da luz.

Palavras-chave: bromelina, estabilidade, cosméticos, atividade proteolítica.

ABSTRACT

Bromelain is the name given to a set of proteolytic enzymes found in various tissues, such as stems, leaves and fruit of the pineapple (*Ananas comosus*), and other species of Bromeliaceae. The use of bromelain in food, pharmaceutical and cosmetic industries is based on its proteolytic activity. In the cosmetic industry, it has been widely used, especially in skin treatments, with calls for cleaner, cell renewal, anti-aging, biological peeling, whitening and anti-cellulite. This work studied the stability of commercial bromelain in cosmetic formulations through the evaluation of protein content, measure of the enzyme activity, changes in viscosity and rheology, pH and color of the selected formulations. The commercial bromelain was incorporated at three concentrations, 0,5%, 1,0% and 2,0% in oil in water emulsion, Carbopol[®] 980 gel and aqueous dispersion and kept stored for six months to different temperatures and light intensities. Evaluations of protein content were performed by the method of Bradford and enzymatic activity was verified using azocasein as substrate. After 180 days of incubation, the results showed that the color of all samples was altered, which was temperature and concentration of bromelain dependent. Emulsions and dispersions underwent less change in color than the gels. No relationships were observed between the changes in pH and temperature and luminosity exposure for all samples. The biggest changes in viscosity were observed for emulsions with 2,0% of bromelain at the end of six months. For gels, the viscosity showed a more constant behavior and was not strongly influenced by light and temperature conditions. The presence of bromelain in the emulsions contributed to increase recovery of viscosity after subjection to shear forces. The specific activity of the samples was reduced over the six months for all samples analyzed. The emulsions and dispersions showed higher specific activity at the end of six months than the gels, for which the final activity in 45°C reached almost zero. The gel proved to be the worst basis for placement of bromelain with cosmetic purpose, as it presented the lowest maintenance of both baseline characteristics related to the formulation and to the integrity of bromelain. Aqueous dispersions and emulsions were more stable over 180 days of evaluations, under 5°C temperature, protected from light.

Keywords: bromelain, stability, cosmetics, proteolytic activity.

1. JUSTIFICATIVA

O uso de enzimas tem despertado cada vez mais interesse dos mercados alimentício, farmacêutico e cosmético. No caso do mercado cosmético, especificamente, a aplicação de enzimas em produtos pode trazer benefícios de limpeza, renovação celular, ação *anti-aging*, ação de *peeling* biológico, clareamento, ação anticelulite, entre outros.

Por sua ação, podem agregar valor aos produtos sem impactar em altos custos para a sua produção. No caso da bromelina, cuja oferta no Brasil é abundante por conta da larga produção do abacaxi, a aplicação em cosméticos alia a geração de produtos com maior valor agregado e o aproveitamento de resíduos da indústria alimentícia, uma de suas fontes de obtenção.

A comercialização de cosméticos, por sua vez, só é possível mediante estudo de sua estabilidade, na busca pela garantia da qualidade, segurança e eficácia dos produtos.

Por esta razão, se faz importante o estudo do comportamento de enzimas em formulações cosméticas, sob condições pré-determinadas, a fim de avaliar a manutenção de suas características físico-químicas e atividade biológica, e, por consequência, atender aos requisitos de comercialização.

2. INTRODUÇÃO

2.1. BIOQUÍMICA

Bromelina é um nome coletivo dado para enzimas proteolíticas ou proteases encontradas em tecidos, incluindo talo, fruto e folhas, do abacaxi (*Ananas comosus*) e de diversas espécies da família *Bromeliaceae* (HENNRICH *et al.*, 1969; TAUSSIG *et al.*, 1988; DOKO *et al.* 1991; MAURER, 2001). É usada nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica por causa de sua atividade proteolítica.

Constitui uma mistura incomum e complexa de diferentes tiol-endopeptidases e outros componentes não completamente caracterizados como fosfatases, glicosidases, peroxidases, celulasas, glicoproteínas, ribonucleases, carboidratos, entre outros (HENNRICH *et al.*, 1969; TAUSSIG *et al.*, 1988).

Compreende principalmente espécies enzimáticas glicosiladas com diferentes atividades proteolíticas e massas molares entre 20 e 31 kDa e pontos isoelétricos entre 4,6 e 10. A atividade enzimática compreende largo espectro, com valor de pH ótimo entre 5,5 e 8,0. A bromelina cliva preferencialmente ligações peptídicas glicil, alanil e leucil (MAURER, 2001). É inativada quando submetida a temperaturas comumente utilizadas em pasteurização, e sua desnaturação térmica é irreversível (BALLS *et al.*, 1941, RABELO *et al.* 2004).

A bromelina procedente do talo do abacaxi apresenta ponto isoelétrico igual a 4,6, além de ser a mais abundante protease entre as preparações derivadas do abacaxi. Já a bromelina do fruto do abacaxi apresenta ponto isoelétrico igual a 9,5, e está presente em menor quantidade.

2.1.1. ATIVIDADES TERAPÊUTICAS

As informações disponíveis sobre a eficácia terapêutica da bromelina advêm de uma variedade de experimentos animais e observações clínicas. De forma geral, pode-se atribuir à bromelina os seguintes efeitos terapêuticos (MAURER, 2001):

- Prevenção da formação de edemas e redução dos edemas já existentes;
- Redução do nível sanguíneo de fibrinogênio;
- Auxílio na quebra de fibrina;
- Prevenção da agregação plaquetária;
- Prevenção da adesão plaquetária em células endoteliais de vasos sanguíneos;
- Redução dos níveis de prostaglandinas E_2 e tromboxanos A_2 durante a inflamação aguda;
- Indução da secreção de interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF)- α a partir de monócitos e granulócitos;
- Auxílio para a digestão de proteínas;
- Prevenção de metástase em modelos animais como camundongos;
- Auxílio da remoção de tecido desvitalizado na pele queimada.

Muito de sua atividade pode ser resultante de sua capacidade de alterar e modular a superfície de células distintas pela clivagem de peptídeos (MAURER, 2001).

2.1.2. ATIVIDADES TERAPÊUTICAS DE INTERESSE COSMÉTICO

2.1.2.1. AÇÃO ANTICELULITE

A lipodistrofia ginóide, ou comumente chamada de celulite, é uma condição cutânea muito comum em mulheres na idade pós-adolescência, com incidência aproximada de 85% das mulheres nessa faixa etária. A pele afetada é caracterizada por uma aparência “ondulada”, ou de “casca de laranja”. Tendo uma prevalência tão alta,

alguns autores consideram a celulite um aspecto normal da pele das mulheres maduras, enquanto outros a consideram uma patologia.

Atualmente, não existe um consenso sobre a origem e os aspectos básicos da sua classificação histopatológica. Há algumas teorias sobre a etiopatogênese da celulite. De acordo com uma delas, a celulite é um edema do tecido conjuntivo que acumula uma quantidade significativa da água, sendo causada, primeiramente, pelo acúmulo de proteoglicanos na matriz extracelular. Maior hidrofília do tecido leva ao edema crônico que pode resultar em fibrose. Outra teoria considera as alterações micro circulatórias que envolvem a compressão dos sistemas venoso e linfático como a principal causa de celulite (TERRANOVA *et al*, 2006). Essas alterações estão correlacionadas com adiposidade, pois a análise histológica da fase inicial da celulite tem demonstrado adipócitos de formas e tamanhos diferentes correlacionados a edemas e dilatação dos vasos linfáticos. Em áreas afetadas pela celulite, o fluxo sanguíneo é reduzido em 35% (ROSSI E VERGNANINI, 2000).

Devido ao efeito contra edema e à atividade proteolítica, que pode atuar na clivagem de proteoglicanos, a bromelina pode ser eficaz no tratamento e prevenção da celulite.

2.1.2.2. AÇÃO DERMOCALMANTE

Através da prevenção de edemas, cosméticos com incorporação de bromelina podem apresentar eficácia calmante em regiões de pele que passaram por injúrias como nos casos pós-depilatórios, pós-barba e demais tratamentos agressores do tecido cutâneo.

2.1.2.3. PEELING BIOLÓGICO

Peeling biológico é o processo de retirada das camadas mais superficiais da pele através da ação de enzimas proteolíticas, por meio da hidrólise da queratina, com a finalidade de diminuir a espessura da camada córnea e reduzir a intensidade de manchas na pele pela promoção da renovação celular. Neste contexto, a bromelina já vem sendo empregada em tratamentos estéticos, juntamente com a papaína.

2.1.3. TOXICIDADE

Doses de 500 mg/kg por dia via oral, não provocam alteração na ingestão de alimentos, crescimento e histologia do coração, rim e baço, ou parâmetros hematológicos em ratos. Bromelina é considerada não tóxica e sem efeitos colaterais, portanto pode ser usada em doses diárias de 200 a 2000 mg por longos períodos de tempo (MAURER, 2001).

2.1.4. OBTENÇÃO DA ENZIMA

Para a obtenção da bromelina deve-se, preferencialmente, usar os resíduos industriais, visto que os produtos principais do abacaxi são valiosos, e que ao contrario da papaína, a bromelina não desaparece quando o fruto amadurece (BALLS *et al.*, 1941).

Diferentemente da bromelina do talo, que é largamente usada na indústria, a bromelina do fruto não se encontra disponível comercialmente, apesar das grandes quantidades de fruta descartadas nas fabricas de conservas de abacaxi (DEVAKATE *et al.*, 2009).

Métodos convencionais de separação e/ou purificação, tais como coluna de troca hidrofóbica ou extrações com solventes orgânicos resultam em perda da estabilidade e atividade fisiológica da bromelina (DOKO *et al.*, 1991). Deste modo, o estudo da extração de bromelina a partir dos resíduos das indústrias alimentícias, utilizando o sistema de duas fases aquosas pode ser uma alternativa interessante para sua purificação e produção.

2.1.5. ESTABILIDADE DA BROMELINA

A bromelina é notavelmente estável em relação ao calor, visto que na produção do suco de abacaxi ocorre um aquecimento a 60°C, e que posteriormente detecta-se uma grande proporção da enzima no estado nativo (BALLS *et al.*, 1941).

Pouco mais da metade da atividade proteolítica original permaneceu após 30 minutos de incubação a 60°C, no estudo de HALE e colaboradores (2005). A atividade variou de 9 a 22% do original após 15 minutos a 70°C. A atividade proteolítica foi perdida quando as dispersões de bromelina foram aquecidas a 100°C por 10 minutos. Dados obtidos a partir de géis de eletroforese mostraram que o aquecimento a 70°C ou superior resultou em degradação total da bromelina, sendo confirmado por *Western-blotting* (HALE *et al.*, 2005).

De acordo com os dados obtidos por SILVEIRA *et al.*, 2009, a enzima em dispersão foi estável em todos os valores de pH estudados, de 4,0 a 8,0, apesar de entre valores de pH 4,0 e 5,0 ocorrer uma menor perda da atividade relativa durante o período de estudo. A atividade relativa da bromelina aumentou com o aumento do valor de pH, até atingir um máximo a valor de pH 7,0. Após esse valor, a atividade apresentou uma pequena diminuição. Isto ocorreu provavelmente devido a estes valores de pH serem próximos ao valor de pH encontrado na fruta do abacaxi in natura, pH 3,6 (SILVEIRA *et al.*, 2009).

No estudo de ANWAR *et al* (2007), todas as preparações com bromelina gradualmente perderam suas atividades após 3 h de incubação a 60°C.

No estudo de GODOI (2007) concluiu-se que preparações de dispersão de bromelina com valores de pH mais próximo de 4 apresentaram-se mais estáveis tanto em relação ao tempo de armazenamento quanto à temperatura de exposição. Quanto mais próximo do valor de pH 8, mais susceptível à desnaturação ficou a bromelina, ou seja, menor a sua estabilidade enzimática. Temperaturas altas, acima de 45°C desnaturam rapidamente a bromelina em dispersão com valores de pH 8, anulando toda a sua atividade enzimática, já quando em pH 4 mais de 50% da atividade catalítica é mantida quando a dispersão da enzima é exposta à temperatura de 55°C (GODOI, 2007).

Foi verificado por ROWAN *et al.* (1990) que a bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos proteicos, e sua atividade é máxima a valores de pH 8,0 e a temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e valor de pH 7,0.

2.2. COSMÉTICOS E O ESTUDO DE ESTABILIDADE

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), cosméticos, produtos de higiene e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Segundo o *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists, IFSCC, (THE FUNDAMENTALS OF STABILITY TESTING, 1992)*, o estudo de estabilidade em cosméticos é um procedimento preditivo, baseado em dados de análises, obtidos de produtos armazenados em condições que visam a acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado.

Cada componente, ativo ou não, pode afetar a estabilidade de um produto. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade do produto. Conforme a origem, as alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por fatores externos; ou intrínsecas, quando determinadas por fatores inerentes à formulação (ANVISA, 2004).

Os testes devem ser conduzidos sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade dos produtos em menos tempo possível. Para isso, as amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. Deve-se tomar uma amostra de referência, também denominada padrão, que em geral pode ser mantida em geladeira ou a temperatura ambiente, ao abrigo da luz (ANVISA, 2004).

Os parâmetros a serem avaliados devem ser definidos e dependem das características do produto em estudo e dos ingredientes utilizados na formulação. De modo geral, avaliam-se parâmetros organolépticos e físico-químicos (ANVISA, 2004).

Entre os parâmetros organolépticos, são comuns as avaliações do aspecto e do odor das formulações. Embora existam pesquisadores treinados para essas análises nas indústrias cosméticas, elas ainda estão sujeitas a variações intrínsecas de subjetividade do avaliador. Por esta razão, neste estudo, essas avaliações foram dispensadas.

2.2.1. AVALIAÇÃO DA COR

A Comissão Internacional de Iluminação, conhecida internacionalmente como CIE (*Commission International de l'Eclairage*), se dedica ao intercâmbio de informações sobre todos os assuntos pertinentes à ciência e a arte da iluminação e da luz, incluindo os aspectos relacionados à cor, visão e tecnologia de imagens, aceita como a autoridade máxima na área da iluminação, sendo atualmente reconhecida pela ISO - *International Organization for Standardization* e pela IEC - *International Electrotechnical Commission*, como uma organização internacional de caráter normativo (*STANDARDS ON COLOR AND APPEARANCE MEASUREMENT*, ASTM, 1996).

Em 1976, o CIE propôs o uso da escala de cor L^* , a^* e b^* ou CIELAB para uma grande variedade de aplicações. Utiliza um canal de luminescência e dois de cromaticidade para representar a cor de forma objetiva e está organizado em uma figura cúbica, onde o eixo L^* estende-se de cima para baixo e representa a variável de luminosidade. A máxima é de 100, que representa o branco e o mínimo é de zero, que representa o preto. Os eixos a^* e b^* têm seus centros no valor zero e não tem limites numéricos. O eixo a^* (figura 1) corresponde a vermelho quando positivo e verde quando negativo. Similarmente, o eixo b^* (figura 1) corresponde a amarelo quando positivo e azul quando negativo.

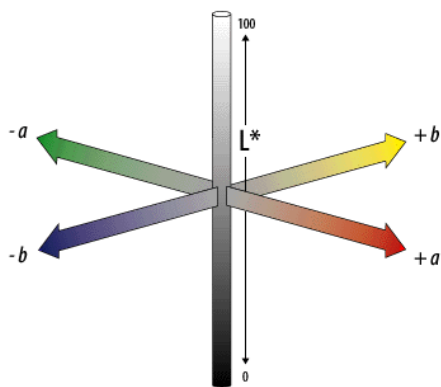


Figura 1. Espaço de cor $L^*a^*b^*$

O conceito de ΔE representa a variação total de cor entre duas cores distintas, extraído a partir dos valores de ΔL , Δa e Δb , que se relacionam através da seguinte expressão:

$$(\Delta E)^2 = (\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2$$

2.2.2. AVALIAÇÃO DO VALOR DE pH

O valor de pH é um dos parâmetros mais importantes na avaliação de formulações, sobretudo com incorporação de enzimas pela possibilidade de instabilidades devidas ao ponto isoelétrico da proteína utilizada.

2.2.3. AVALIAÇÃO DA VISCOSIDADE E REOLOGIA

A resistência de um fluido a qualquer mudança irreversível de seus elementos de volume é chamada de viscosidade. Para a conservação de um fluxo em um fluido, a energia deve ser adicionada continuamente.

A reologia, por sua vez, descreve a deformação de um corpo sob a influência de tensões. Sólidos e líquidos reagem diferentemente quando deformados por tensões. No entanto, entre líquidos e gases, praticamente não há diferenças reológicas; os gases são fluidos com viscosidade muito baixa. Por exemplo, a viscosidade do gás hidrogênio a 20°C é um centésimo da viscosidade da água. Uma diferença marcante entre um líquido e um gás é que suas viscosidades são inversamente dependentes da temperatura.

Para medidas de viscosidade, utiliza-se um viscosímetro. Este equipamento mede a viscosidade através da medida da resistência oferecida pela amostra estudada à rotação de um *spindle*. O torque, também provocado pelo movimento rotacional deste *spindle*, é medido por uma mola calibrada (figura 2). O *spindle* (figura 2) é uma haste de metal desenhada especificamente para cada tipo de fluido com base nas faixas de viscosidade aparente, ou seja, para cada tipo de fluido com determinada viscosidade aparente, existe um tipo de spindle ideal para sua análise.

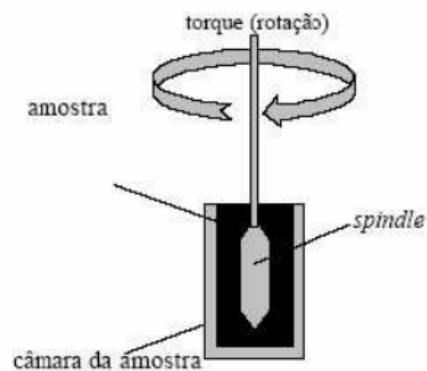


Figura 2. Princípio de Operação do Viscosímetro.

O equipamento expressa ao final da análise duas informações sobre a amostra: viscosidade e torque. A viscosidade é dada em *Centipoise* ($cP = mPa \cdot s$) O torque é dado em porcentagem e expressa o esforço da mola.

De forma prática, para a escolha satisfatória do *spindle* a ser utilizado na análise, deve-se realizar testes com diferentes velocidades de rotação e tempos de análise, de modo a obter um torque perto de 50%. Estabelecidas estas condições, as análises posteriores devem ser realizadas dentro destas especificações.

Para a análise de reologia, faz-se necessário a utilização de um reômetro. O equipamento imprime à amostra em seis diferentes etapas do processo de análise uma velocidade de rotação distinta. Através de um software específico, estrutura-se um gráfico da viscosidade em função do tempo. O objetivo é verificar o comportamento reológico da amostra ao longo das mudanças de tensão de cisalhamento (SCHRAMM; GEBHARD, 2006).

2.2.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DO CONTEÚDO PROTEICO

A REDISPERSÃO - RE nº 1, de 29 de julho de 2005, GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE (ANVISA, 2005), utilizada por indústrias produtoras de insumos e ativos cosméticos, traz que o estudo de estabilidade deve contemplar o monitoramento da variação do doseamento dos princípios ativos através de métodos validados.

Em formulações que veiculam enzimas, a atividade destes agentes e o conteúdo proteico das amostras expressam informações que permitem concluir a cerca do doseamento do ativo ao longo do tempo.

O método de azocaseína (OLIVEIRA *et al*, 2006) pode ser utilizado para o doseamento da atividade enzimática. O procedimento envolve o preparo de dispersão de azocaseína 1,0% (m/v) em etanol e tampão fosfato 0,1 M, valor de pH 7,0, para ser utilizada como substrato. Cada amostra deve ser solubilizada com esta

mistura. A atividade enzimática da bromelina é avaliada mediante quantificação da produção de tirosina, evidenciada por meio de medida de absorbância, a 440 nm. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de bromelina necessária para produzir 1 μmol de tirosina por minuto, a 37 ° C.

Para o doseamento do conteúdo proteico, uma variedade de métodos pode ser aplicada. O de Bradford é mais rápido e sensível que o de Lowry (ZAIA, 1998). Consiste na medida de absorbância de dispersões de soro albumina bovina (BSA) em diferentes diluições para gerar uma curva analítica de concentração de proteína. As amostras em estudo são preparadas do mesmo modo que as dispersões diluídas para a curva referência e analisadas quanto à sua absorbância no comprimento de onda 595 nm.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade da bromelina comercial em três formas farmacêuticas: emulsão óleo em água, gel de Carbopol® 980 e dispersão aquosa, usualmente empregada na disponibilização de cosméticos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar três formulações: emulsão óleo em água, gel de Carbopol® 980 e dispersão aquosa, com incorporação de bromelina do abacaxi, em quatro concentrações: 0,0% (placebo – amostras de referência), 0,5%, 1,0% e 2,0%;
- Expor as formulações a condições pré-determinadas de estudo, sob diferentes temperaturas e valores de pH determinados;
- Monitorar características específicas inerentes a cada tipo de formulação;
- Avaliar a estabilidade da bromelina frente à variação de temperatura e luminosidade, no que tange às suas características físico-químicas, manutenção de sua concentração nas fórmulas e atividade biológica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ESTUDO DE ESTABILIDADE

As preparações foram planejadas com base nas formas mais comuns de apresentação de cosméticos. As seguintes formas farmacêuticas foram selecionadas: emulsão óleo em água, gel de Carbopol® 980 e dispersão aquosa. Para a avaliação dos efeitos da temperatura, as formulações foram submetidas a câmaras térmicas, com temperatura controlada. Para avaliação dos efeitos da luz, amostras de cada forma farmacêutica foram acondicionadas em locais com exposição à luz solar. O valor de pH foi determinado pelo próprio ambiente de cada forma farmacêutica.

Segundo a REDISPERSÃO - RE nº 1, de 29 de julho de 2005, GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE (ANVISA, 2005) e o GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS (ANVISA, 2004), o tempo recomendado para estudo acelerado de estabilidade de formulações contendo ativos é de seis meses, devendo ser realizado estudo prolongado de 24 meses para confirmar os resultados obtidos na avaliação acelerada para fins de registro e comercialização de produtos. Assim, as formulações utilizadas neste projeto foram submetidas às condições de estudo acelerado pelo tempo máximo de seis meses, com acompanhamento periódico e monitoramento dos parâmetros em avaliação.

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro neutro, transparente com tampa para vedação. A quantidade de produto por frasco foi em torno de 100 g.

Amostras das três formas farmacêuticas, sem incorporação da bromelina, denominadas neste estudo de placebo, foram preparadas e estudadas nas mesmas condições das amostras com bromelina. Como referência, foram utilizadas as amostras placebo acondicionadas a 25°C e ao abrigo da luz.

Entre as condições de armazenagem mais comuns das amostras estão temperatura ambiente (25°C +/- 2°C, ao abrigo da luz), temperatura elevada (45°C +/- 2°C), temperatura baixa (5°C +/- 2°C) e exposição à radiação luminosa (ANVISA, 2004). Estas foram as condições utilizadas neste estudo. A periodicidade de avaliação das amostras foi definida de acordo com recomendações do mesmo guia: tempo zero, 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 180 dias.

Os parâmetros a serem avaliados foram definidos de acordo com características das formulações em estudo e do ativo incorporado.

Para a emulsão óleo em água e o gel de Carbopol® 980, os parâmetros selecionados foram: presença de separação de fases, cor objetiva, valor de pH a 25°C, viscosidade a 25°C, reologia a 25°C, atividade enzimática e conteúdo proteico.

Para a dispersão aquosa, os parâmetros selecionados foram: presença de separação de fases, cor objetiva, valor de pH a 25°C, atividade enzimática e conteúdo proteico.

4.2. FORMULAÇÕES

As matérias-primas necessárias para preparo das formulações foram doadas por fornecedores e pela empresa Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. As informações pertinentes a cada uma se encontram abaixo, na tabela 1.

Tabela 1. Componentes utilizados no preparo das formulações emulsão óleo em água, gel de Carbopol®980 e dispersão aquosa.

Componente	Fornecedor	Lote	Data de Validade
Ácido Pirrolidona Carboxílico de Sódio (PCA-Na)	Solabia Biotecnológica Ltda.	10B080D	20/02/2012
Álcool 96°GL Neutro	Usina Açucareira Ester S/A	76930	30/10/2014
Álcool Cetosteárilico	Basf S/A	5552591	12/04/2013
BHT	M Cassab Comércio e Indústria	153	29/07/2013
Butilcarbamato de Iodopropinila	Brenntag Química Brasil	B1434032	15/08/2012
Carbopol 980	Lubrizol do Brasil	100959549	03/11/2012
Carbopol ETD2020	Lubrizol do Brasil	100983438	19/01/2013
Cetearet-20	Croda do Brasil Ltda.	571683	29/07/2013
Ciclometicona D5 E Dimeticonol	Momentive Performance	11FITA073	14/06/2012
Ciclometicone D5/D6 VS7158	Momentive Performance	11KWFA438	31/10/2014
DMDM Hidantoína	Clariant S/A	BRAC205130	22/07/2012
Bromelina Comercial	Sigma-Aldrich do Brasil	031M1628V	01/03/2013
Éter Dicaprílico	Basf S/A	7899687	08/09/2012
Fenoxietanol F	Chemyunion Química Ltda.	CD1730411	01/04/2014
Glicerina Bidestilada BXR Vegetal	Indústria Química Anastácio S/A	IQA0712-11	23/11/2013
Goma Xantana	CP Kelco Brasil S/A	010386H	23/09/2013
Hidróxido de Sódio	Indústria Química Anastácio S/A	60811	12/02/2012
Irgasan DP 300	M Cassab Comércio e Indústria	K00120812568	03/12/2013
PEG-23/PPG-6-Dimethicone	Momentive Performance	10D002	24/12/2013
Poliacrilamida E Isoparafina C13-14 E Lauret-7	Chemyunion Química Ltda.	T03535	09/09/2012
PPG-2-Ceteareth-9	Basf S/A	HN1E069227	11/03/2012
Sorbato de Potássio	Indústria Química Anastácio S/A	PS32010110	28/11/2012
Trietanolamina 99W	Oxiteno S/A Indústria e Comércio	111007C97939	06/10/2012
Triglicerídeo Cáprico/Caprílico	Polytechno Indústrias Químicas	PB90068	20/09/2013

As formulações deste estudo foram propostas após a análise da composição de produtos cosméticos comerciais. O levantamento foi realizado na base de dados de produtos *Global New Products Database* (Mintel, Londres, Inglaterra), que monitora lançamentos em âmbito mundial. Com base nas matérias-primas presentes em produtos cosméticos destinados à hidratação da pele, foram planejadas as fórmulas para este estudo.

As concentrações de bromelina incorporadas nas formas estudadas foram baseadas nas concentrações usuais de ativos em bases cosméticas. Concentrações acima de 1,0% não são encontradas com frequência nestes produtos por questões de custo, instabilidade de fórmula e toxicidade. Porém, a concentração de 2,0% foi proposta pela possibilidade de a bromelina se auto clivar e ter sua concentração muito reduzida ao longo do estudo.

4.2.1. DEFINIÇÃO DA FÓRMULA DA EMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA

Com base nos estudos realizados, propôs-se a seguinte fórmula de emulsão hidratante, conforme descreve a tabela 2.

Tabela 2. Fórmula para emulsão óleo em água, com as concentrações dos componentes e ordem de adição de cada um.

EMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA			
COMPONENTES	FUNÇÃO NA FÓRMULA	CONC. (%)	FASES*
Goma Xantana	espessante/surfactante	0,25	1
Carbopol ETD2020	espessante/surfactante	0,20	1
Álcool Cetoestearílico	agente de consistência	4,00	2
Éter Dicaprílico	solvente lipofílico/agente de melhora sensorial	3,00	2
Cetearet-20	surfactante/emulsificante	2,50	2
Triglicerídeo Cáprico/Caprílico	emoliente/protetor para pele	3,00	2
BHT	antioxidante	0,10	2
Glicerina Bidestilada BXR Vegetal	umectante/solvente	9,00	3
Ciclotricone D5/D6 VS7158	umectante/emoliente	2,00	3
Ciclotricona D5 E Dimeticona	umectante/emoliente	1,00	3
Poliacrilamida E Isoparafina C13-14 E Lauret-7	espessante	1,50	5
Butilcarbamat de Iodopropinila	conservante anti-fúngico	0,10	4
Fenoxietanol F	conservante anti-bacteriano	0,95	4
Hidróxido de Sódio	corretor de pH	0,03	7
Solução Bromelina 10%	ativo para pele	5,00 / 10,00 / 20,00**	6
Água desmineralizada q.s.p.	Solvente	100,00	1

*ordem de adição de cada composto, determinada segundo suas características físico-químicas;

**concentrações da solução de bromelina 10% (m/m) incorporadas nas fórmulas 0,5%, 1,0% e 2,0%, respectivamente.

4.2.1.1. PROCEDIMENTO DE PREPARO DA EMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA

O procedimento se iniciou com a agitação de água desmineralizada em agitador mecânico (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha), com velocidade de 800rpm. Foi utilizada hélice dentada, cortante, com alto poder de cisalhamento (Figura 3). A Goma Xantana e o Carbopol ETD2020 foram adicionados. O tempo de dispersão foi de 30 minutos. Em seguida, iniciou-se o aquecimento em chapa elétrica, até 75°C. As matérias-primas da fase oleosa - Álcool Cetoestearílico, Éter Dicaprílico, Cetearet-20, Triglicerídeo Cáprico/Caprílico e BHT - foram misturadas. A mistura foi aquecida e sua temperatura foi controlada até atingir de 75°C. Sob agitação a 1200 rpm, verteu-se a fase oleosa sobre a fase aquosa para permitir emulsificação. O aquecimento foi mantido por 5 minutos e o processo de resfriamento foi iniciado. A temperatura foi monitorada durante a perda de calor. Ao atingir 50°C,

foram adicionadas a Glicerina Bidestilada BXR Vegetal e os silicones (Ciclometicone D5/D6 VS7158 e Ciclometicona D5 E Dimeticonol). Ao atingir 30°C, foram adicionados os conservantes (Butilcarbamato de Iodopropinila e Fenoxietanol F). Adicionou-se o espessante Poliacrilamida E Isoparafina C13-14 E Lauret-7. A homogeneização se deu nos 5 minutos seguintes. A dispersão de bromelina 10% (m/m) previamente preparada foi adicionada. Por fim, foi adicionado o hidróxido de sódio solubilizado em 100 mL de água desmineralizada.

O processo de obtenção da emulsão placebo óleo em água aconteceu de forma equivalente, excetuando-se a incorporação da bromelina, cuja porcentagem na fórmula foi substituída pela água desmineralizada.

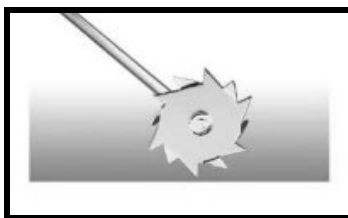


Figura 3. Hélice dentada cortante de dispersão utilizada no preparo das formulações deste estudo.

4.2.2. DEFINIÇÃO DA FÓRMULA DO GEL DE CARBOPOL® 980

Com base nos estudos realizados, propôs-se a seguinte fórmula para o gel, descrita na tabela 3.

Tabela 3. Fórmula para o gel de Carbopol®980, com as concentrações dos componentes e ordem de adição de cada um.

GEL DE CARBOPOL® 980			
COMPONENTES	FUNÇÃO NA FÓRMULA	CONC. (%)	FASES*
Carbopol 980	espessante	2,00	1
PPG-2-Ceteareth-9	emulsificante	1,50	2
Ácido Pirrolidona Carboxílico de Sódio (PCA-Na)	agente hidratante	0,20	3
Álcool 96°GL Neutro	solvente / antiespumante	10,00	3
Irgasan DP 300	conservante anti-bacteriano	0,50	4
BHT	antioxidante	0,05	4
PEG-23/PPG-6-Dimethicone	emoliente / antiespumante	2,00	3
Solução Bromelina 10%	ativo para pele	5,00 / 10,00 / 20,00**	5
Trietanolamina 99W	corretor de pH	1,10	6
Água desmineralizada q.s.p.	solvente	100,00	1

*ordem de adição de cada composto, determinada segundo suas características físico-químicas;

**concentrações da solução de bromelina 10% (m/m) incorporadas nas fórmulas 0,5%, 1,0% e 2,0%, respectivamente.

4.2.2.1. PROCEDIMENTO DE PREPARO DO GEL DE CARBOPOL® 980

O procedimento se iniciou com a agitação de água desmineralizada em agitador mecânico (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha), com velocidade de 800 rpm. Foi utilizada hélice dentada, cortante, com alto poder de cisalhamento (Figura 3). Em seguida, foi adicionado o Carbopol® 980. A mistura foi agitada vigorosamente por 30 minutos até completa dispersão do polímero. Adicionou-se PPG-2-Ceteareth-9. Foram adicionados o Álcool Neutro 96°GL, o Ácido Pirrolidona Carboxílico de Sódio (PCA-Na), e o PEG-23/PPG-6-Dimethicone. Após 20 minutos de agitação, adicionaram-se o BHT e o Irgasan DP 300. A dispersão previamente preparada de bromelina a 10% (m/m) foi adicionada aos poucos. Por fim, adicionou-se a Trietanolamina 99W e observou-se a formação do gel.

O processo de obtenção do gel placebo aconteceu de forma equivalente, excetuando-se a incorporação da bromelina, cuja porcentagem na fórmula foi substituída pela água desmineralizada.

4.2.3. DEFINIÇÃO DA FÓRMULA DA DISPERSÃO AQUOSA

Com base nos estudos realizados, propôs-se a seguinte fórmula para a dispersão, descrita na tabela 4.

Tabela 4. Fórmula da dispersão aquosa, com as concentrações dos componentes e ordem de adição de cada um.

DISPERSÃO AQUOSA			
COMPONENTES	FUNÇÃO NA FÓRMULA	CONC. (%)	FASES*
Sorbato de Potássio	conservante anti-fúngico	0,10	1
DMDM Hidantoína	conservante anti-bacteriano	0,50	1
Solução Bromelina 10%	ativo para pele	5,00 / 10,00 / 20,00**	1
Água desmineralizada q.s.p.	Solvente	100,00	1

*ordem de adição de cada composto, determinada segundo suas características físico-químicas;

**concentrações da solução de bromelina 10% (m/m) incorporadas nas fórmulas 0,5%, 1,0% e 2,0%, respectivamente.

4.2.3.1. PROCEDIMENTO DE PREPARO DA DISPERSÃO AQUOSA

O procedimento se iniciou com a agitação de água desmineralizada em agitador mecânico (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha), com velocidade de 800 rpm. Foi utilizada hélice dentada, cortante, com alto poder de cisalhamento (Figura 3). Carbopol® 980 foi adicionado em seguida. A dispersão previamente preparada de bromelina 10% (m/m) foi adicionada aos poucos. Adicionaram-se os conservantes. A agitação foi mantida por 15 minutos.

O processo de obtenção da dispersão aquosa placebo aconteceu de forma equivalente, excetuando-se a incorporação da bromelina, cuja porcentagem na fórmula foi substituída pela água desmineralizada.

4.3. ANÁLISES

As análises foram divididas em dois grupos: análises de monitoramento da qualidade da enzima incorporada e análises de monitoramento da qualidade das formulações.

4.3.1. ANÁLISES DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ENZIMA

4.3.1.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para avaliação da atividade enzimática, selecionou-se o método da azocaseína (OLIVEIRA *et al*, 2006). O preparo do tampão fosfato 0,1 M, valor de pH 7,0 foi realizado, solubilizando-se 8,9 g de fosfato de sódio bibásico em 450 mL de água destilada, em balão volumétrico de 500 mL. O valor do pH foi ajustado para 7,0 com ácido clorídrico (HCl). O volume foi acertado com água destilada.

Para o preparo da solução de azocaseína (Sigma-Aldrich) 1,0% (m/v), valor de pH 7,0, 2,5 g da proteína foram suspensos em 10,0 mL de etanol 99%, com agitador magnético. 200 mL do tampão fosfato foram adicionados e a agitação permaneceu por 10 minutos. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi acertado com o tampão.

Para o preparo da solução de ácido tricloroacético 5,0%, 50,0 g do ácido foram solubilizados em 1000 mL de água destilada, em balão volumétrico de 1 L.

Em um tubo de centrífuga, 125 µL da solução de azocaseína 1,0% foram adicionados a 125 µL do tampão fosfato valor de pH 7,0 e submetidos a banho-maria, por 10 minutos a 37°C. Foram acrescentados 750 µL da solução de ácido tricloroacético 5,0%. O tubo foi levado à centrifugação a 3570 g por 10 minutos. A leitura do branco foi realizada em seguida.

Para as análises das amostras, repetiu-se o procedimento, substituindo-se os 125 µL do tampão fosfato valor de pH 7,0 por 125 µL da formulação em estudo.

As absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas em 440 nm em espectrofotômetro (Biospectro, Curitiba, Brasil). Com o valor encontrado de absorbância, calcularam-se os valores de atividade enzimática para a bromelina, segundo a equação:

$$\text{Atividade (U/ mL)} = (\text{Abs} \times 6) / 0,125$$

4.3.1.1.1. VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a verificação da validade do método utilizando azocaseína como substrato para análise da atividade enzimática da bromelina nas formulações propostas, 10 ensaios em triplicata foram realizados para cada forma farmacêutica com 0,5% de bromelina incorporada, divididos em 5 ensaios no dia 1 e 5 ensaios no dia 2.

Foram calculados a média final de atividade enzimática e o desvio padrão da média. Posteriormente, foi calculado o desvio em relação ao conteúdo proteico da solução aquosa, 5 mg/mL, preparada com a bromelina comercial e utilizada como referência. Foi determinado que a variação entre o valor encontrado de atividade enzimática para a solução aquosa e para as formas farmacêuticas não deveria ultrapassar 10%.

Foram calculados ainda os valores de variação entre as médias de concentração proteica encontradas nos dias 1 e 2. Foi determinado que a variação deveria ser de no máximo 5%.

4.3.1.2. ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para avaliação do conteúdo proteico, selecionou-se o método de Bradford.

Para o preparo da solução de soro albumina bovina (BSA) 20 mg/mL, 1,00 g de proteína foi solubilizada em 50 mL de água destilada, em balão volumétrico, evitando a formação de bolhas. Foram preparadas 5 diluições para a construção da curva analítica, conforme tabela 5.

Tabela 5. Esquema da Curva Analítica para Doseamento do Conteúdo Proteico

Solução BSA (mL)	Água Destilada (mL)	Concentração Final de Albumina (mg/mL)
0,50	9,50	1,00
2,00	8,00	4,00
4,00	6,00	8,00
6,00	4,00	12,00
8,00	2,00	16,00

Uma alíquota de 25 µL de cada solução final, adicionada a 775 µL de água destilada e a 200 µL do reagente de Bradford foram agitados em *eppendorf* de 2,0 mL por 10 minutos em agitador magnético. A dispersão repousou por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as absorbâncias foram lidas a 595 nm para construção das curvas analíticas.

Para as análises das amostras, repetiu-se o procedimento, substituindo-se os 25 µL das soluções finais por alíquotas das formulações em estudo.

Os valores encontrados de absorbância foram substituídos na equação gerada para a curva analítica para cálculo da concentração de proteínas.

4.3.1.2.1. VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE BRADFORD

Para a verificação da validade do método de Bradford para análise do conteúdo proteico nas formulações propostas, 10 ensaios em triplicata foram realizados para cada forma farmacêutica com 0,5% de bromelina incorporada, divididos em 5 ensaios no dia 1 e 5 ensaios no dia 2.

Foram calculados a média final de atividade enzimática e o desvio padrão da média. Posteriormente, foi calculado o desvio em relação ao conteúdo proteico da dispersão aquosa, 5 mg/mL, preparada com a bromelina comercial e utilizada como referência. Foi determinado que a variação entre o valor encontrado para a dispersão aquosa e para as formas farmacêuticas não deveria ultrapassar 10%.

Foram calculados ainda os valores de variação entre as médias de concentração proteica encontradas nos dias 1 e 2. Foi determinado que a variação deveria ser de no máximo 5%.

4.3.1.3. ATIVIDADE ESPECÍFICA

A atividade específica é o parâmetro gerado a partir da relação entre a atividade enzimática obtida pelo método da azocaseína e a concentração de proteínas, obtida pelo método de Bradford. Sua unidade é U/mg, que representa a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μ mol de produto por minuto, por miligrama de proteína na amostra estudada.

4.3.2. ANÁLISES DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DAS FORMULAÇÕES

4.3.2.1. CENTRIFUGAÇÃO

Para iniciar o estudo de estabilidade, foi necessário garantir que logo após o preparo das formulações, os sistemas dispersos utilizados seriam capazes de se manter neste estado.

Para esta análise, 5,0 g de cada forma farmacêutica foram adicionados a um tubo de centrifuga e centrifugadas a 1400 g durante 5 minutos. A centrífuga utilizada foi modelo HermLe Z300 (HermLe-labortechnik, Wehingen, Alemanha).

4.3.2.2. ANÁLISE DE COR OBJETIVA

A avaliação das amostras em estudo de estabilidade foi realizada com a utilização dos parâmetros objetivos de medição de cor apresentados na introdução deste trabalho, utilizando-se o colorímetro Konica Minolta CM-3600 d (Konica Minolta, Toquio, Japão).

As amostras no tempo zero foram analisadas e seus parâmetros L^* , a^* e b^* iniciais foram utilizados como referência para as análises posteriores, de modo a se obter valor de ΔE que expressasse a variação total de cor sofrida pelas formulações ao longo do tempo, para cada condição.

As amostras foram introduzidas em cubeta de acrílico própria para formulações. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.2.3. ANÁLISE DE VALOR DE pH

Para a medição do valor de pH das formulações deste estudo, foi utilizado Medidor de valor de pH Micronal modelo B474 (Micronal, São Paulo, Brasil). As amostras foram analisadas após atingirem temperatura ambiente. O eletrodo foi introduzido diretamente no frasco que continha cada amostra e a medida foi colhida após estabilização do valor de pH. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.2.4. ANÁLISES DE VISCOSIDADE E REOLOGIA

Para a medida da viscosidade das amostras estudadas, foi utilizado viscosímetro modelo DV-II+ Pro (Brookfield, Middleboro, Estados Unidos). Para a medida da viscosidade, é necessário que cada amostra esteja acondicionada em frasco cuja profundidade contenha todo o *spindle* utilizado. Os frascos que acondicionaram as amostras durante o estudo já satisfaziam esta condição. Por esta razão, as medidas foram realizadas diretamente no frasco de acondicionamento. O equipamento foi ajustado, com base nas configurações definidas para cada formulação no tempo zero. Valores de viscosidade, em *Centipoise*, e de torque, em porcentagem, foram colhidos em análises realizadas em triplicata.

Para a análise de reologia, foi utilizado o reômetro R/S Plus (Brookfield, Middleboro, Estados Unidos). Uma pequena alíquota de cada formulação foi depositada na base do equipamento. O *spindle*, devidamente acoplado no equipamento, foi baixado sobre a amostra. Os excessos foram removidos. A análise foi iniciada, com *spindle* realizando rotação em diferentes velocidades sobre a amostra em estudo. Ao término das etapas, valores das viscosidades nas etapas 2 e 4 do processo e a porcentagem de recuperação da viscosidade após cisalhamento foram colhidos.

5. RESULTADOS

Para valores de referência, foi utilizada solução aquosa de bromelina 5 mg/mL. A concentração de proteínas encontrada foi de 4,13 mg/mL e a atividade enzimática foi de 31,63 U/mL. O valor de pH desta solução foi 5,7. A atividade específica verificada para esta amostra foi de 7,65 U/mg.

5.1. VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os resultados da verificação para a forma farmacêutica emulsão óleo em água estão mostrados na tabela 6.

Tabela 6. Verificação da validade do método da atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato para as emulsões.

Atividade Enzimática (U/mL)										
Dias	Dia 1					Dia 2				
Réplicas	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	34,4192	33,9746	34,5462	34,1016	34,4827	33,9111	34,2287	35,0542	34,4827	34,4192
2	34,4192	33,9746	34,4827	34,1016	34,4827	33,8476	34,2922	35,0542	34,5462	34,4192
3	34,4827	33,9746	34,5462	34,1016	34,4827	34,4827	34,2922	35,0542	34,4827	36,1973
Média	34,4403	33,9746	34,5250	34,1016	34,4827	34,0805	34,2710	35,0542	34,5038	35,0119
Desvio Padrão	0,03666	0,00000	0,03666	0,00000	0,00000	0,34975	0,03666	0,00000	0,03666	1,02659
Média Final de Atividade Enzimática							34,4446			
Desvio Padrão Final							0,32483			
Valor de Ativ. Enz. para Solução Preparada de Bromelina Comercial, 5mg/mL (Valor Referência)							31,6301			
Desvio da Média Encontrada nos Ensaio em Relação ao Valor Referência							8,90%			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 1)							34,3049			
Desvio Padrão Final (Dia 1)							0,24939			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 2)							34,5643			
Desvio Padrão Final (Dia 2)							0,43649			
Desvio Encontrado entre as Médias dos dias 1 e 2							0,76%			

Os resultados da verificação para a forma farmacêutica gel de Carbopol® 980 estão mostrados na tabela 7.

Tabela 7. Verificação da validade do método da atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato para os géis.

Atividade Enzimática (U/mL)										
Dias	Dia 1					Dia 2				
Réplicas	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	28,5363	28,1678	28,6416	28,2731	28,5890	28,1151	28,3784	29,0628	28,5890	28,5363
2	28,5363	28,1678	28,5890	28,2731	28,5890	28,0625	28,4310	29,0628	28,6416	28,5363
3	28,5890	28,1678	28,6416	28,2731	28,5890	28,5890	28,4310	29,0628	28,5890	30,0105
Média	28,5539	28,1678	28,6241	28,2731	28,5890	28,2555	28,4135	29,0628	28,6065	29,0277
Desvio Padrão	0,03040	0,00000	0,03040	0,00000	0,00000	0,28997	0,03040	0,00000	0,03040	0,85113
Média Final de Atividade Enzimática							28,5574			
Desvio Padrão Final							0,26931			
Valor de Ativ. Enz. para Solução Preparada de Bromelina Comercial, 5mg/mL (Valor Referência)							31,6301			
Desvio da Média Encontrada nos Ensaio em Relação ao Valor Referência							9,71%			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 1)							28,4317			
Desvio Padrão Final (Dia 1)							0,20676			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 2)							28,6534			
Desvio Padrão Final (Dia 2)							0,36189			
Desvio Encontrado entre as Médias dos dias 1 e 2							0,78%			

Os resultados da verificação para a forma farmacêutica dispersão aquosa estão mostrados na tabela 8.

Tabela 8. Verificação da validade do método da atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato para as dispersões.

Atividade Enzimática (U/mL)										
Dias	Dia 1					Dia 2				
Réplicas	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	29,2680	28,8900	29,3760	28,9980	29,3220	28,8360	29,1060	29,8080	29,3220	29,2680
2	29,2680	28,8900	29,3220	28,9980	29,3220	28,7820	29,1600	29,8080	29,3760	29,2680
3	29,3220	28,8900	29,3760	28,9980	29,3220	29,3220	29,1600	29,8080	29,3220	30,7800
Média	29,2860	28,8900	29,3580	28,9980	29,3220	28,9800	29,1420	29,8080	29,3400	29,7720
Desvio Padrão	0,03118	0,00000	0,03118	0,00000	0,00000	0,29741	0,03118	0,00000	0,03118	0,87295
Média Final de Atividade Enzimática							29,2896			
Desvio Padrão Final							0,27622			
Valor de Ativ. Enz. para Solução Preparada de Bromelina Comercial, 5mg/mL (Valor Referência)							31,6301			
Desvio da Média Encontrada nos Ensaio em Relação ao Valor Referência							7,40%			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 1)							29,1708			
Desvio Padrão Final (Dia 1)							0,21206			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 2)							29,4084			
Desvio Padrão Final (Dia 2)							0,37117			
Desvio Encontrado entre as Médias dos dias 1 e 2							0,81%			

5.2. VERIFICAÇÃO DA VALIDADE DO MÉTODO DE BRADFORD

Os resultados da verificação para a forma farmacêutica emulsão óleo em água estão mostrados na tabela

9.

Tabela 9. Verificação da validade do método de Bradford para as emulsões.

Concentração Proteica (mg/mL)										
Dias	Dia 1					Dia 2				
Réplicas	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	5,1404	4,9727	5,1884	5,0206	5,1644	4,9487	5,0685	5,3801	5,1644	5,1404
2	5,1404	4,9727	5,1644	5,0206	5,1644	4,9248	5,0925	5,3801	5,1884	5,1404
3	5,1644	4,9727	5,1884	5,0206	5,1644	5,1644	5,0925	5,3801	5,1644	5,8115
Média	5,1484	4,9727	5,1804	5,0206	5,1644	5,0126	5,0845	5,3801	5,1724	5,3641
Desvio Padrão	0,01384	0,00000	0,01384	0,00000	0,00000	0,13199	0,01384	0,00000	0,01384	0,38741
Média Final de Proteínas Totais							5,1500			
Desvio Padrão Final							0,12258			
Conteúdo Proteico para Solução Preparada de Bromelina Comercial, 5mg/mL (Valor Referência)							5,0135			
Desvio da Média Encontrada nos Ensaio em Relação ao Valor Referência							2,72%			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 1)							5,0973			
Desvio Padrão Final (Dia 1)							0,09411			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 2)							5,2137			
Desvio Padrão Final (Dia 2)							0,16472			
Desvio Encontrado entre as Médias dos dias 1 e 2							2,28%			

Os resultados da verificação para a forma farmacêutica gel de Carbopol® 980 estão mostrados na tabela

10.

Tabela 10. Verificação da validade do método de Bradford para os géis.

Concentração Proteica (mg/mL)										
Dias	Dia 1					Dia 2				
Réplicas	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	5,0627	4,8975	5,1099	4,9447	5,0863	4,8739	4,9919	5,2987	5,0863	5,0627
2	5,0627	4,8975	5,0863	4,9447	5,0863	4,8503	5,0155	5,2987	5,1099	5,0627
3	5,0863	4,8975	5,1099	4,9447	5,0863	5,0863	5,0155	5,2987	5,0863	5,7236
Média	5,0706	4,8975	5,1020	4,9447	5,0863	4,9368	5,0076	5,2987	5,0942	5,2830
Desvio Padrão	0,01363	0,00000	0,01363	0,00000	0,00000	0,12999	0,01363	0,00000	0,01363	0,38155
Média Final de Proteínas Totais							5,0721			
Desvio Padrão Final							0,12073			
Conteúdo Proteico para Solução Preparada de Bromelina Comercial, 5mg/mL (Valor Referência)							5,0135			
Desvio da Média Encontrada nos Ensaio em Relação ao Valor Referência							1,16%			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 1)							5,0307			
Desvio Padrão Final (Dia 1)							0,09269			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 2)							5,1241			
Desvio Padrão Final (Dia 2)							0,16223			
Desvio Encontrado entre as Médias dos dias 1 e 2							1,86%			

Os resultados da verificação para a forma farmacêutica dispersão aquosa estão mostrados na tabela 11.

Tabela 11. Verificação da validade do método de Bradford para as dispersões.

Concentração Proteica (mg/mL)										
Dias	Dia 1					Dia 2				
Réplicas	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	4,9310	4,7701	4,9770	4,8161	4,9540	4,7471	4,8621	5,1609	4,9540	4,9310
2	4,9310	4,7701	4,9540	4,8161	4,9540	4,7241	4,8851	5,1609	4,9770	4,9310
3	4,9540	4,7701	4,9770	4,8161	4,9540	4,9540	4,8851	5,1609	4,9540	5,5747
Média	4,9387	4,7701	4,9693	4,8161	4,9540	4,8084	4,8774	5,1609	4,9617	5,1456
Desvio Padrão	0,01327	0,00000	0,01327	0,00000	0,00000	0,12661	0,01327	0,00000	0,01327	0,37163
Média Final de Proteínas Totais							4,9402			
Desvio Padrão Final							0,13252			
Conteúdo Proteico para Solução Preparada de Bromelina Comercial, 5mg/mL (Valor Referência)							5,0135			
Desvio da Média Encontrada nos Ensaio em Relação ao Valor Referência							1,46%			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 1)							4,8897			
Desvio Padrão Final (Dia 1)							0,09028			
Média Final de Proteínas Totais (Dia 2)							4,9908			
Desvio Padrão Final (Dia 2)							0,15801			
Desvio Encontrado entre as Médias dos dias 1 e 2							2,07%			

5.3. RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS

Os resultados obtidos nas análises realizadas nas amostras após 180 dias de estudo foram comparados através de teste *t* de *Student*, considerando intervalo de confiança de 95%. Foram comparados os resultados das amostras com diferentes concentrações, dentro de cada condição de armazenamento. Posteriormente, dentro de cada condição, os resultados das amostras das formas farmacêuticas foram comparados. Os cálculos estatísticos se encontram no ANEXO I.

Para o estudo da Emulsão Óleo em Água e Gel de Carbopol® 980 foram selecionadas as seguintes análises: cor objetiva, valor de pH a 25°C, viscosidade a 25°C, reologia a 25°C, avaliação da atividade enzimática da bromelina e conteúdo proteico na amostra. Os resultados estão expressos na forma de atividade específica. Para o estudo das dispersões aquosas, apenas não foram realizadas as análises de viscosidade e reologia a 25°C.

5.3.1. ANÁLISE DE CENTRIFUGAÇÃO

As análises de centrifugação foram executadas até os primeiros 30 dias de estudo. Para as emulsões e géis, não foram observados separação de fases e/ou precipitados em todas as condições estudadas. Para as dispersões, foram observados precipitados em todas as condições estudadas para as amostras com 1,0% e 2,0% de bromelina. Não foram observados precipitados para as outras concentrações. Por esta razão, estas amostras não seguiram no estudo.

5.3.2. COR OBJETIVA

A cor objetiva foi estudada em termos da variação total de cor, ΔE . Os resultados encontrados para as emulsões, géis e dispersões estão expressos respectivamente nas figuras 4, 5 e 6.

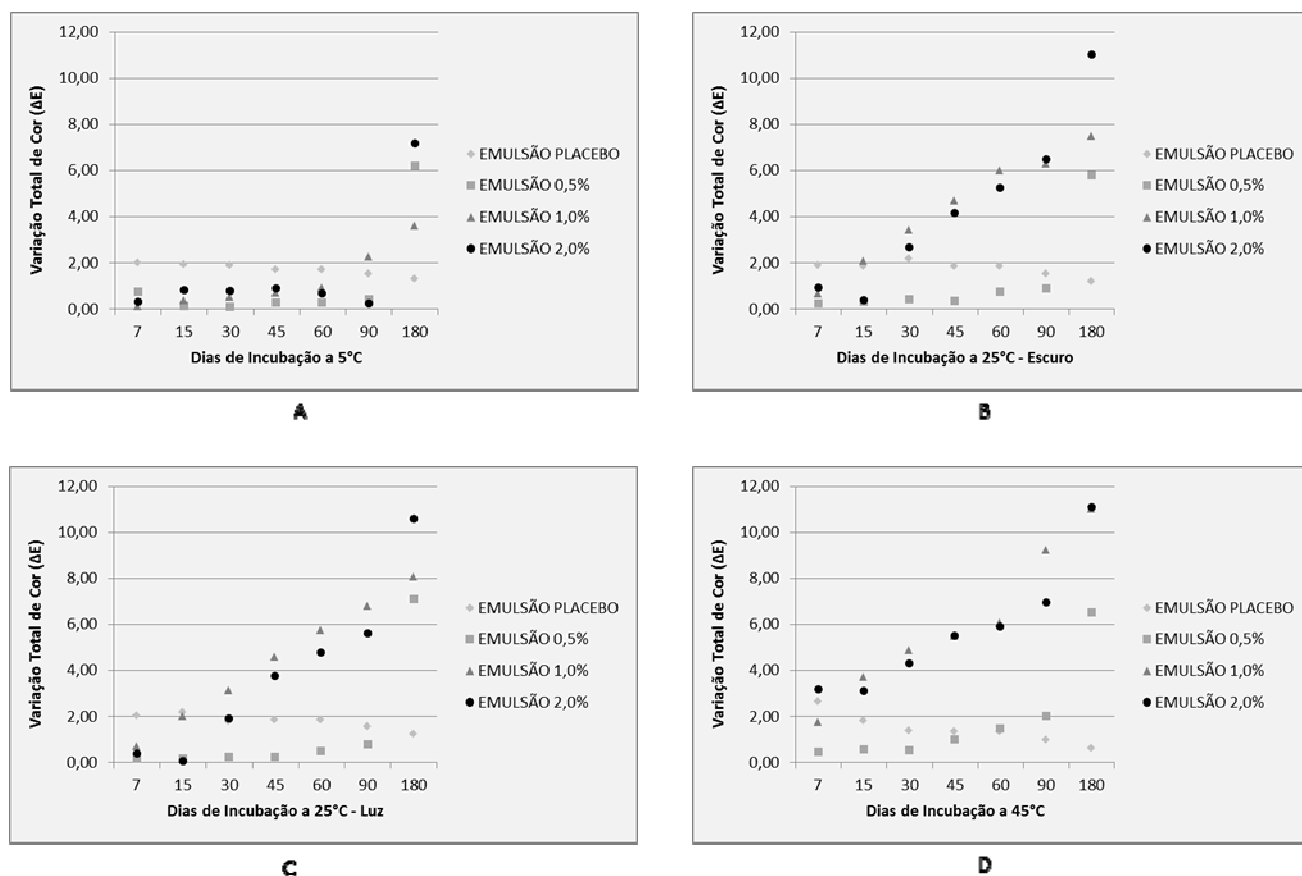


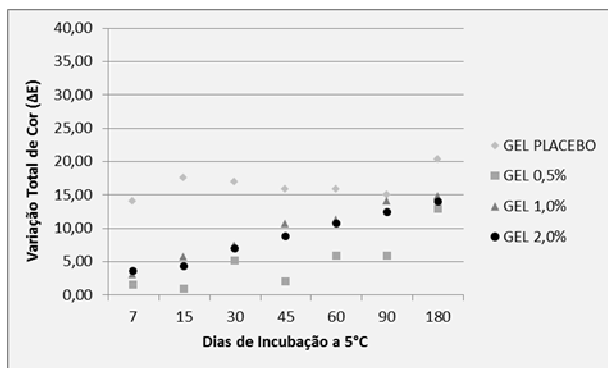
Figura 4. Variação total da cor para emulsões, em função do tempo de armazenamento.

Variações de cor foram observadas em todas as temperaturas e condições de luminosidade durante os 180 dias de estudo.

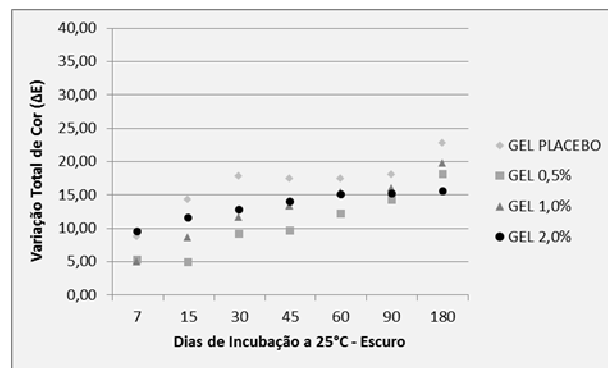
Na emulsão placebo, as variações verificadas foram semelhantes nas quatro condições ao longo do tempo. Na emulsão com 0,5% de bromelina, houve variação na cor, porém, menos expressiva até os 90 dias de estudo, em que o valor de ΔE ficou inferior a 1,0. Foi observado um aumento na variação entre o 90º e o 180 º dia de estudo nas quatro condições estudadas, com ΔE alcançando valores entre 5,0 e 8,0.

Nas emulsões com 1,0% e 2,0% de bromelina, houve manutenção mais prolongada da cor na condição de 5°C até o 60º dia, em que ΔE se manteve abaixo de 1,0. Nas demais condições de temperatura e luminosidade, variações superiores a 1,0 foram evidenciadas nos primeiros 15 dias de estudo para amostras com 1,0% de

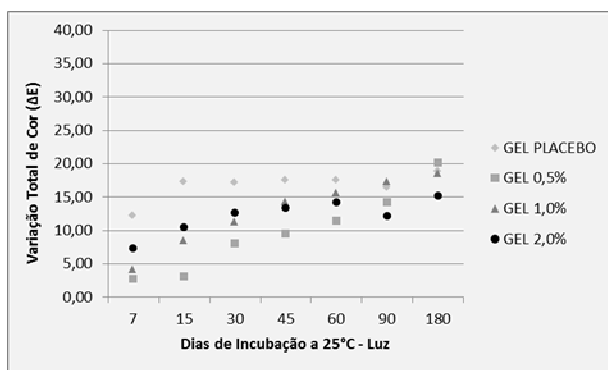
bromelina e após 30 dias para amostras com 2,0% de bromelina. O padrão de comportamento da variação de cor foi semelhante nessas amostras nas condições de escuro e luz, sob a mesma temperatura. Na temperatura de 45°C, a curva de variação da cor para as emulsões com 1,0% e 2,0% de bromelina parte de valores de variação superiores a 2,0.



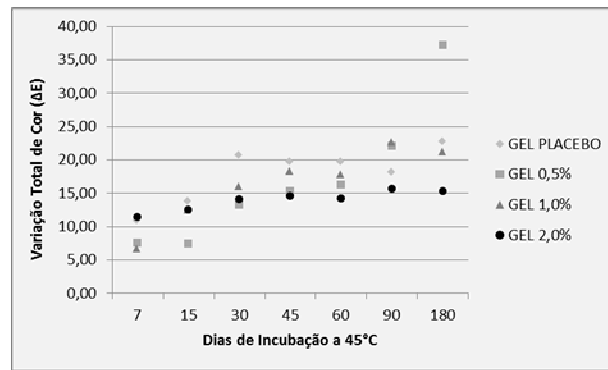
A



B



C



D

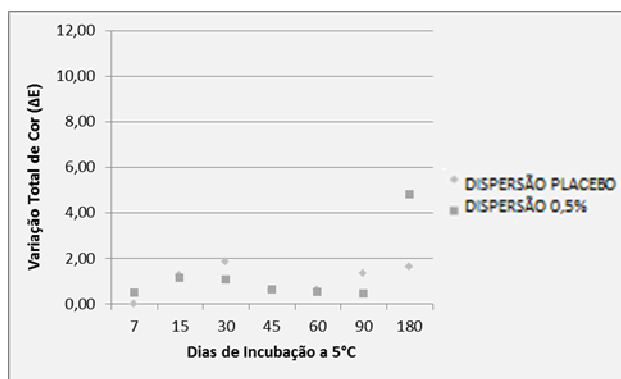
Figura 5. Variação total da cor para os géis, em função do tempo de armazenamento.

Os géis apresentaram grandes variações de cor em todas as condições durante os 180 dias de estudo. No gel placebo, os valores de ΔE foram superiores a 10,00 a partir do 7º dia de estudo para todas as temperaturas.

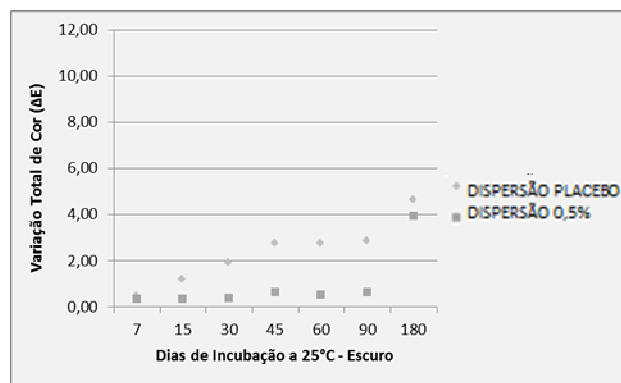
As amostras com 0,5% de bromelina apresentaram menor variação total da cor, em relação às demais concentrações de bromelina, na temperatura de 5°C e 25°C ao abrigo da luz.

Amostras com 1,0% de bromelina mostraram comportamento semelhante em todas as condições, com aumento gradual e contínuo de ΔE ao longo das avaliações. A temperatura teve influência na intensidade da variação de cor, visto que, na condição de 5°C, os valores de ΔE variaram de aproximadamente 3,00 a 15,00 ao passo que nas temperaturas de 25°C, a variação se estendeu na faixa de 5,00 a valores próximos a 20,00 e a 45°C, os valores já partiram de 10,00 e superaram 20,00 ao término do estudo.

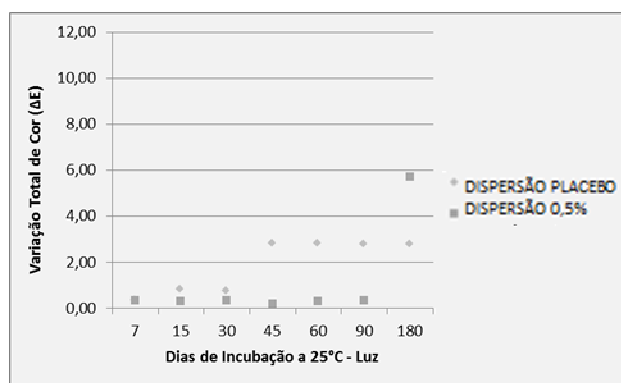
As amostras com 2,0% de bromelina apresentaram variação semelhante a das amostras com 1,0% nas temperaturas de 5°C, e 25°C, com e sem exposição à luz.



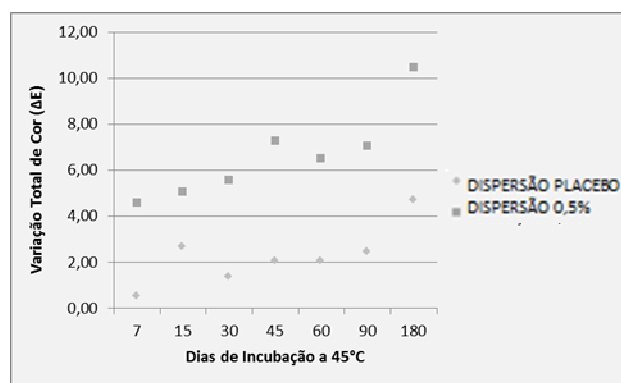
A



B



C



D

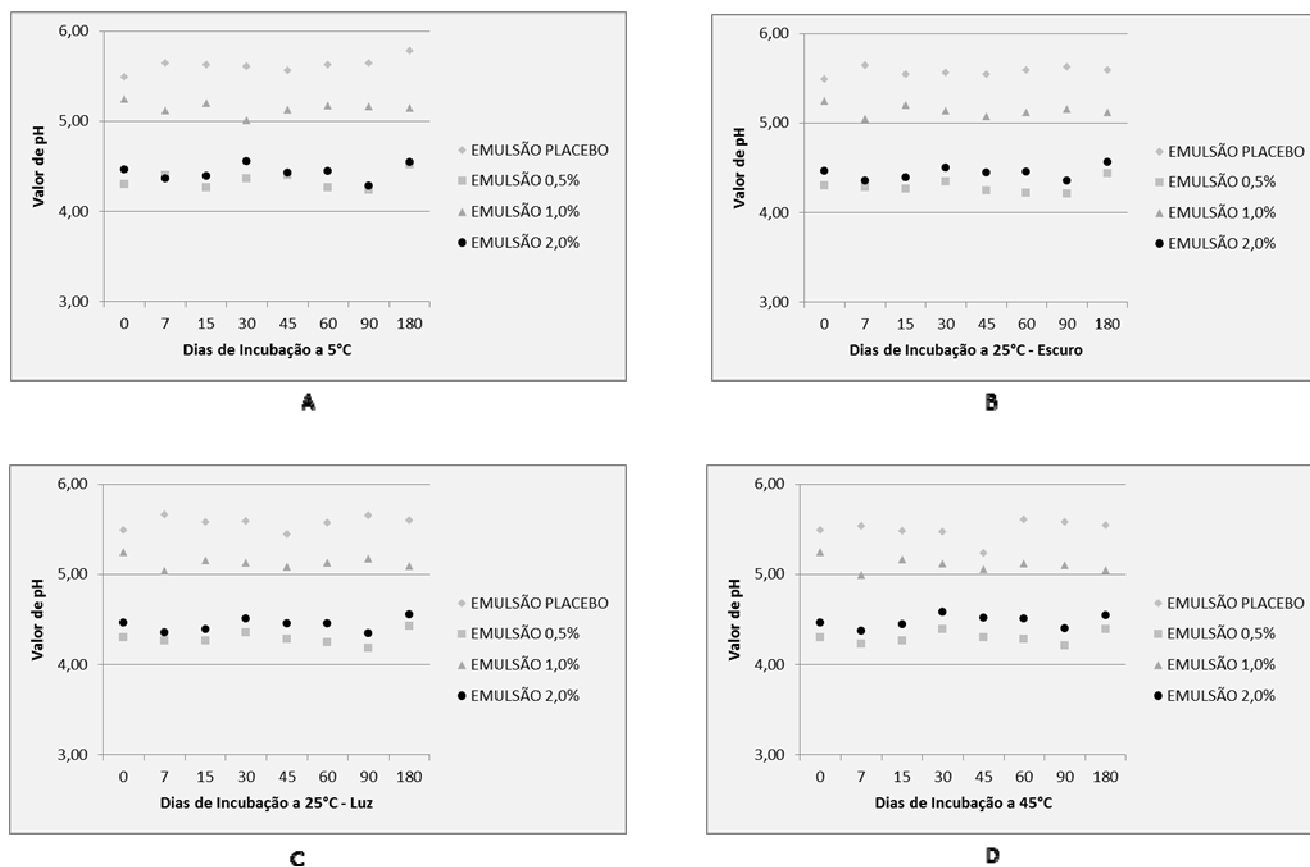
Figura 6. Variação total da cor para as dispersões, em função do tempo de armazenamento.

Para as dispersões aquosas, os valores de ΔE observados permaneceram abaixo de 2,00 para as amostras armazenadas em 5°C, superando este valor apenas após 90 dias de avaliações.

Quanto maior foi a temperatura de acondicionamento, maiores foram os valores observados para ΔE . As amostras incubadas a 45°C apresentaram a maior variação total de cor, com valores acima de 10,00 para a dispersão com 0,5% de bromelina.

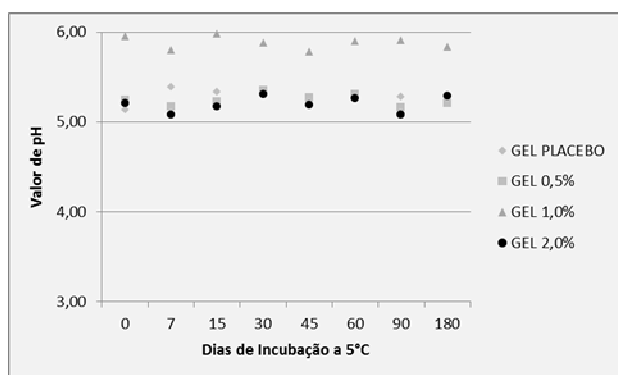
5.3.3. VALOR DE pH A 25°C

Os resultados encontrados para as emulsões, géis e dispersões estão expressos respectivamente nas figuras 7, 8 e 9.

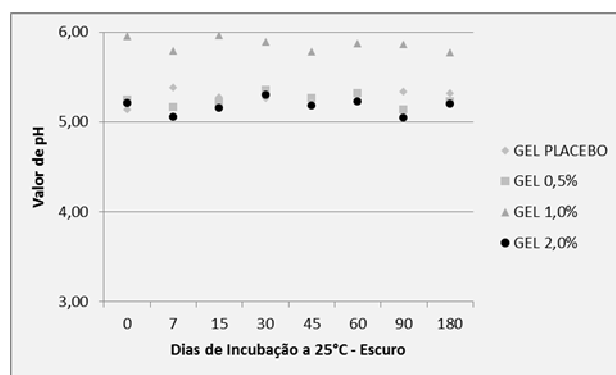


.Figura 7. Variação do valor de pH para emulsões, em função do tempo de armazenamento.

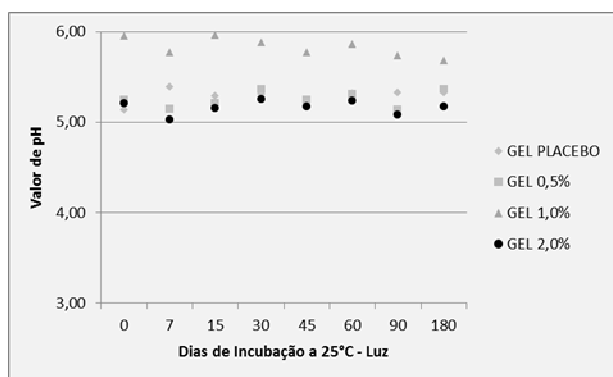
O valor de pH a 25°C se manteve aproximadamente constante durante todo o tempo de estudo. Pequenas variações foram observadas, mas, de forma geral, as diferentes temperaturas e condições de luminosidade não influenciaram de modo relevante este parâmetro nas amostras.



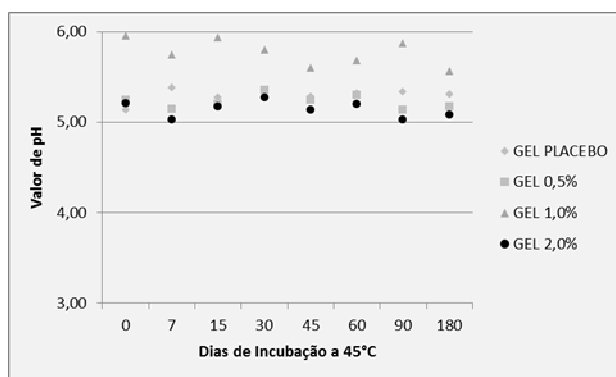
A



B



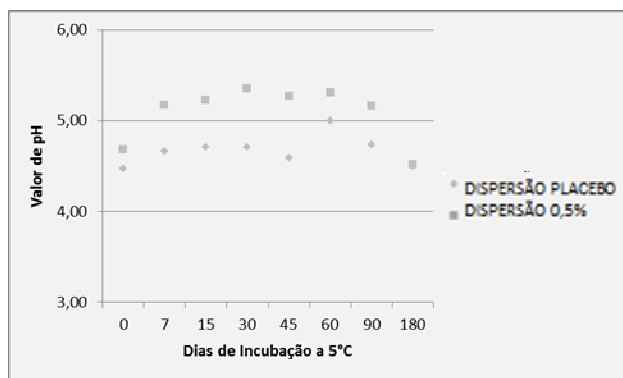
C



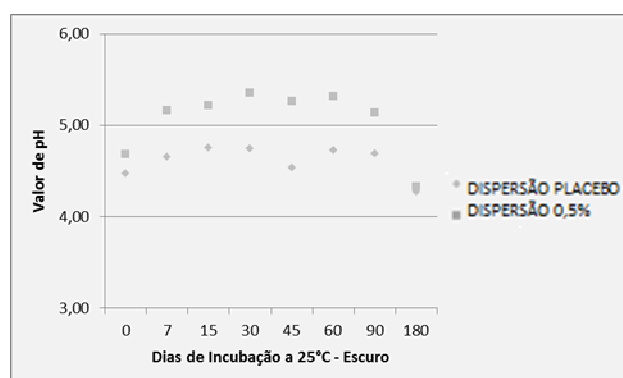
D

Figura 8. Variação do valor de pH para os géis, em função do tempo de armazenamento.

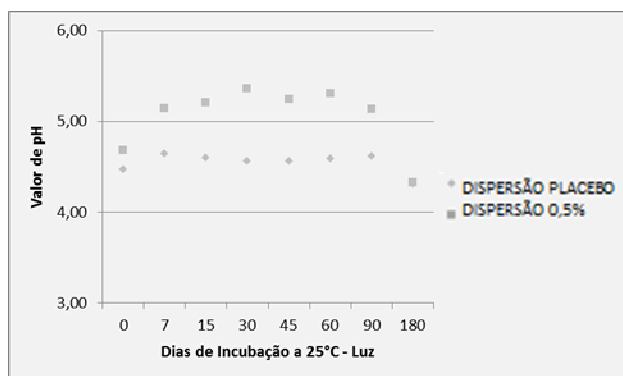
Os valores de pH dos géis permaneceram estáveis durante todo o estudo, para todas as condições.



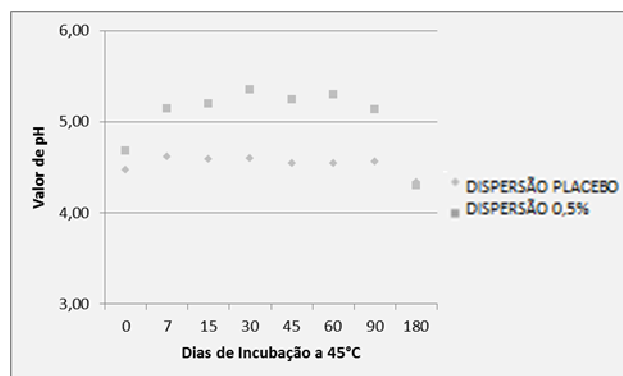
A



B



C



D

Figura 9. Variação do valor de pH para as dispersões, em função do tempo de armazenamento.

Todas as amostras apresentaram valores de pH na faixa de 4,5 a 5,5 ao longo de 180 dias de estocagem.

5.3.4. VISCOSIDADE A 25°C

Os resultados encontrados para as emulsões e géis estão expressos respectivamente nas tabelas 12 e 13..

Tabela 12. Variação da viscosidade para emulsões, no início do estudo e após 180 dias de incubação.

DIAS DE ANÁLISE	EMULSÃO PLACEBO		EMULSÃO 0,5%		EMULSÃO 1,0%		EMULSÃO 2,0%	
	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)
5°C								
0	923	59,10	1443	52,67	864	55,30	2123	42,47
180	989	63,30	1170	37,37	715	45,77	489	31,37
25°C escuro								
0	923	59,10	1443	52,67	864	55,30	2123	42,47
180	1071	68,57	1210	38,70	737	47,20	448	28,70
25°C luz								
0	923	59,10	1443	52,67	864	55,30	2123	42,47
180	1074	68,77	1149	36,93	804	51,50	506	32,43
45°C								
0	923	59,10	1443	52,67	864	55,30	2123	42,47
180	1007	68,77	1620	51,97	1143	73,27	634	40,60

As amostras placebo, sem bromelina, apresentaram comportamento semelhante quanto às variações de viscosidade nas quatro condições estudadas.

As amostras com 0,5% de bromelina sofreram maior variação quando comparadas às amostras placebo nas quatro condições. Observou-se aumento na viscosidade final para a amostra armazenada a 45°C.

Para as amostras com 1,0% de bromelina, o comportamento da viscosidade manteve um padrão nas condições estudadas, com poucas variações. Nas temperaturas de 25°C, com e sem exposição à luz, valores de viscosidade após 180 dias de estudo foram próximos aos iniciais. Para a temperatura de 45°C, a viscosidade final foi maior que a inicial. As amostras com 2,0% de bromelina apresentaram maior variação permanente da viscosidade.

Tabela 13. Variação da viscosidade para os géis, no início do estudo e após 180 dias de incubação.

DIAS DE ANÁLISE	GEL PLACEBO		GEL 0,5%		GEL 1,0%		GEL 2,0%	
	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)	Média V x 10 ³ (cP)	Média T (%)
5°C								
0	805	51,53	717	54,37	266	42,50	1495	34,93
180	594	38,00	519	33,23	292	46,77	489	31,37
25°C escuro								
0	805	51,53	717	54,37	266	42,50	1495	34,93
180	897	57,50	683	43,73	277	44,43	448	28,70
25°C luz								
0	805	51,53	717	54,37	266	42,50	1495	34,93
180	707	45,27	719	46,07	346	55,43	780	45,77
45°C								
0	805	51,53	717	54,37	266	42,50	1495	34,93
180	994	63,57	877	56,17	492	78,67	888	28,50

As amostras com 0,5% e 1,0% de bromelina e as placebo apresentaram viscosidade inicial menor do que as amostras com 2,0%.

Para os géis com 0,5% de bromelina, apenas as amostras sob 45°C apresentaram ganho de viscosidade ao final de 180 dias, que pode ser devido à perda de solvente por evaporação. As amostras nas demais condições apresentaram leve perda de viscosidade ao término das avaliações.

As amostras com 1,0% de bromelina apresentaram valores de viscosidade inicial inferiores aos observados para as outras amostras de gel.

Foi observada acentuada queda na viscosidade das amostras com 2,0% de bromelina, que permaneceu com valores reduzidos até o final das avaliações.

5.3.5. REOLOGIA A 25°C

Os resultados encontrados para as emulsões e géis estão expressos respectivamente nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Valor de recuperação de viscosidade após cisalhamento para emulsões.

DIAS DE ANÁLISE	EMULSÃO PLACEBO	EMULSÃO 0,5%	EMULSÃO 1,0%	EMULSÃO 2,0%
	%recup.	%recup.	%recup.	%recup.
5°C				
0	51,96	53,76	65,24	77,22
180	41,41	60,76	66,72	71,73
25°C - escuro				
0	51,96	53,76	65,24	77,22
180	54,01	61,09	63,02	73,64
25°C - luz				
0	51,96	53,76	65,24	77,22
180	52,90	56,73	57,69	72,30
45°C				
0	51,96	53,76	65,24	77,22
180	40,56	63,50	57,69	63,43

As amostras placebo mostraram recuperação de viscosidade variando entre 40% e 55%, após 180 dias. Embora variações tenham sido observadas ao longo do estudo, a percentagem de recuperação da viscosidade ao término das avaliações foi semelhante aos valores de recuperação no início do estudo.

As amostras com 0,5% de bromelina apresentam pequena variação da percentagem de recuperação da viscosidade em todas as condições. A percentagem de recuperação para esta concentração de bromelina esteve ao redor de 60%.

Para as emulsões com 1,0% de bromelina, as amostras armazenadas em 25°C com exposição à luz e 45°C apresentaram menor manutenção da viscosidade após cisalhamento.

As amostras com 2,0% de bromelina apresentaram pouca variação da percentagem de recuperação da viscosidade ao longo dos 180 dias de avaliações. As amostras armazenadas a 45°C mostraram uma queda mais acentuada.

Tabela 15. Valor de recuperação de viscosidade após cisalhamento para os géis.

DIAS DE ANÁLISE	GEL PLACEBO	GEL 0,5%	GEL 1,0%	GEL 2,0%
	%recup.	%recup.	%recup.	%recup.
5°C				
0	99,46	98,23	99,46	86,87
180	93,82	99,51	98,85	91,35
25°C - escuro				
0	99,46	98,23	99,46	86,87
180	95,34	97,78	97,70	90,85
25°C - luz				
0	99,46	98,23	99,46	86,87
180	94,64	96,91	96,49	89,75
45°C				
0	99,46	98,23	99,46	86,87
180	95,92	93,57	87,57	77,95

As análises de reologia mostraram que as amostras de gel apresentaram recuperação da viscosidade após cisalhamento superior a 85% para todas as condições, exceto amostras com 2,0% a 45°C.

Na condição de 5°C, todas as concentrações de bromelina estudadas apresentaram comportamento semelhante, mantendo a taxa de recuperação acima dos 90%. O mesmo foi observado nas condições de 25°C ao abrigo da luz.

Na condição sob luz, a amostra com 2,0% de bromelina mostrou recuperação no limite dos 90%, evidenciando queda em relação às condições anteriores. Na temperatura de 45°C, observou-se uma acentuada queda na porcentagem de recuperação para esta amostra, cujos valores finais ficaram abaixo de 80%.

5.3.6. ATIVIDADE ESPECÍFICA

Os resultados encontrados para as emulsões, géis e dispersões estão expressos respectivamente nas figuras 10, 11 e 12..

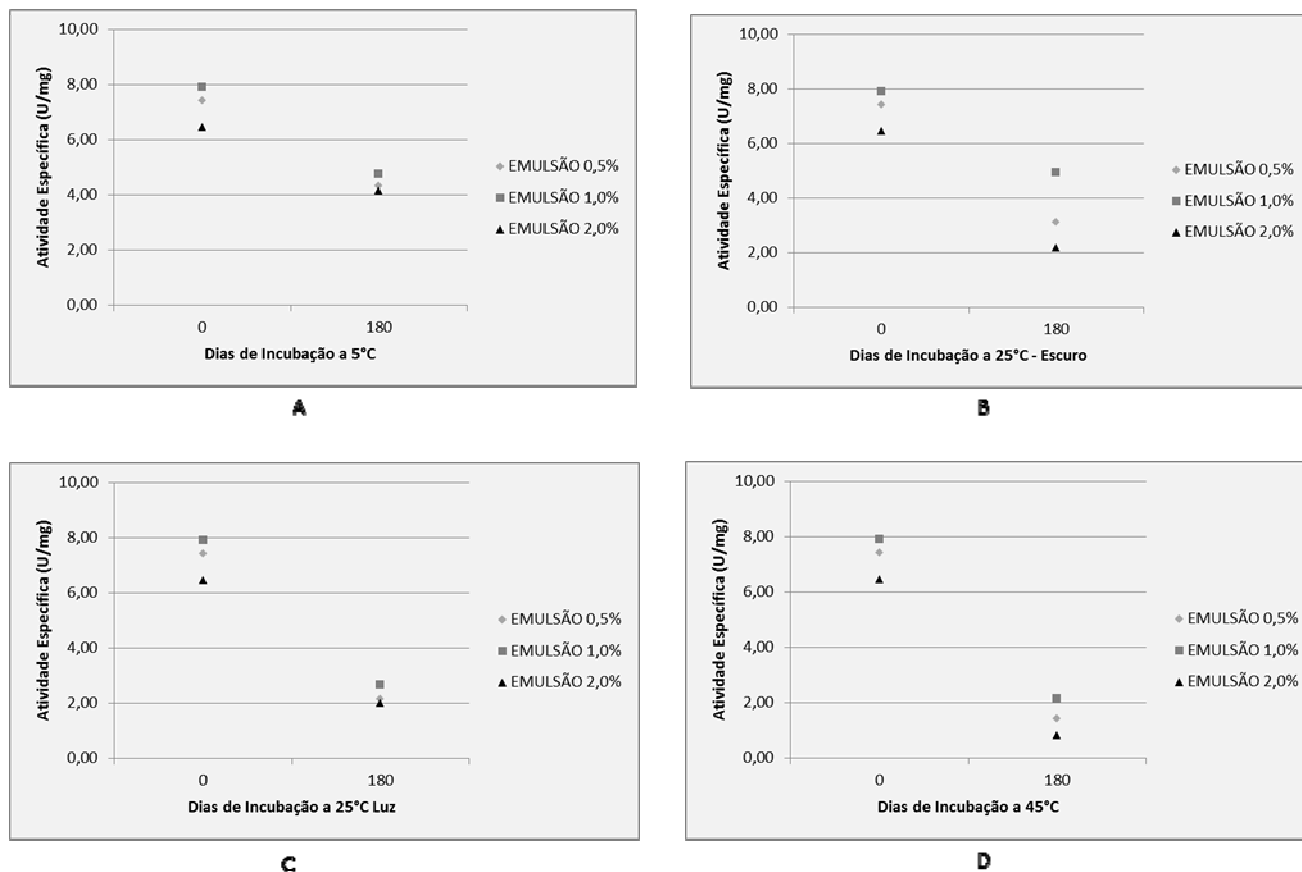


Figura 10. Variação da atividade específica da bromelina para as emulsões, no início do estudo e após 180 dias de incubação.

As amostras placebo apresentaram valores de concentração de proteínas totais inferiores a 1,0mg/mL. Foi observada queda nos valores de atividade específica para todas as condições de armazenamento e concentrações estudadas após 180 dias. As amostras sob condição de 5°C, apresentaram menor variação. A perda de atividade específica foi maior quanto maior foi a temperatura de acondicionamento, chegando a valores próximos de zero na condição de 45°C para todas as concentrações.

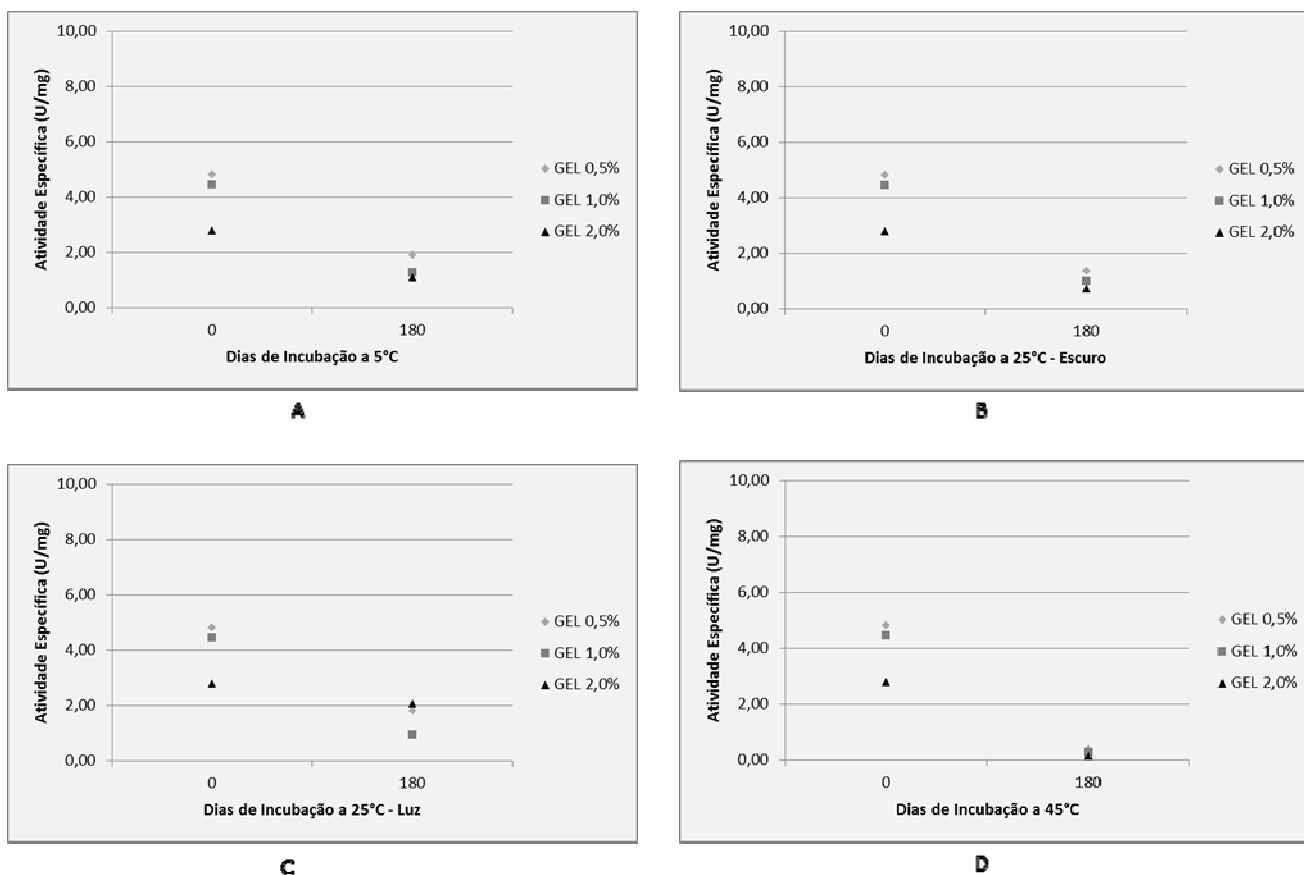


Figura 11. Variação da atividade específica da bromelina para os géis, no início do estudo e após 180 dias de incubação.

6.

As amostras placebo de gel apresentaram valores de concentração total de proteína abaixo de 1,0mg/mL.

Houve expressiva redução da atividade específica das amostras de gel em todas as condições de estudo, para todas as concentrações. A condição de armazenamento sob 45°C mostrou amostras com os menores valores de atividade específica para os géis.

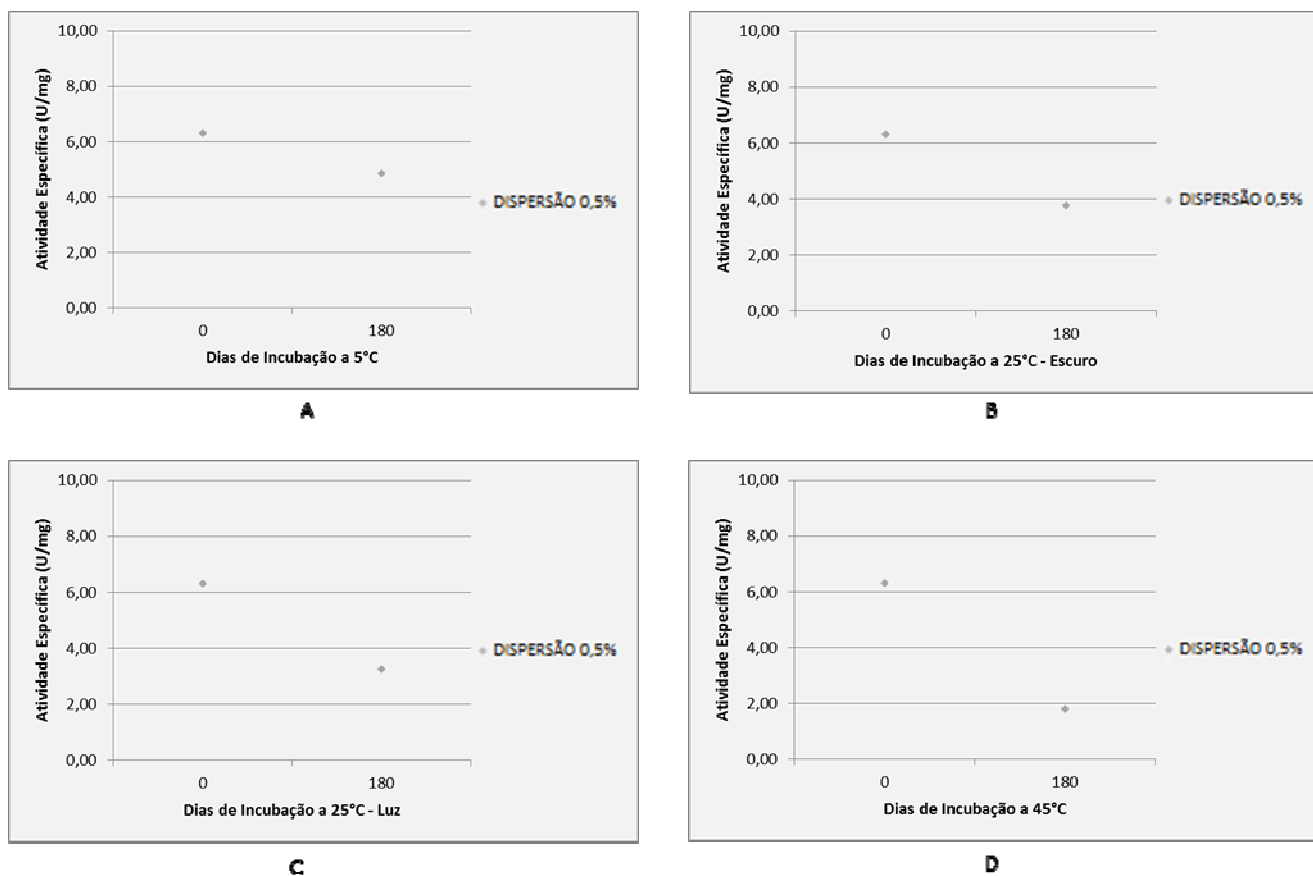


Figura 12. Variação da atividade específica da bromelina para a dispersão 0,5%, em função do tempo de armazenamento.

As amostras placebo, igualmente às tratadas anteriormente, apresentaram valores de concentração de proteínas inferiores a 1,0mg/mL.

Para as amostras com 0,5% de bromelina, as condições sob luz e em 45°C apresentaram menor manutenção de atividade específica.

6. DISCUSSÃO

O uso de enzimas em cosméticos faz parte da rotina das indústrias do ramo. Por esta razão, grande parte do conhecimento disponível sobre o assunto está no domínio destas instituições e pouco disponível em bases de dados científicos. Assim, a discussão que segue sobre os dados gerados neste trabalho traz poucas citações de outros estudos. Portanto, o conhecimento gerado na produção deste estudo tem por perspectiva contribuir com o aumento das informações disponíveis sobre a aplicação de enzimas em bases cosméticas para futuros desenvolvimentos científicos que venham a se dedicar a este campo.

As análises de centrifugação foram realizadas com a finalidade de se observar separação de fases ou formação de precipitados indesejados nas formulações em estudo. Para as amostras de emulsões e géis, até os 30 dias de estudo, não foram observadas separação de fases nem formação de precipitados após análise. Este fato foi interpretado como positivo na avaliação da estabilidade prévia destas amostras. As amostras placebo de dispersão aquosa não apresentaram qualquer alteração, assim como as amostras com 0,5% de bromelina. Para as amostras com 1,0% e 2,0%, houve precipitação da bromelina. Parte da enzima permaneceu solubilizada. Isto se deveu às concentrações aumentadas em relação às amostras com 0,5% de enzima. Por isso, essas amostras foram retiradas do estudo.

No mercado cosmético, algumas características são fundamentais para que o consumidor opte por adquiri-lo. A cor dos produtos é um dos parâmetros mais importantes a ser analisado. Ela exerce grande influência neste momento porque na grande maioria dos casos aparece associada à fragrância utilizada, ao ativo e até mesmo ao benefício prometido, além de estar associado à condição da qualidade do produto.

Nas indústrias cosméticas, é comum que se avalie cor de produtos de maneira subjetiva. Em geral, os pesquisadores responsáveis por estas avaliações são selecionados mediante teste de acuidade visual, realizado com auxílio de uma paleta de cores, em que se procura verificar se o avaliado é capaz de perceber pequenas diferenças entre tons. Trata-se de um método eficaz, porém, sujeito a uma série de variações que podem reduzir a eficiência das avaliações. Pelo método objetivo utilizado neste estudo, pequenas modificações podem ser quantificadas e analisadas quanto ao seu impacto para a qualidade e aceitação do produto.

Neste método, após 7 dias, amostras de todas as formas farmacêuticas já apresentaram variações de cor, com valores de ΔE , diferentes de zero.

Após 180 dias, observou-se para as emulsões placebo alteração de cor dentro do limite de ΔE igual a 2,0. O fato de as demais amostras terem apresentado valores estatisticamente diferentes e bem superiores aos encontrados para essas emulsões indica que a presença da enzima exerceu influência positiva na variação da cor destas amostras. Esta influência, por sua vez, foi dependente da temperatura. As amostras sob condição de 5°C

sofreram menor variação de cor ao longo do estudo e o contrário foi percebido para as amostras acondicionadas a 45°C. Apenas as amostras com maior concentração de enzima apresentaram uma variação aumentada no fim das avaliações em temperatura baixa. As emulsões com 0,5% de bromelina apresentaram-se com perfil de variação mais próximo as placebo. As emulsões com 1,0% e 2,0% de bromelina exibiram maior variação. Os maiores valores de ΔE encontrados para as emulsões foram aproximadamente de 11,00, associado às amostras com 2,0% de bromelina armazenadas em 45°C. Este valor foi estatisticamente diferente dos resultados obtidos para as amostras com menor concentração, estocadas sob mesma temperatura.

Os géis foram mais susceptíveis às variações. Os valores de ΔE destas amostras ultrapassaram os valores encontrados para as emulsões, após 180 dias. Amostras de gel placebo, sem bromelina, apresentaram grande variação de cor, com ΔE acima de 15,00 em todas as temperaturas. Das formulações placebo estudadas, as de gel apresentaram a maior variação de cor, estatisticamente distinta da variação obtida para as emulsões e dispersões sem bromelina. Entre as amostras de gel com bromelina, se observou aumento de ΔE dependente da concentração de enzima incorporada e da temperatura. As amostras incubadas a 45°C apresentaram variações muito elevadas, com valores máximos de ΔE de quase 40,00.

Para as dispersões aquosas, a variação, ao contrário dos géis, foi menos expressiva. Nas condições a 25°C, apenas após 45 dias de estudo observou-se ΔE maior que 2,00 para a amostra com bromelina. Para a amostra com 0,5% de bromelina, as variações também foram dependentes da temperatura de exposição, pois na condição de 45°C, as variações foram estatisticamente maiores que as obtidas para a amostra placebo.

A condição de exposição à luz não afetou a variação de cor para as amostras com bromelina. Observou-se no estudo que o perfil de variação da cor para as três formas farmacêuticas estudadas foi muito semelhante na condição com e sem luz, para todas as concentrações de bromelina. Este fato chama a atenção, visto que a enzima é comercializada em frasco âmbar devido a sua sensibilidade à luminosidade. Neste caso, a estrutura das formulações parece ter contribuído para a proteção da bromelina frente à luz.

Alterações nos valores de pH das formulações podem indicar alterações da qualidade, eficácia e segurança dos produtos. Essas alterações podem resultar em modificações de cor, viscosidade e atividade enzimática das amostras.

Neste estudo, cada forma farmacêutica selecionada forneceu um ambiente de valor de pH específico para a bromelina. As emulsões apresentaram valores de pH em torno de 5,0 durante todo o estudo. A emulsão placebo apresentou valor de pH um pouco mais elevado, devido justamente à ausência de bromelina, que contribui para a redução deste valor. As amostras com bromelina apresentaram valores de pH inferiores, na faixa de 4,5 a 5,5.

A temperatura e a exposição à luz não tiveram influência direta nas variações de valores de pH observadas para estas amostras. Não foi verificada nenhuma alteração dependente de temperatura ou da luminosidade em

180 dias para as emulsões. Os valores de pH encontrados para as amostras nas condições ao abrigo da luz foi muito semelhante ao encontrado para as amostras sob luz.

As diferenças observadas entre os valores de pH das amostras com 0,5%, 1,0% e 2,0% de bromelina podem estar associadas a variações nos processos que as geraram, podendo ter havido homogeneização insatisfatória de corretores de pH.

Os géis apresentaram variação de valores de pH dentro da faixa de 5,0 a 6,0, um pouco mais elevado do que os valores de pH das emulsões. Os valores mais elevados de pH para as amostras com 1,0% de enzima podem se dever ao processo de sua obtenção, no qual trietanolamina 99W, de caráter básico, foi adicionada ao término da preparação para permitir formação do gel. No processo, a trietanolamina 99W pode não ter sido homogeneizada satisfatoriamente, gerando elevação do pH para estas formulações.

No caso das dispersões aquosas, os valores de pH das amostras mantiveram-se estáveis durante os 180 dias de estudo. Não houve diferença estatística entre os valores obtidos para as amostras placebo a as amostras com 0,5% de bromelina. O fato pode se dever à baixa concentração de bromelina incorporada, que se comportou como um acidificante fraco.

A importância de avaliações de viscosidade para amostras pouco fluidas está associada, entre outros fatores, à qualidade da dispersão de ativos e da estruturação das fórmulas, que em geral levam entre seus componentes polímeros que conferem aumento da resistência ao movimento. Neste contexto, as análises de viscosidade foram dispensadas para o estudo das dispersões aquosas, bem como o estudo da reologia, que leva em consideração a medida da viscosidade na expressão do comportamento frente ao cisalhamento.

As emulsões apresentaram viscosidade inicial em faixas distintas de acordo com as concentrações de bromelina presentes, o que já sugere que a bromelina exerce influência na estrutura das fórmulas, alterando a viscosidade ao final do processo de preparo. A adição de 0,5% de bromelina provocou um aumento na faixa inicial de viscosidade da ordem de 40%. Seguindo o mesmo comportamento, a emulsão com 2,0% de bromelina apresentou acentuado aumento na viscosidade, da ordem de 130%. Embora tenham sido observadas variações na viscosidade das emulsões ao longo dos 180 dias de estudo, os valores finais não se distanciaram muito dos iniciais, exceto para as amostras com 2,0%, em todas as condições. Após incubação em 5°C e 25°C, houve queda na viscosidade das emulsões com 0,5% e 1,0%, ao redor de 18%. Em 45°C, as emulsões com 2,0% de enzima apresentaram redução da ordem de 75% na viscosidade final em relação à inicial.

A luminosidade parece não ter influenciado as variações observadas, porque não houve comportamento que permita relacionar as alterações de viscosidade com a exposição à luz.

É sabido que a temperatura exerce influência na viscosidade das formulações em geral. Contudo, neste estudo, apenas as amostras com 2,0% de bromelina sofreram variação relevante ao término dos 180 dias de

ensaios. A atividade proteolítica da bromelina pode ter atuado de forma mais intensa na estrutura desta fórmula, gerando a clivagem de agentes de consistência, com ligações semelhantes aos seus sítios de atuação.

No caso dos géis, os valores de viscosidade estiveram abaixo dos observados para as emulsões. As amostras com 2,0% de bromelina apresentaram maior perda de viscosidade quando comparadas às outras amostras de gel. Porém, em comparação com as amostras de emulsão com 2,0%, esta perda foi menor.

O Carbopol® 980 é o polímero responsável por conferir viscosidade à formulação. Este componente deve ser disperso em água, sob vigorosa agitação. Trata-se de uma estrutura enovelada com caráter ácido. A adição final de um componente básico provoca sua neutralização e consequente expansão de sua estrutura molecular, o que confere viscosidade à fórmula, formando um gel. Neste cenário, o valor de pH está diretamente associado à viscosidade de géis. O valor de pH da formulação com 1,0% de bromelina se apresentou distinto das demais amostras assim como a viscosidade. O que se esperava era que a viscosidade destas amostras fosse maior. Questões relacionadas ao processo de obtenção destas amostras podem estar associadas com as diferenças observadas.

Para as emulsões, o comportamento reológico em todas as concentrações foi semelhante. As amostras placebo apresentaram os menores valores de recuperação da viscosidade após cisalhamento. Este perfil reológico se manteve em todas as condições ao longo do estudo. A porcentagem de recuperação esteve ao redor de 50%. Com a adição de 0,5% de bromelina, verificou-se um aumento que acompanhou as amostras em todas as condições e tempos de análise. A recuperação atingiu os 60% para estas emulsões. O aumento da concentração de bromelina contribuiu para a elevação dos níveis de recuperação de viscosidade após cisalhamento nas emulsões com 1,0% e 2,0% em todas as temperaturas estudadas. Os valores finais de recuperação de viscosidade para as amostras com 2,0% de bromelina chegaram a 80% na condição de 5°C.

O comportamento reológico das amostras, mantido relativamente constante ao longo do tempo, mostrou que a temperatura exerce pouca influência na capacidade de retorno ao estado viscoso inicial após tensão. Igualmente, não foi possível estabelecer relação entre o ganho observado e a exposição à luz.

Para os géis, os valores de recuperação da viscosidade após cisalhamento foram maiores do que os encontrados para as emulsões. Amostras do gel placebo exibiram recuperação da ordem de 95% e foram seguidas pelas demais, em todos os tempos de avaliação, nas condições de 5°C e 25°C, com e sem exposição à luz. Na condição de 45°C, no entanto, a manutenção do comportamento reológico para os géis foi comprometida. As amostras placebo e com 0,5% de bromelina apresentaram maior manutenção dos altos índices de recuperação. O mesmo não aconteceu com as concentrações de 1,0% e, sobretudo, 2,0%, para as quais, as variações de comportamento reológico foram mais acentuadas. As amostras com 1,0% aproximaram-se dos 90% de recuperação, mas as com 2,0% sofreram expressiva perda na capacidade de retornar à viscosidade antes do cisalhamento, chegando a valores de recuperação abaixo dos 80%.

Para estas amostras, a temperatura parece ter sido a responsável pelas alterações observadas na condição de 45°C. A presença da bromelina não demonstrou ter contribuído de forma relevante para a melhora nos parâmetros reológicos destas formulações, como verificado para as emulsões. Não foi possível estabelecer relação entre o comportamento reológico das amostras de gel e a exposição à luz, já que não foram observadas diferenças importantes na presença e ausência de luminosidade.

A presença do ativo em formulações cosméticas é crítica, pois interfere na eficácia e, por consequência, na segurança do produto. Por conta de seu caráter não medicamentoso, as concentrações de ativos em cosméticos geralmente são baixas porque não é desejável que haja absorção sistêmica. O estudo de estabilidade tem a função de acompanhar o comportamento do ativo durante o processo de fabricação do produto, seu armazenamento e transporte para que ele chegue até o consumidor final em condições de executar o benefício pretendido.

BALLS e colaboradores (1941) apresentaram em seus estudos que a bromelina apresenta notável estabilidade frente a temperaturas acima de 40°C, chegando até 60°C e sua atividade ótima é evidenciada em temperaturas ao redor de 30°C (KHAN *et al*, 2003).

Os estudos sobre a estabilidade da bromelina encontrados na literatura mostram que a resistência da enzima ao calor é verificada dentro de um período de tempo relativamente curto. De fato, quanto maior foi o tempo de exposição da enzima ao calor, num máximo de 180 minutos, nos estudos de ANWAR e colaboradores (2007), menor foi a atividade proteolítica, chegando a ser reduzida a zero quando exposta por este tempo a 60°C.

Os dados apresentados neste estudo vão ao encontro destas afirmações. Foi observada para as formulações estudadas a redução significativa do teor de proteínas quanto maior foi a temperatura de exposição. A mesma relação foi verificada para a atividade enzimática, que foi diminuída a valores próximos de zero após 180 dias de exposição contínua a 45°C. A exposição à luz também foi estudada e pareceu ser importante na perda da capacidade de clivagem proteica da bromelina.

Para as emulsões e dispersões aquosas, os valores de atividade específica foram mais preservados nas condições de baixa temperatura e ao abrigo da luz. Os géis apresentaram valores iniciais de atividade específica já inferiores aos observados para as demais formas farmacêuticas e, após 180 dias, exibiram valores de atividade específica semelhantes em todas as condições.

Era esperado que a bromelina perdesse mais atividade com a exposição prolongada a altas temperaturas, devido à degradação térmica e maior perda de atividade proteolítica, do que amostras acondicionadas em temperaturas mais baixas. Porém, a redução a valores tão próximos a zero, como no caso dos géis, chamou a atenção.

O gel é uma base translúcida, que está mais propensa às influências da luz. Porém, as amostras armazenadas ao abrigo da luminosidade foram afetadas da mesma maneira. Este fato sugere que pode ter havido

interações entre os componentes da formulação do gel e a enzima incorporada, já que apenas o gel apresentou perdas tão expressivas de atividade enzimática. Embora as emulsões também contem com muitos componentes em sua fórmula, elas demonstraram estar sofrendo menor interação entre os ingredientes e, portanto, estar mais estáveis na presença da bromelina.

A atividade enzimática e o conteúdo proteico foram significativamente reduzidos ao longo dos 6 meses de estudo para todas as bases, o que demonstra a dificuldade de disponibilizar um produto cosmético com veiculação de enzimas.

É provável que a perda de atividade aumente até valores próximos a zero para as amostras de emulsão e dispersão aquosa após os 6 primeiros meses de fabricação. Maiores investigações seriam necessárias para esta afirmação.

Neste estudo, o gel demonstrou ser a pior base para veiculação da bromelina com finalidade cosmética, pois apresentou a menor manutenção das características iniciais tanto relacionadas à formulação quanto em relação à integridade da bromelina.

As dispersões e as emulsões apresentaram-se mais estáveis ao longo de 180 dias de avaliações, mas em altas temperaturas, essas formulações também sofrem importantes alterações em seus parâmetros físico-químicos.

A condição de estocagem a 5°C demonstrou ser a mais adequada para preservação das características iniciais das emulsões e dispersões. Embora tenha sido evidenciada pouca influência da luz sobre estas formulações, sabe-se que ela pode provocar a quebra de ligações químicas e gerar radicais que aceleram a degradação do produto, alterando características monitoradas neste trabalho. Assim, faz-se necessária a proteção de formulações cosméticas contra luminosidade.

Alternativas como o encapsulamento de matérias-primas e ativos instáveis podem ser empregadas para estabilização destes componentes e viabilização de sua incorporação em formulações cosméticas, minimizando as alterações observadas. Mais estudos devem ser conduzidos nesta área.

Mesmo veiculada em bases que contribuem para a manutenção de suas características, a incorporação de bromelina em formulações cosméticas exige atenção. O processo de fabricação deve ser planejado de modo a evitar exposição da enzima a altas temperaturas e a grandes forças de cisalhamento. Corantes podem ajudar a mascarar as alterações de cor observadas. A recomendação para armazenamento em baixas temperaturas e ao abrigo da luz pode ser decisiva para o aumento da vida útil da enzima incorporada e, por consequência, para a manutenção da eficácia e segurança dos produtos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados gerados neste trabalho permitiram concluir que:

- A variação de cor em formulações cosméticas com incorporação de bromelina é dependente do tipo de base empregada, da concentração de enzima e da temperatura de acondicionamento. A exposição à luz não afetou de forma relevante a cor das amostras estudadas.
- A presença de bromelina reduziu o valor de pH de formulações cosméticas, conforme esperado, por sua característica ácida. A temperatura e a luminosidade não tiveram influência relevante no valor de pH das amostras estudadas.
- Para as emulsões, quanto maior a concentração de bromelina, maior foi a perda de viscosidade ao longo de 6 meses de estudo em todas as condições avaliadas. A bromelina exerceu menos influência na viscosidade dos géis. A luminosidade não exerceu relevante influência na viscosidade das amostras.
- A bromelina colaborou para o aumento da capacidade de recuperação de viscosidade após cisalhamento para as emulsões. Porém, não exerceu influência relevante para os géis.
- Entre as três formas farmacêuticas estudadas, os géis apresentaram maior perda de conteúdo proteico, atividade enzimática e, conseqüentemente, atividade específica. A temperatura e a luminosidade foram importantes para a perda do conteúdo proteico e da atividade enzimática para todas as formas farmacêuticas e concentrações estudadas.
- O gel demonstrou ser a pior base para incorporação da bromelina, em todas as concentrações estudadas. Para as demais formas farmacêuticas, quanto maior a concentração de bromelina, maior a susceptibilidade a alterações físico-químicas. Portanto, menores concentrações de ativo contribuem para maior estabilidade.
- As emulsões e as dispersões aquosas apresentaram maior estabilidade, porém, necessitam ser armazenadas em baixas temperaturas e ao abrigo da luz para a manutenção das características iniciais e, por consequência, aumento da vida útil dos produtos comercializados nestas apresentações.

8. REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P.A., Partition of cell particles and macromolecules, John Wiley, 3ª edição, 1986.
- ASTM, INTERNATIONAL STANDARDS ON COLOR AND APPEARANCE MEASUREMENT, 8ª edição, ASTM International, Pensilvânia, EUA, 2008.
- BALLS, A. K., THOMPSON, R. R., KIES, M. W. Bromelain. Properties and Commercial Production; Ind. Eng. Chem., 33 (7), 950-953, 1941.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS, Série Qualidade em Cosméticos, Gerência Geral de Cosméticos, vol. 1, Brasília, 2004.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE, REDISPERSÃO - RE nº 1, de 29 de julho de 2005.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A Colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, J Biol Chem, 501-5, 1947.
- DEVAKATE, R. V., PATIL, V. V., WAJE, S. S., THORAT, B. N. Purification and drying of bromelain; Separation and Purification Technology 64, 259–264, 2009.
- DOKO, M. B., BASSANI, V., CASADEBAIG, J., CAVAILLES, L., JACOB, M. Preparation of proteolytic enzyme extracts from Ananas comosus L., Merr. fruit juice using semipermeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-drying processes; International Journal of Pharmaceutics, 76, 199-206, 1991.
- FERREIRA, JULIANA FERRARI. Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas peg/fosfato. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 41p., Dissertação (Mestrado).
- FORGATY, W.M. & KELLY, C.T. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. v.3, Chichester, G, Howood-J. Wiley & Sons, 1979.
- GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010. Mingshuang Milk Whiten Avoid Wash Mask. Disponível em: <
<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>>
- GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010. Nars Skin Essential Oil - Infused Therapy Soak. Disponível em: <
<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>>

GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010. Oriflame DermoProfessional Micro-Dermabrasion Kit. Disponível em: <
<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>>

GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010. Oriflame Skindividual Anti-Ageing Extra Serum. Disponível em: <
<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>>

GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010.

GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010. Plante System Purifit Facial Scrub for Sensitive Skin. Disponível em: <
<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>>

GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010. Sephora Solution Express Pore Minimizing Exfoliating Fluid. Disponível em: <
<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>>

GLOBAL NEW PRODUCTS DATABASE. Cajamar. Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Acesso em: 13/04/2010. Sjal Pearl Enzyme Exfoliating Mask. Disponível em: <
<http://www.gnpd.com/sinatra/gnpd/frontpage/>>

GODOI, P. H. Bromelain enzymatic activity in solutions at different temperatures and pH, UNICAMP, Faculdade de Engenharia Química, 2007.

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

HALPERN, M.J. Bioquímica, 1ª Edição, Editora Lidel, Lisboa, Portugal, 1997, 233-303.

HAMIDI, M., AZADI A., RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery; Advanced Drug Delivery Reviews 60, 1638–1649, 2008.

HARRIS, J. M., YALPANI, M. Polymer-Ligands used in affinity partitioning and their synthesis. in: WALTER, H., BROOKS, D. E., FISHER, D. Partition in aqueous two-phase systems. Orlando: Academic, p. 589-625. 1985.

HATTI-KAUL, R. Aqueous Two-Phase Systems. IN: Methods in Biotechnology, vol. 11: Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols, Edited by: R. Hatti-Kaul, Humana Press Inc., 2000

HENNRICH, N., KLOCKOW, M., LANG, H., BERNDT W. Isolation and properties of bromelin protease; FEBS LETTERS, v 2, nº 5, March 1969

IFSCC, THE FUNDAMENTALS OF STABILITY TESTING, n. 2, 1992.

- JOHANSSON, G. Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems, IN: protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications, second edition. Edited by Jan-Christer Janson & Lars Rydén, Wiley-VCH, 1998.
- JOHANSSON, H. O., ISHII, M., MINAGUTI, M., FEITOSA, E., PENNA, T. C. V., PESSOA JR., A. Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly(acrylate) aqueous two-phase systems; *Separation and Purification Technology* 62:166–174, 2008a.
- JOHANSSON, H. O., MAGALDI, F. M., FEITOSA, E., PESSOA JR., A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems; *Journal of Chromatography A*, 1178 145–153, 2008b.
- KHAN, R. H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S. K.; J. BIOSCI. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain enzymes, 28, 709-714, 2003.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30: 291–310, 1947.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. and COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*, 2ª edição. São Paulo, SP, Savier Editora de Livros Médicos LTDA, 1995.
- MAURER, H. R. Review Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use; *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1234–1245, 2001.
- MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, p. 307-310, 1981.
- MOSS, I. N., FRASIER, C. V., MARTIN, G. J. Bromelains – the pharmacology of the enzymes. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 166-189, 1963.
- RABELO, A. P. B., TAMBOURGI, E. B., PESSOA JR., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers; *Journal of Chromatography B*, 807, 61–68, 2004.
- ROSSI, A. B. R. ; VERGNANINI, A. L. Cellulite: A review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* ,14:251-62, 2000.
- ROWAN, A. D., BUTTLE, D. J., BARRET, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant, *Biochemical Joournal*, v.266, n.3, 869-75, 1990.
- SAID e PIETRO, R., *Enzimas de interesse industrial e Biotecnológico*. Editora Eventos, 2002.
- SALAS, C. E., GOMES, M. T. R., HERNANDEZ, M., LOPES, M. T. P. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity; *Phytochemistry* 69, 2263–2269, 2008.

- SARAVANAN, S., REENA, J. A., RAO, J. R., MURUGESAN, T., NAIR, B. U. Phase Equilibrium Compositions, Densities, and Viscosities of Aqueous Two-Phase Poly(ethylene glycol) + Poly(acrylic acid) System at Various Temperatures; J. Chem. Eng. Data, 51, 1246-1249, 2006.
- SCHRAMM; GEBHARD. Reologia e Reometria, Fundamentos Teóricos e Práticos, 1ª edição, São Paulo, SP, Altliber Editora LTDA, 2006.
- SCOPES, R.K. Protein Purification, Principles and Practices. Springer Verlag. New York. p. 30-36, 1994.
- SILVEIRA, E. SOUZA Jr, M. E., SANTANA, J. C.C, CHAVES, A. C., PORTO, A, L. F., TAMBOURGI, E. B. T. Expanded bed adsorption of bromelain from Ananas comosus crude extract. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 26 (1), 149-157, 2009.
- SRIWATANAPONGSE, A., BALABAN, M., TEIXEIRA, A. Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice. St. Joseph, MI, ETATSUNIS. American Society of Agricultural Engineers, 2000.
- TAUSSIG, S. J., BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (Ananas cosmosus) and its clinical application. An update; J Ethnopharmacology, 22, 191- 203, 1988.
- TERRANOVA F., BERARDESCA E., MAIBACH H. Cellulite: nature and aetiopathogenesis. Int J Cosmet Sci., 28:157-67,2006.
- WALTER, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. Pp. 270–277 in Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 5, H. U. Bergmeyer, ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1984.
- WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2ª edição, edited by Ellis Horwood, New York, EUA, 460 p., 1987.

ANEXO I: TABELAS DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações estatísticas foram realizadas com base nos resultados obtidos para as amostras em estabilidade após 180 dias.

Assim, para cada análise, foram comparados os resultados das amostras com diferentes concentrações, dentro de cada condição de armazenamento. Posteriormente, dentro de cada condição, os resultados das amostras das formas farmacêuticas foram comparados.

A análise estatística foi realizada utilizando-se teste *t* de *Student*, considerando intervalo de confiança de 95%.

A. Resultados de Análise Objetiva de Cor

Tabela 16. Resultados Teste *t* de *Student*, 95% IC, para resultados de análise de cor das amostras após 180 dias de incubação.

AMOSTRAS ARMAZENADAS POR 180 DIAS								
EMULSÕES	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	4,68E-07	SIM	1,07E-22	SIM	3,24E-07	SIM	1,29E-06	SIM
placebo X 1,0%	8,38E-06	SIM	1,98E-06	SIM	2,37E-07	SIM	1,03E-07	SIM
placebo X 2,0%	6,60E-23	SIM	2,34E-23	SIM	1,27E-07	SIM	1,01E-07	SIM
0,5% X 1,0%	5,05E-06	SIM	2,74E-05	SIM	3,33E-05	SIM	5,50E-07	SIM
0,5% X 2,0%	1,16E-05	SIM	1,14E-05	SIM	2,74E-06	SIM	4,75E-06	SIM
1,0% X 2,0%	3,53E-06	SIM	6,18E-06	SIM	5,38E-06	SIM	4,72E-03	SIM
GÉIS	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	5,21E-06	SIM	1,47E-06	SIM	1,37E-04	SIM	1,62E-07	SIM
placebo X 1,0%	1,09E-05	SIM	3,58E-06	SIM	5,78E-04	SIM	4,36E-06	SIM
placebo X 2,0%	7,46E-06	SIM	2,11E-07	SIM	3,31E-06	SIM	2,51E-06	SIM
0,5% X 1,0%	3,77E-05	SIM	1,14E-05	SIM	2,06E-04	SIM	3,07E-07	SIM
0,5% X 2,0%	8,65E-06	SIM	6,82E-07	SIM	1,71E-05	SIM	6,48E-07	SIM
1,0% X 2,0%	1,15E-04	SIM	4,38E-06	SIM	1,02E-06	SIM	2,17E-06	SIM
DISPERSÕES	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	2,26E-22	SIM	2,87E-05	SIM	1,17E-03	SIM	1,02E-06	SIM
PLACEBO	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	9,44E-07	SIM	7,16E-08	SIM	3,58E-08	SIM	1,58E-07	SIM
emul. X dispersão	3,70E-04	SIM	3,71E-06	SIM	4,05E-32	SIM	6,56E-07	SIM
gel X dispersão	4,11E-07	SIM	2,37E-07	SIM	4,30E-08	SIM	1,02E-07	SIM
0,50%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	7,56E-07	SIM	2,23E-07	SIM	1,25E-06	SIM	4,74E-08	SIM
emul. X dispersão	4,16E-05	SIM	3,25E-03	SIM	5,44E-03	SIM	2,84E-06	SIM
gel X dispersão	6,93E-07	SIM	7,58E-08	SIM	6,42E-05	SIM	1,87E-07	SIM
1,00%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	1,16E-06	SIM	7,41E-08	SIM	4,10E-07	SIM	1,07E-07	SIM
2,00%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	2,41E-07	SIM	5,52E-07	SIM	2,23E-07	SIM	1,95E-06	SIM

B. Resultados de Valores de pH a 25°C

Tabela 17. Resultados Teste *t* de Student, 95% IC, para resultados de análise de pH das amostras após 180 dias de incubação.

AMOSTRAS ARMAZENADAS POR 180 DIAS								
EMULSÕES	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM
placebo X 1,0%	3,19E- 02	SIM	1,96E- 04	SIM	4,39E- 05	SIM	1,33E- 04	SIM
placebo X 2,0%	9,67E- 03	SIM	7,38E- 05	SIM	3,08E- 05	SIM	4,47E- 05	SIM
0,5% X 1,0%	1,55E- 02	SIM	5,04E- 04	SIM	9,93E- 04	SIM	1,34E- 03	SIM
0,5% X 2,0%	8,08E- 01	NÃO	1,35E- 02	SIM	3,40E- 02	SIM	1,15E- 02	SIM
1,0% X 2,0%	2,11E- 04	SIM	1,10E- 04	SIM	3,86E- 05	SIM	3,15E- 04	SIM
GÉIS	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	3,46E- 02	SIM	2,76E- 02	SIM	1,73E- 01	NÃO	5,87E- 03	SIM
placebo X 1,0%	1,10E- 04	SIM	1,57E- 04	SIM	3,49E- 04	SIM	1,69E- 04	SIM
placebo X 2,0%	8,43E- 01	NÃO	3,29E- 03	SIM	3,29E- 03	SIM	1,60E- 02	SIM
0,5% X 1,0%	1,09E- 03	SIM	3,16E- 03	SIM	1,30E- 03	SIM	9,65E- 04	SIM
0,5% X 2,0%	1,19E- 01	NÃO	7,59E- 01	NÃO	1,88E- 02	SIM	9,33E- 02	NÃO
1,0% X 2,0%	2,74E- 03	SIM	1,85E- 02	SIM	8,96E- 04	SIM	2,89E- 03	SIM
DISPERSÃO	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	0,58	NÃO	0,06	NÃO	0,32	NÃO	0,10	NÃO
PLACEBO	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	5,76E- 02	NÃO	4,04E- 03	SIM	6,24E- 04	SIM	2,31E- 03	SIM
emul. X dispersão	4,58E- 03	SIM	2,56E- 05	SIM	4,72E- 05	SIM	6,83E- 05	SIM
gel X dispersão	2,40E- 03	SIM	3,70E- 04	SIM	1,07E- 05	SIM	3,54E- 05	SIM
0,50%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	1,11E- 02	SIM	2,14E- 04	SIM	1,16E- 03	SIM	1,36E- 03	SIM
emul. X dispersão	9,68E- 01	NÃO	2,79E- 02	SIM	4,45E- 02	SIM	6,54E- 02	NÃO
gel X dispersão	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM
1,0%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	4,47E- 04	SIM	2,29E- 04	SIM	3,16E- 05	SIM	4,16E- 05	SIM
2,0%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	1,24E- 03	SIM	1,77E- 02	SIM	3,47E- 04	SIM	1,42E- 03	SIM

C. Viscosidade a 25°C

Tabela 18. Resultados Teste *t* de Student, 95% IC, para resultados de análise de viscosidade das amostras após 180 dias de incubação.

AMOSTRAS ARMAZENADAS POR 180 DIAS								
EMULSÕES	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	0,43	NÃO	0,11	NÃO	0,12	NÃO	0,20	NÃO
placebo X 1,0%	0,04	SIM	0,05	NÃO	0,22	NÃO	0,60	NÃO
placebo X 2,0%	0,01	SIM	0,01	SIM	0,01	SIM	0,07	NÃO
0,5% X 1,0%	0,06	NÃO	0,07	NÃO	0,13	NÃO	0,17	NÃO
0,5% X 2,0%	0,02	SIM	0,00	SIM	0,01	SIM	0,07	NÃO
1,0% X 2,0%	0,23	NÃO	0,11	NÃO	0,11	NÃO	0,01	SIM
GÉIS	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	0,19	NÃO	0,02	SIM	0,86	NÃO	0,42	NÃO
placebo X 1,0%	0,01	SIM	0,01	SIM	0,04	SIM	0,04	SIM
placebo X 2,0%	0,02	SIM	0,02	SIM	0,17	NÃO	0,73	NÃO
0,5% X 1,0%	0,02	SIM	0,02	SIM	0,01	SIM	0,04	SIM
0,5% X 2,0%	0,03	SIM	0,01	SIM	0,15	NÃO	0,95	NÃO
1,0% X 2,0%	0,00	SIM	0,02	SIM	0,01	SIM	0,02	SIM
PLACEBO	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,01	SIM	0,72	NÃO	0,02	SIM	0,67	NÃO
0,50%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,01	SIM	0,04	SIM	0,01	SIM	0,04	SIM
1,00%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,05	SIM	0,04	SIM	0,03	SIM	0,01	SIM
2,00%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,96	NÃO	0,32	NÃO	0,01	SIM	0,04	SIM

D. Reologia a 25°C

Tabela 19. Resultados Teste *t* de *Student*, 95% IC, para resultados de análise de reologia das amostras após 180 dias de incubação.

AMOSTRAS ARMAZENADAS POR 180 DIAS								
EMULSÕES	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	0,04	SIM	0,01	SIM	0,13	NÃO	0,02	SIM
placebo X 1,0%	0,05	SIM	0,01	SIM	0,23	NÃO	0,06	SIM
placebo X 2,0%	0,01	SIM	0,01	SIM	0,01	SIM	0,01	SIM
0,5% X 1,0%	0,07	NÃO	0,08	NÃO	0,14	NÃO	0,02	SIM
0,5% X 2,0%	0,02	SIM	0,00	SIM	0,01	SIM	0,07	NÃO
1,0% X 2,0%	0,24	NÃO	0,01	SIM	0,01	SIM	0,01	SIM
GÉIS	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
placebo X 0,5%	0,20	NÃO	0,24	NÃO	0,90	NÃO	0,44	NÃO
placebo X 1,0%	0,02	SIM	0,08	NÃO	0,43	NÃO	0,04	SIM
placebo X 2,0%	0,20	NÃO	0,03	SIM	0,01	SIM	0,01	SIM
0,5% X 1,0%	0,20	NÃO	0,20	NÃO	0,10	NÃO	0,04	SIM
0,5% X 2,0%	0,02	SIM	0,06	SIM	0,02	SIM	0,01	SIM
1,0% X 2,0%	0,03	SIM	0,02	SIM	0,01	SIM	0,03	SIM
PLACEBO	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,01	SIM	0,01	SIM	0,02	SIM	0,01	SIM
0,5%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,01	SIM	0,04	SIM	0,01	SIM	0,04	SIM
1,0%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,04	SIM	0,04	SIM	0,03	SIM	0,01	SIM
2,0%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,01	SIM	0,03	SIM	0,01	SIM	0,01	SIM

E. Atividade Específica

Tabela 20. Resultados Teste *t* de *Student*, 95% IC, para resultados de análise de atividade específica das amostras após 180 dias de incubação.

AMOSTRAS ARMAZENADAS POR 180 DIAS								
EMULSÕES	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
0,5% X 1,0%	0,04	SIM	0,02	SIM	0,04	SIM	0,04	SIM
0,5% X 2,0%	0,04	SIM	0,03	SIM	0,04	SIM	0,04	SIM
1,0% X 2,0%	0,87	NÃO	0,01	SIM	0,76	NÃO	0,04	SIM
GÉIS	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
0,5% X 1,0%	0,00	SIM	0,68	NÃO	0,00	SIM	0,94	NÃO
0,5% X 2,0%	0,00	SIM	0,63	NÃO	0,79	NÃO	0,90	NÃO
1,0% X 2,0%	0,57	NÃO	0,72	NÃO	0,00	SIM	0,86	NÃO
0,50%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,00	SIM	0,00	SIM	0,87	NÃO	0,00	SIM
emul. X dispersão	0,60	NÃO	0,73	NÃO	0,01	SIM	0,65	NÃO
gel X dispersão	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM
1,00%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM
2,00%	5°C	SIGN	25°C - Escuro	SIGN	25°C - Luz	SIGN	45°C	SIGN
emul. X gel	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM	0,00	SIM

