



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAIMUNDO NONATO FERNANDES MOREIRA FILHO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO DE
CÁLCIO COM PAPAÍNA IMOBILIZADA PARA O USO COMO CURATIVO
BIOATIVO**

FORTALEZA

2019

RAIMUNDO NONATO FERNANDES MOREIRA FILHO

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO DE CÁLCIO
COM PAPAÍNA IMOBILIZADA PARA O USO COMO CURATIVO BIOATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Dr^a Morsyleide de Freitas Rosa.

Coorientadora: Dr^a Fábria Karine Andrade.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M839c Moreira Filho, Raimundo Nonato Fernandes.

Caracterização e avaliação de membranas de alginato de cálcio com papaína imobilizada para o uso como curativo bioativo / Raimundo Nonato Fernandes Moreira Filho. – 2019.
62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

Coorientação: Profa. Dra. Fábيا Karine Andrade.

1. Curativo. 2. Alginato. 3. Papaína. 4. Adsorção. I. Título.

CDD 540

RAIMUNDO NONATO FERNANDES MOREIRA FILHO

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO DE CÁLCIO
COM PAPAÍNA IMOBILIZADA PARA O USO COMO CURATIVO BIOATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química

Aprovada em: 26/07/2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Judith Feitosa de Pessoa Andrade
Universidade Federal do Ceará

Dra. Raquel Petrilli Eloy
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

À Funcap, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

Aos professores Morsyleire, Fábila e Rodrigo pela orientação, total apoio e acreditar no meu trabalho. Aos amigos e companheiros de laboratório do NPL e Embrapa pela ajuda quando possível.

E aos meus amigos e família pelo apoio afetivo ao longo dessa jornada.

RESUMO

Curativos a base de produtos naturais são de bastante interesse na indústria farmacêutica por apresentarem baixa rejeição pelo organismo. O alginato, um polissacarídeo encontrado nas paredes celulares de algas marrons, tem excelentes propriedades para o uso como biomaterial, devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Curativos de alginato já são uma realidade terapêutica, porém, eles atuam apenas mantendo o ambiente adequado para a cicatrização. Com o intuito de melhorar suas propriedades, foi proposta a incorporação da papaína para acelerar e melhorar a cicatrização de feridas. Essa enzima já é usada na composição de pomadas e cremes para tratamento de feridas, pois é capaz de promover o desbridamento dos tecidos desvitalizados ou necróticos próximos à lesão, acelerando o processo de cicatrização. O desenvolvimento de um curativo a base de alginato e papaína agrega as propriedades cicatrizantes de ambos os materiais que atuarão melhorando o processo de cicatrização. No presente trabalho, a papaína foi imobilizada por adsorção física e foram avaliadas as melhores condições para imobilização (concentração inicial, temperatura e pH) e medido o rendimento da imobilização ao quantificar a proteína retida através do teste de Bradford. Foi feito um estudo da estabilidade enzimática após imobilização e ao longo do período de armazenamento (28 dias). A liberação da enzima foi quantificada utilizando célula de Franz. Foram feitos testes de caracterização química e morfológica (FTIR e MEV) e ensaios biológicos *in vitro* (hemólise, citotoxicidade e antibacteriano). Verificou-se que as melhores condições de imobilização foram encontradas em meio neutro, concentração inicial de 20 mg/mL de papaína e a 25 °C. A enzima continuou ativa após imobilização (5,89 U/mg). Ao longo do tempo notou-se que a papaína imobilizada tem menor redução da atividade relativa comparada à em solução (manteve 29,15% da atividade inicial contra 6,31%). Foi constatado que 64,1% da enzima total imobilizada foi liberada após 24 horas. Os ensaios biológicos apontam para um material bioativo e não hemolítico. Com base nesses testes iniciais, foi possível obter um biomaterial com bom potencial para ser aplicado como curativo bioativo.

Palavras-chave: curativo; alginato; papaína; adsorção.

ABSTRACT

Natural-based dressings are of considerable interest in the pharmaceutical industry because they have low body rejection. Alginate, a polysaccharide found in the cell walls of brown algae, has excellent properties for use as biomaterial, as it is biodegradable, biocompatible and non-toxic. Alginate dressings are already a therapeutic reality, however they act only by maintaining the proper moisture of the place. In order to improve its therapeutic properties, it was proposed the incorporation of an enzyme (papain) to accelerate and improve wound healing. Papain may be found in the composition of ointments or creams for the treatment of wounds, as it is capable of promoting the debridement of the devitalized or necrotic tissues near the lesion, accelerating the healing process. The development of a dressing based on alginate and papain adds the healing properties of both materials that will potentially act to improve the healing process. The adsorption of the enzyme on a support can stabilize its structure and allow a controlled release. In the present work, papain was immobilized by physical adsorption and the best conditions for immobilization (initial concentration, temperature and pH) were evaluated and the yield of immobilization was measured by the Bradford test. It was analyzed whether the enzyme remained active after immobilization as well as measurements were taken over time to assess its stability. Desorption of the protein and its release using Franz cell was studied. Characterization tests (FTIR and SEM) and in vitro biological assays were performed (hemolysis, cytotoxicity and antibacterial). It was found that the best immobilization conditions were in neutral medium, 20 mg/mL and 25 ° C. The enzyme remained active after immobilization (5.89 U/mg) and over time it was observed that immobilized papain had a smaller decrease in relative activity compared to solution (29.15% of its initial activity versus 6.31% over 28 days). Desorption showed that 97% of the enzyme was released after 6 hours; in the Franz cell, 64.1% of the enzyme was released after 24 hours. The biological assays point to a material with low cytotoxicity and not hemolytic. Based on these initial tests, it was possible to obtain a biomaterial with good potential to be applied as a bioactive dressing.

Keywords: dressing; alginate; papain; adsorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema mostrando as fases e as células envolvidas ao longo do processo de cicatrização.....	14
Figura 2 - Monômeros constituintes do polissacarídeo alginato.....	15
Figura 3 - Estrutura química do polímero aniônico alginato.....	15
Figura 4 - Representação do <i>egg-box</i> entre o bloco G e cálcio.....	16
Figura 5 - Estrutura tridimensional da papaína.....	18
Figura 6 - Membrana de Alginato de Cálcio.....	24
Figura 7 - Membrana de CaAlg com papaína imobilizada estéril.....	27
Figura 8 - Célula de difusão de Franz, identificando todos os seus componentes.....	29
Figura 9 - Representação esquemática simplificada do ensaio de hemólise, ilustrando um resultado hemolítico e não hemolítico.....	33
Figura 10 - Variação da massa (%) pelo tempo ao imergir as membranas de alginato em PBS.....	36
Figura 11 - Influência da concentração de papaína na imobilização da enzima em membranas de CaAlg (n = 3).....	37
Figura 12 - Influência da temperatura na imobilização de papaína (n = 3).....	38
Figura 13 - Influência do pH na imobilização de papaína (n = 3).....	39
Figura 14 - pKa dos agrupamentos do alginato calculados através do software Marvin®.....	41
Figura 15 - Capacidade adsortiva em pH 5,8 e 7,0 de papaína em membranas de CaAlg quantificados através do método de Bradford.....	42
Figura 16 - Rendimento de imobilização da papaína nas membranas de CaAlg em pH 5,8 e 7,0.....	43

Figura 17 - Atividade enzimática da papaína livre (controle) e imobilizada (membrana).....	44
Figura 18 - Atividade recuperada (%) da papaína imobilizada em relação a livre.....	45
Figura 19 - Estabilidade da papaína livre e imobilizada em membrana durante armazenamento a 4 °C.....	46
Figura 20 - Teste de liberação <i>in vivo</i> . A liberação da papaína expressa em porcentagem considerando a massa total inicial. (n = 4).....	47
Figura 21 - Espectros obtidos por FTIR das membranas de CaAlg antes da imobilização (a) e depois da imobilização.....	48
Figura 22 - MEV da superfície da membrana de CaAlg a) não autoclavada, b) autoclavada e c) autoclavada com papaína imobilizada.....	50
Figura 23 - Curvas DSC para amostras de alginato, papaína e CaAlg + papaína, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.....	51
Figura 24 - Viabilidade celular (%) de fibroblastos em contato com os extrativos das amostras testadas.....	55
Figura 25 - Viabilidade celular (%) de queratinócitos em contato com os extrativos das amostras testadas.....	56
Figura 26 - Placas Petri contendo as quatro bactérias testadas e as amostras em discos de CaAlg com papaína, CaAlg (-) e antibiótico (+). Do lado esquerdo estão as bactérias gram negativas <i>E. coli</i> (superior) e <i>P. aeruginosa</i> (inferior) e do lado direito estão as bactérias gram positivas <i>S. mutans</i> (superior) e <i>S. aureus</i> (inferior).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais diferenças entre adsorção física e química.....	20
Tabela 2 - Parâmetros obtidos utilizando os modelos cinéticos de liberação.....	48
Tabela 3 - Bandas do FTIR do alginato e papaína com suas atribuições no espectro.....	53
Tabela 4 - Resultados do ensaio hemolítico das membranas de CaAlg.....	53
Tabela 5 - Classificação do grau hemolítico (%) segundo a norma ASTM F756-00.....	53
Tabela 6 - Formação de alo de inibição em bactérias. Sinal (-) significa que não houve formação de alo e (+) houve formação.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Curativos	11
1.2	Cicatrização de ferimentos	12
1.3	Alginato	13
1.4	Papaína	16
1.5	Adsorção Física	17
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Geral	21
3.2	Objetivos específicos	21
4	METODOLOGIAS	22
4.1	Materiais	22
4.2	Produção das membranas de alginato de cálcio	22
4.3	Intumescimento	23
4.4	Imobilização enzimática	24
4.4.1	<i>Otimização das condições de imobilização</i>	24
4.4.2	<i>Quantificação e rendimento de imobilização</i>	25
4.4.3	<i>Atividade enzimática</i>	26
4.4.4	<i>Estabilidade</i>	27
4.4.5	<i>Liberação in vitro</i>	27
4.5	Caracterização físico-química	29
4.5.1	<i>Espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR)</i>	29
4.5.2	<i>Calorimetria de varredura diferencial (DSC)</i>	29
4.5.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	30
4.6	Ensaio biológicos	30

4.6.1	<i>Hemólise</i>	30
4.6.2	<i>Citotoxicidade</i>	32
4.6.3	<i>Atividade antibacteriana</i>	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Intumescimento	34
5.2	Imobilização enzimática	35
5.2.1	Otimização das condições de imobilização	35
5.1.1.1	<i>Efeito da concentração inicial</i>	35
5.1.1.2	<i>Efeito da temperatura</i>	36
5.1.1.3	<i>Efeito do pH</i>	37
5.2.2	Quantificação e rendimento de imobilização	39
5.2.3	Atividade enzimática	41
5.2.4	Estabilidade	43
5.2.5	Célula de Franz	44
5.3	Caracterização físico-química	46
5.3.1	Espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR)	46
5.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
5.3.3	Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	48
5.4	Ensaio biológico	49
5.4.1	<i>Hemólise</i>	49
5.4.2	<i>Citotoxicidade</i>	51
5.4.3	<i>Atividade antibacteriana</i>	53
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICE A - CURVA PADRÃO PARA A PAPAÍNA	61
	APÊNDICE B - CURVA PADRÃO PARA O REAGENTE DE BRADFORD EM BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA)	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Curativos

Quando a continuidade da pele é interrompida devido a uma lesão mecânica ou uma fonte de calor, diz-se que houve um ferimento, o que gera dano estrutural e/ou funcional ao tecido. Assim o corpo fica suscetível à contaminação por agentes patógenos externos, como bactérias e vírus, podendo acarretar em doenças mais graves (TANG et al., 2019). O tratamento de ferimentos, especialmente as feridas crônicas, ainda é um desafio para a medicina regenerativa, visto que envolve uma série de problemas, como o surgimento de regiões necróticas, propensão a infecção e possível formação de tecido com fraca sustentação anatômica e funcional (VAKILIAN et al., 2019). Para superar esses problemas, o uso de curativos tem se mostrado comum e de relativa eficiência no tratamento de feridas. Os curativos mais comuns, como algodão e gaze, possuem baixo custo e alta capacidade absorviva. Porém, eles agem apenas de forma passiva ao proteger o ferimento de contaminantes externos (MA et al., 2019).

Para o curativo ser considerado ideal ele deve possuir as seguintes propriedades: a) biocompatibilidade: o material deve desencadear uma resposta biológica apropriada, quando aplicado no organismo, não causando reação inflamatória crônica, reação de corpo estranho ou mesmo toxicidade; b) manter a umidade ideal no local da ferida para facilitar o processo de cicatrização (ex.: no caso de feridas exsudativas, o curativo deverá absorver o excesso de fluídos para diminuir o risco de contaminação; c) permitir as trocas gasosas; d) funcionar como barreira protetora de agentes externos infecciosos, como bactérias e; e) pouca aderência para evitar lesões mecânicas ao ser retirado e proporcionar maior conforto ao paciente (GASPAR-PINTILIESCU; STANCIUC; CRACIUNESCU, 2019; NASERI-NOSAR et al., 2017). Os principais tipos de curativos existentes são tradicionalmente classificados dependendo de sua ação. Os curativos passivos, como gaze e tule, são os mais simples e comuns do mercado, representando o maior segmento de vendas do ramo farmacêutico. Os curativos interativos permitem as trocas gasosas do ferimento e bloqueiam a contaminação por bactérias, são geralmente compostos por filmes de polímeros, como Band-Aid®, e são indicados para ferimentos com pouco

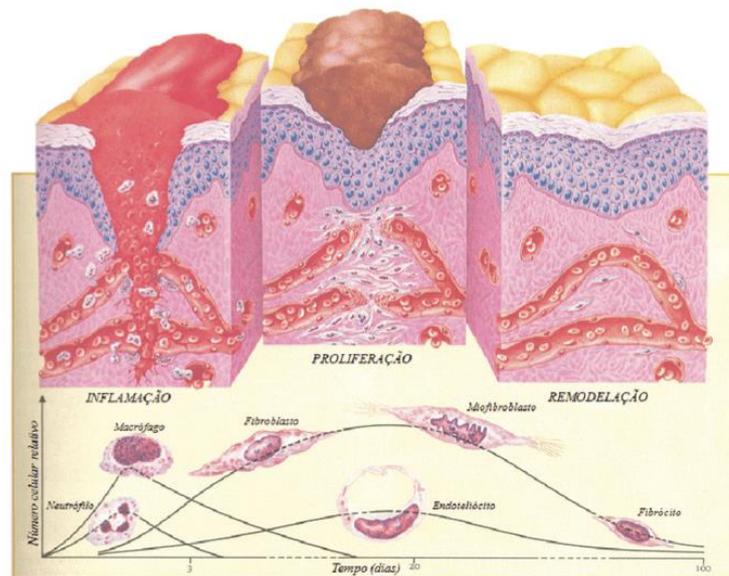
exsudato. Já os curativos bioativos são dispositivos contendo moléculas bioativas que melhoram o processo de cicatrização ou são constituídos de material com propriedades endógenas para o mesmo efeito. Nesses materiais estão incluídos quitosana, celulose bacteriana e alginato (SCHOUKENS, 2009).

1.2 Cicatrização de ferimentos

O processo de cicatrização é didaticamente dividido em três fases contínuas e sobrepostas. A primeira, a fase inflamatória, consiste na resposta vascular caracterizada pela hemostasia e coagulação sanguínea, incluindo infiltração de leucócitos com função de impedir infecções e o início da resposta para reparação do ferimento. A fase seguinte, chamada de proliferação, consiste na formação de uma camada epitelial que cobre o ferimento com concomitante crescimento de tecido granuloso para preencher os espaços do ferimento. Depois da formação do novo tecido, inicia-se a fase de remodelação em que é restaurada a integridade estrutural do tecido e sua função. Os três eventos não são simplesmente lineares e há sobreposição das fases com o tempo (figura 1).

Ferimentos agudos refere-se aqueles ferimentos, como queimaduras, lesões traumáticas ou cirúrgicas, que se curam em tempo relativamente rápido. Embora o resultado final esperado fosse um tecido com idêntica estrutura e sem formação de cicatriz, a regeneração completa é incomum, mas o tecido reparado possui estrutura e função satisfatória. O processo de cicatrização aparenta ser estritamente regulado por vários fatores de crescimento e citosinas liberadas no lugar do ferimento (LI; XING; DING, 2007). Feridas crônicas tendem a não se regenerarem em um processo ordenado nem em um tempo hábil e o tecido novo formado pode não ter estrutura e função satisfatória para desempenhar seu papel de proteção. Geralmente o surgimento de feridas crônicas está ligado a doenças metabólicas como a diabetes. A hiperglicemia demonstrou dificultar a proliferação e infiltração de células, além de diminuir a produção de colágeno, principal proteína estrutural responsável da pele (SHAO et al., 2019).

Figura 1 – Esquema mostrando as fases e as células envolvidas ao longo do processo de cicatrização



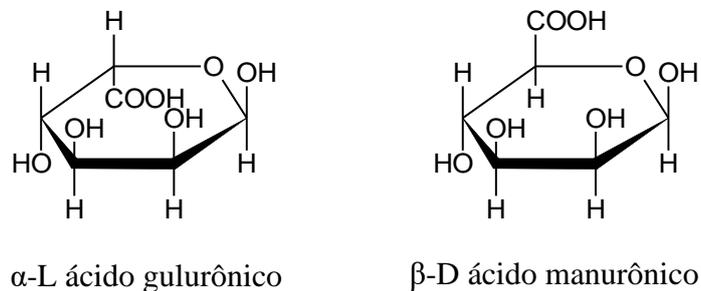
Fonte: ISAAC et al, 2010

1.3 Alginato

O polissacarídeo alginato é obtido da parede celular de algas e vem sendo amplamente estudado no tratamento de ferimentos, sendo já vendido comercialmente na forma de curativo (LEE; MOONEY, 2012; PAUL; SHARMA, 2004). Porém, mais estudos estão sendo feitos para melhorar suas propriedades e aumentar o seu efeito cicatrizante. Alginato de cálcio possui diversas propriedades que fazem com que esse biopolímero seja utilizado para tal aplicação. O hidrogel de alginato de cálcio permite a devida umidade do ferimento, possui alta capacidade de absorção do exsudato e tem efeito hemostático (BHATNAGAR; BHATNAGAR, 2015). Outras propriedades do biopolímero são biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade do material (LEE; MOONEY, 2012), que são características fundamentais para um curativo.

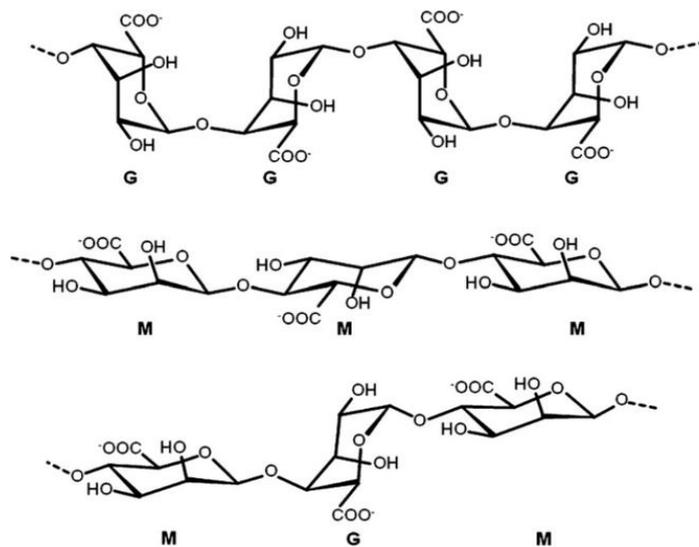
Analisando a estrutura química do alginato, é possível perceber que o polímero é formado por blocos de dois monômeros, o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G) (Figura 2), sendo assim classificado como heterossacarídeo (D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008).

Figura 2 – Monômeros constituintes do polissacarídeo alginato



Fonte: Autor (ChemDraw)

Figura 3 - Estrutura química do polímero aniônico alginato



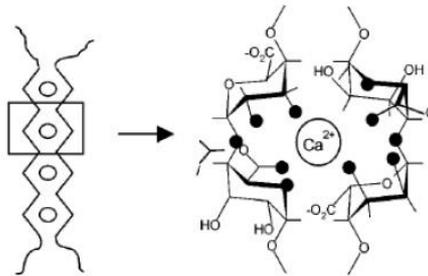
Fonte: LEE; MOONEY, 2012

O bloco G possui uma cadeia mais ondulada (Figura 3), que na presença de cargas bivalentes, como o cálcio, há a formação de *cross-link*, onde os cátions se aloca na região intersticial das cadeias interagindo com os grupos carboxílico e hidroxilas, reticulando numa estrutura chamada *egg-box* (Figura 4). Essa característica é responsável pela principal propriedade do alginato, que é a capacidade de formação de géis (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

A imobilização consiste na adesão de proteínas ou células na superfície sólida de uma matriz ou o aprisionamento de substâncias dentro da mesma. Há várias técnicas de imobilização e diferentes funções e propriedades serão obtidas dependendo da técnica empregada. As técnicas são classificadas de acordo com a

interação entre o suporte e a enzima, as mais comuns são adsorção física, ligação covalente, aprisionamento, cross-linking e por afinidade (RUSMINI; ZHONG; FEIJEN, 2007).

Figura 4 - Representação do *egg-box* entre o bloco G do alginato e o cátion de cálcio



Fonte: BRACCINI; PÉREZ, 2001

Alginato possui características distintas que fazem com que ele seja uma boa matriz para a imobilização de células e proteínas, e um bom transportador/veículo para a liberação de uma gama de agentes terapêuticos (CHAUDHARI; KAR; SINGHAL, 2015). As vantagens na utilização do alginato são: a) métodos fáceis e simples de imobilização e com alta eficiência; b) boa estabilidade mecânica; c) habilidade de formar gel viscoso em determinadas condições de concentração, pH e temperatura compatíveis com a proteína; d) alta porosidade e natureza hidrofílica do gel que permite uma alta difusão de macromoléculas; e) proteção da enzima contra desativação em decorrência de fatores ambientais, como oxidação, mudanças de pH e temperatura, ação de proteases; f) resistência à contaminação microbológica; g) Baixo custo em relação aos polímeros sintéticos e abundância de origem renovável; h) biocompatibilidade e baixa toxicidade; e i) boas propriedades adsorventes (MATTO; HUSAIN, 2009) .

Aprisionamento e adsorção física são os métodos de imobilização mais utilizados com alginato devido às suas propriedades já mencionadas. Aprisionamento consiste na adição do agente a ser imobilizado ainda na fase gel do imobilizador, assim os dois componentes interagem de forma uniforme por toda sua extensão. A adsorção física consiste na formação de ligações fracas de Van der Waal entre o

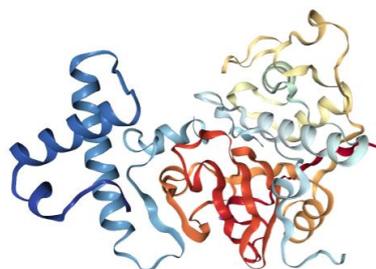
suporte e a enzima devido a diferença de cargas parciais (polo), sendo um processo reversível e ideal para a liberação de fármaco, há pouca inativação da enzima, além ser um processo simples e barato (JADHAV; GOGATE, 2014; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

1.4 Papaína

Para melhorar as propriedades de cura do curativo de alginato, é eficaz adicionar um agente de desbridamento porque eles podem funcionar em combinação para um processo de cura aprimorado. A papaína é uma enzima proteolítica encontrada no látex da *Carica papaya*, sendo uma árvore comum no Brasil, agregando valor biológico e tecnológico. Ela já é disponível comercialmente sendo utilizada em diversas indústrias, dentre elas, a farmacêutica para o tratamento de feridas. Porém, seu tratamento isolado consiste na aplicação de cremes ou pomadas, o que pode ser doloroso e acarretar em lesões por atrito. A vantagem da utilização dessa droga em um curativo consiste na sua fácil aplicação e remoção, levando a um maior conforto ao paciente, e um prolongamento da ação do fármaco (DUTRA et al., 2017).

A papaína é uma cisteíno protease, devido à presença de ligações dissulfeto entre os aminoácidos de cisteína, cuja estrutura possui 345 aminoácidos. Possui o peso molecular de 23.406 Da (sequência de aminoácido) (figura 5). Ela tem se apresentado como uma opção mais viável para substituir a colagenase, uma protease humana de maior custo também usada no desbridamento de feridas.

Figura 5 - Estrutura tridimensional da papaína



Fonte: DUTTA et al, 2015 (PDB)

A enzima tem boa solubilidade em água. Consegue suportar altas temperaturas em relação às outras enzimas, começando a se desnaturar a partir de 70°C, enquanto a maioria das enzimas são desnaturadas a 40°C / 50°C, sendo totalmente inativa a 90°C. Sua temperatura ótima é de 65°C. É ativa em uma ampla faixa de pH (3,5 a 9,0), com um pH ótimo entre 6,0 e 7,0, sendo rapidamente desnaturada em pH inferiores a 3,5 e superiores a 10.

A papaína vem se mostrando bastante promissora no tratamento de feridas e queimaduras (GURUNG; ŠKALKO-BASNET, 2009). Isso se deve a sua ação bactericida, bacteriostática e anti-inflamatória no ferimento, além de promover o debridamento autolítico, que consiste na remoção do tecido necrótico e fragmentos celulares (LEITE et al., 2012). A enzima também atua estimulando a produção de citocinas que promovem a multiplicação celular local ao diminuir o pH do ferimento (FALANGA, 2002) e no estreitamento das bordas da ferida, diminuindo a cicatriz, tendo um efeito estético favorável (SINGH; SINGH, 2012).

1.5 Adsorção Física

A adsorção é um fenômeno físico ou químico onde uma substância presente em um fluido é aderida na superfície sólida de outro componente. O componente aderido à superfície é chamado de adsorvato, enquanto a fase sólida onde o adsorvato é aderido é chamado de adsorvente. O processo inverso, onde a substância é desprendida da superfície sólida é chamado de dessorção. A migração entre fases ocorre devida a um gradiente químico gerando uma força motriz graças à diferença de concentração do fluido e da superfície do adsorvente.

A adsorção é um fenômeno que pode ser representado por uma reação química e como tal possui uma constante de equilíbrio:



$$k = \frac{[AS]}{[A][S]} \quad (2)$$

onde A é o adsorbato, S os sítios onde acontecerá a adesão e AS a molécula aderida (FOGLER, 2005)

Existem dois tipos de adsorção: física e química. A adsorção física ocorre por interações fracas e longas, geralmente eletrostática, chamadas de forças de Van der Waals, assim as moléculas ficam fisicamente presas no adsorvente. Esse tipo de adsorção é exotérmico e reversível, visto que o aumento da temperatura dificulta a adesão das moléculas na superfície devido a energia cinética e é possível a dessorção.

Já adsorção química ocorre uma interação mais forte, comparadas a ligações químicas, onde há um rearranjo das moléculas envolvidas e os respectivos orbitais são deformados, como ocorre em uma reação química.

Devido a suas características, a adsorção física é a mais adequada para liberação de fármacos, já que o processo é reversível e assim a droga adsorvida em uma matriz polimérica, por exemplo, pode ser liberada para o meio. Além que não há mudança química devido a uma reação química, como na adsorção química, mantendo a integridade da droga.

Tabela 1 – Principais diferenças entre adsorção física e química.

Física	Química
Forças fracas de Van der Waals	Energia semelhante a uma ligação química
Entalpia de adsorção inferior a 20 kJ/mol	Entalpia de adsorção superior a 20kJ/mol
Não há mudança da estrutura	Pode haver origem de uma espécie diferente
Especificidade baixa	Especificidade alta
Pode acontecer em multicamadas	Somente em monocamada

Devido a suas características, a adsorção física é a mais adequada para liberação de fármacos, já que o processo é reversível e assim a droga adsorvida em uma matriz polimérica, por exemplo, pode ser liberada para o meio. Além que não há mudança química devido a uma reação química, como na adsorção química, mantendo a integridade da droga.

Para modelar e estudar o fenômeno da adsorção, a isoterma de adsorção de Freundlich é uma equação empírica muito utilizada e seus parâmetros geram dados para avaliar o fenômeno e é dado pela equação:

$$q_e = K_F \cdot C_i^{1/n} \quad (3)$$

onde q_e é a capacidade adsortiva (mg/g), C_i a concentração estudada e K_F e n são constantes relacionadas a capacidade e intensidade da adsorção, respectivamente (SUDHA BAI; ABRAHAM, 2003).

Estudos anteriores mostraram que, para o uso como curativo bioativo, a imobilização por adsorção física apresenta vantagens em relação à imobilização por aprisionamento, a saber: maior percentual de liberação; maior atividade enzimática após imobilização; melhor hemocompatibilidade; e possibilidade de esterilização, essencial para a aplicação biomédica (MOREIRA FILHO et al, 2017)

2 JUSTIFICATIVA

Segundo Federação Internacional de Diabetes (IDF), estima-se que 425 milhões da população mundial tenha sido diagnosticada com diabetes em 2017. O Brasil ocupa o quarto lugar com maior número de indivíduos, 12,5 milhões, o que significa que 8 a 9% da população brasileira possui o sistema de cicatrização natural prejudicado devido ao alto nível de glicose no sangue, podendo acarretar em ferimentos crônicos e até mesmo amputamento de membros decorrentes de inflamações graves, o que é 10 a 20 vezes mais comuns na população com diabetes (IDF Diabete Atlas, 2017). Para contornar esse problema, a utilização de curativos se mostra simples e eficiente, especialmente ao adicionar substâncias que vão mimetizar os processos de cicatrização que foram perdidas pelo organismo dos pacientes acometidos por diabetes, tornando o curativo bioativo.

Curativos feitos de materiais naturais têm-se mostrado bastante promissores na área de biomateriais devido à alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de geralmente possuírem menor custo em relação a materiais artificiais. Os polímeros naturais são amplamente usados como curativos devido à similaridade com a matriz extracelular da pele e boa aceitação biológica, o que evita a rejeição imunológica, que é mais frequente nos polímeros sintéticos (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

A imobilização de enzima em biopolímeros traz diversas vantagens, pois a matriz servirá de proteção e veículo para o ativo. Alginato e papaína são amplamente estudados e sozinhos já apresentam aplicações médicas conhecidas, porém a possibilidade da atuação conjunta dessas duas substâncias é promissor, permitindo dois tratamentos em uma única aplicação, sendo mais cômodo e mais eficiente.

Para tal, estudos das condições de imobilização enzimática da papaína em membranas de alginato de cálcio foram realizados e parâmetros de imobilização e de atividade enzimática foram obtidos. Adicionalmente, foram feitos testes iniciais de caracterizações físico-químicas e ensaios biológicos com vistas a obter um curativo bioativo efetivo no tratamento de lesões cutâneas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um curativo bioativo de alginato de cálcio com papaína imobilizada por adsorção física para o tratamento tópico de lesões cutâneas.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a matriz polimérica (alginato) utilizada;
- Identificar as condições de imobilização da enzima;
- Quantificar a estabilidade enzimática após imobilização;
- Definir o perfil de liberação da enzima pela membrana utilizando Célula de Franz;
- Caracterizar físico-quimicamente as membranas com e sem papaína;
- Investigar os efeitos biológicos através de ensaios *in vitro* de citotoxicidade, hemólise e antibacteriano.

4 METODOLOGIAS

A produção das membranas, os estudos da adsorção e testes de hemólise foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Lubrificantes (NPL), pertencente ao Grupo de Pesquisa em Adsorção (GPSA) da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici. A quantificação de proteína e o estudo da atividade enzimática foram realizados no Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB) da Embrapa Agroindústria Tropical, citotoxicidade no Laboratório Integrado de Biomoléculas pertencente à Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC e ensaios antibacteriano foram realizados no Laboratório de microbiologia, LABOMAR –UFC.

4.1 Materiais

Alginato de sódio (NaAlg) (CAS 9005-38-3, viscosidade média, pureza de 99%) foi adquirido da Dinâmica (Brasil). Tem um peso molecular de 134.000 Da e uma razão de grupos de ácido gulurônico (G) para manurônico (M) (G / M) de 0,96, conforme medido por cromatografia de permeação em gel (GPC) e ressonância magnética nuclear (NMR), respectivamente. A papaína do látex de mamão (CAS 9001-73-4) foi obtida na Dinâmica (Brasil). Cloreto de cálcio, fosfato de sódio dibásico e monobásico, caseína, cloreto de cisteína e tri-cloreto acético de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Água ultrapura foi obtida do sistema Milli-Q® com filtro de poro de 0,22 µm.

4.2 Produção das membranas de alginato de cálcio

Para a produção das membranas, foi utilizada a metodologia adaptada de Li, Qi *et al.*, 2017. Foram adicionados 2 g de alginato de sódio em 100 mL de água deionizada, sob constante agitação (1000 rpm) e sob aquecimento constante (80 °C) para facilitar a dissolução. Após aproximadamente 1 hora, observada completa solubilização, adicionou-se 3 mg de cloreto de cálcio para dar início o o processo de

reticulação. Depois de 30 minutos, 25 g da solução são distribuídos em cada placa Petri de 9 cm de diâmetro, totalizando quatro membranas. A secagem foi feita a temperatura ambiente por 24 horas, deixando em um sistema sem circulação forçada para haver maior controle. Posteriormente, a membrana foi imersa em 1 litro de uma solução 1 mol/L de cloreto de cálcio por mais 1 hora para finalizar a reticulação e assim obter uma membrana uniforme. Lavagens com água deionizada foram feitas para eliminar o cloreto de cálcio excedente. Foram obtidas membranas com 9 cm de diâmetro e 1 mm de espessura. No processo de esterilização, as membranas foram autoclavadas por 15 minutos.

Figura 6 – Membrana de Alginato de Cálcio



Fonte: Autor

4.3 Intumescimento

Pequenos pedaços de membrana (10mm x 10mm) inicialmente pesados foram colocados em contato com PBS for diferentes períodos de tempo. O excesso de tampão foi cuidadosamente retirado com papel toalha e as membranas pesadas. O grau de intumescimento foi dado pela diferença na massa em relação a massa inicial (Equação 4).

$$GI (\%) = \frac{mf - mi}{mi} \times 100 \quad (4)$$

onde mf é a massa final, mi a massa inicial.

4.4 Imobilização enzimática

4.4.1 Otimização das condições de imobilização

Para avaliar as melhores condições de imobilização, foram estudados os principais fatores que influenciam esse processo: concentração, temperatura e pH.

Para a concentração, tampão fosfato 0,1 mol/L em pH 7,0 foi preparado com diferentes concentrações de papaína: 5, 10, 15 e 20 mg/mL. As soluções foram filtradas utilizando filtros de seringa Polipersulfona (PES) com poros de 0,22 µm para reter qualquer impureza ou contaminantes. Então, cada membrana foi imersa em 30 mL dessas soluções de papaína em meio neutro a 25°C por 24 horas em repouso.

Achada a melhor concentração (maior capacidade adsortiva), a mesma imobilização ocorreu em diferentes temperaturas: 25, 35 e 45 °C para estudar o efeito cinético da adsorção em meio neutro. Posteriormente, foi avaliado o melhor pH para a imobilização da enzima, utilizando tampões fosfato com diferentes pH (5,8, 7,0 e 8,0). Foi considerado que os parâmetros são independentes para efeito estatístico.

As medidas foram feitas no espectrofotômetro (modelo Serie Biomate™ 3 da Thermo Electron Corporation) no comprimento de onda de 280 nm. Para o cálculo das concentrações de papaína adsorvida foi feita uma curva padrão de papaína. Através de um balanço de massa, a capacidade adsortiva (q_e) foi encontrada como a concentração da solução inicial antes da imobilização (C_i) menos a concentração da solução após a imobilização (C_f) multiplicada pelo volume V (massa de papaína adsorvida, isso tudo dividido pela massa M de membrana de alginato de cálcio (Equação 5).

$$q_e = \frac{(C_i - C_f)}{M} \times V \quad (5)$$

4.4.2 Quantificação e rendimento de imobilização

Para quantificar a proteína final imobilizada, foi utilizado o teste de Bradford que consiste na ligação do reagente Coomassie Brilliant G-250 à proteína. Essa ligação faz com que o corante mude de cor, deslocando sua banda de 465 para 595 nm que pode ser medida usando um espectrofotômetro (BRADFORD, 1976). A curva padrão foi feita com BSA (Bovine Serum Albumin) (Apêndice B).

Para calcular o total de enzima imobilizada pela membrana foi feito um balanço de massa, segundo a Equação 6:

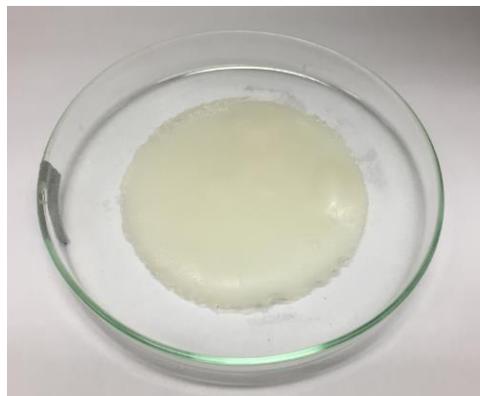
$$q_e = \frac{m_i - (m_f + m_l)}{M} \quad (6)$$

onde q_e é a quantidade de enzima imobilizada, ou a capacidade adsorptiva (mg/g), m_i a massa de papaína na solução antes da imobilização (mg), m_f a massa de papaína na solução depois de imobilização (mg) e m_l a massa que foi retirada pela lavagem de PBS (mg), todos determinado pelo teste de Bradford, por massa M de membrana (g).

O rendimento de imobilização foi dado pela razão da massa de papaína adsorvida (q_e) e a massa total da enzima antes da imobilização (m_i):

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{q_e}{m_i} \times 100 \quad (7)$$

Figura 7 – Membrana estéril de CaAlg com papaína imobilizada



Fonte: Autor

4.4.3 Atividade enzimática

Foi utilizado o método descrito segundo ALPAY e UYGUN (2015), que segue o protocolo universal da Sigma-Aldrich (AU - CUPP-ENYARD, 2008) para a medida da atividade de protease. A quantificação é feita após a degradação da caseína (substrato) pela papaína e formação de um produto (tirosina) que pode ser quantificado por espectrofotometria.

Para o controle, foram adicionados 1,8 mL da solução ativadora, que consiste em 0,038 mol/L de EDTA e 0,034 mol/L de cloreto de cisteína em solução tampão fosfato pH = 8,0 (0,1 mol/L). Depois, adicionou-se 0,2 mL da solução de papaína 2% (m/v) no sistema. Logo em seguida, foram adicionados 2mL de uma solução de caseína 1% (m/v) que serve como substrato da reação, que ocorre por 10 minutos e a 37°C. Finalizado o tempo de reação, foram adicionados 2mL de ácido tricloroacético 10% (m/v), para parar a reação.

Já para as membranas, foram adicionados 10 mL da solução ativada, em seguida 11,1mL da solução de caseína 1% (m/v) e esperou-se 10 minutos novamente a 37 °C quando então foi adicionado 11,1 mL do ácido tricloroacético 10% (m/v).

Para o branco que foi usado na leitura do espectrofotômetro, 1,8mL da solução ativadora foram adicionados em 2 mL do ácido tricloroacético a 10% e então adicionou-se 0,2 mL da solução de papaína 2%.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido em tubos de ensaios e quantificados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm contra o branco.

Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a caseína e produzir a absorbância equivalente a 1 μ mol de tirosina/min com tirosina como padrão.

A atividade recuperada (A_r) é um parâmetro para estudar o grau de desativação da enzima após a imobilização e é definida como a relação da atividade da papaína imobilizada (A_i) e a atividade da enzima livre (A_l), como mostrado na Equação 8 (SHELDON; VAN PELT, 2013).

$$A_r(\%) = \frac{A_i}{A_l} \times 100 \quad (8)$$

4.4.4 Estabilidade

A estabilidade da papaína livre e imobilizada foi determinada a 4 ° C durante 28 dias de armazenamento. As membranas com papaína imobilizada foram armazenadas em placa de Petri e papaína livre em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 (2% m/v de enzima). Suas atividades foram avaliadas periodicamente, conforme descrito anteriormente. Estabilidade de armazenamento foi dada em atividade relativa, relacionada à atividade imediatamente após a imobilização e solução de papaína recém-preparada.

4.4.5 Liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi conduzido com células verticais de difusão de Franz com capacidade de 15 mL e 1,8 cm² de área de difusão composta por acetato de celulose. O compartimento do receptor foi preenchido com solução de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4). A concentração homogênea no receptor foi mantida pela barra de agitação magnética. Cinco pares de células doadoras e receptoras que eram mantidas juntas por um grampo. As células receptoras continham uma camisa com água e o suprimento de água de cada matriz foi conectado a um banho com temperatura controlada (37 °C). Amostras do fluido (1 mL) foram coletadas periodicamente a partir da porta de amostragem e lidas a 285 nm e então 1mL de novo tampão foi adicionado ao receptor.

Figura 8 – Célula de difusão de Franz, identificando todos os seus componentes



Fonte: SILVA et al, 2008 (adaptada)

As membranas foram cuidadosamente cortadas em círculos com diâmetro de 1 cm afim de ocupar toda a área de difusão. Foram utilizadas quatro amostras de alginato com a papaína imobilizada e uma amostra de alginato sem a enzima, totalizando um sistema com cinco células verticais.

A porcentagem acumulada de papaína liberada das membranas de alginato em relação à massa inicial de papaína foi plotada em função do tempo para determinar o perfil de liberação de acordo com a equação de Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER et al., 1983).

$$\frac{M}{M_{\infty}} = k \cdot t^n \quad (9)$$

onde M é a massa acumulada de papaína no tempo t , e M_{∞} a massa total no estado estacionário, k é uma constante cinética e n é o expoente de difusão para liberação

O perfil liberado obtido também foi analisado com modelos de cinética de zero (Equação 10), de primeira (Equação 11) e de segunda ordem (Equação 12).

$$M_t = M_o + kt \quad (10)$$

$$\ln(M_o - M_t) = \ln(M_o) - kt \quad (11)$$

$$\frac{1}{M_o - M_t} = \frac{1}{M_o} - kt \quad (12)$$

4.5 Caracterização físico-química

4.5.1 Espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR)

Para avaliar a estrutura química do alginato de cálcio antes e depois do processo de esterilização (autoclavagem) e observar a interação do biopolímero com a papaína depois de imobilizada foram realizadas análises de FTIR. As membranas foram liofilizadas para remover a água, que interfere nas leituras. Os espectros de FTIR foram obtidos em espectrofotômetro da Perkin Elmer, modelo FT-IR/NIR FRONTIER, equipado com acessório da Pike Technologies ATR/MIRacle, anexado com cristal de ZnSe. A resolução espectral foi de 4 cm⁻¹, com número de onda variando de 4000 a 600 cm⁻¹, em modo transmitância.

4.5.2 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

DSC foi usado para estudar a estabilidade térmica do alginato, papaína e alginato com papaína imobilizada. As curvas DSC (Q20 DSC, TA Instruments, New Castle, EUA) foram obtidas sob atmosfera de N₂ com fluxo de gás de 50 mL/min. As amostras (~ 3 mg) foram liofilizadas, em seguida, moídas em moinho analítico (base A11 / IKA®) e varridas de 25 a 350 °C para membranas e 25 a 250 °C para papaína com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em uma panela de alumínio hermeticamente fechada com uma tampa. Uma panela vazia foi usada como referência. A variação na quantidade de energia do alginato, papaína e ambas as reações de decomposição (DHd) foi calculada como a integral da área do pico usando o software Universal Analysis 2000 (Versão 4.74A, TA Instruments, Waters, LLC).

4.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As membranas foram liofilizadas após autoclavagem e imagens no MEV foram feitas para avaliar se houve mudança estrutural das membranas durante o processo de esterilização. Imagens também foram feitas com a membrana liofilizada após a imobilização. O material foi metalizado com platina sob atmosfera de argônio (Ar) pelo equipamento da Fisons Instruments, modelo Polaron SC500. As micrografias das amostras foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura da FEG/Quanta-250, operando com 15 kV de aceleração de voltagem.

4.6 Ensaios biológicos

4.6.1 Hemólise

A hemólise mede a taxa de morte de células sanguíneas que entram em contato com o material, mostrando-se como um ótimo ensaio para estudar os efeitos biológicos do curativo.

Os testes de hemólise foram feitos de acordo com os procedimentos descritos pela American Society for Testing and Materials (ASTM F756-00, 2000) (HENKELMAN et al., 2009). O sangue total foi coletado de doadores humanos saudáveis com tubos de coleta de sangue à vácuo de 3,6 mL, contendo solução tampão de citrato de sódio 3,2% (0,109 mol/L). Amostras de 21 cm² foram transferidas para um tubo contendo 7 mL de tampão PBS (livre de Ca e Mg). 1 mL de sangue diluído (concentração de hemoglobina de 10 mg/mL) foi adicionado. O material foi mantido em contato por 3 h, a 37 °C, em banho de água onde foram invertidos duas vezes a cada 30 minutos para promover maior interação. Em seguida, as membranas foram retiradas e o sangue dos tubos foi centrifugado a 750 g, por 15 minutos. A hemoglobina foi determinada pela adição de 1mL do sobrenadante em 1 mL de reagente de Drabkin (Sigma); depois de 15 minutos, a absorbância no comprimento de onda de 540 nm foi lido. A concentração de hemoglobina (HC) foi determinada

usando uma curva de calibração com hemoglobina humana (Sigma) e calculada pela Equação 13.

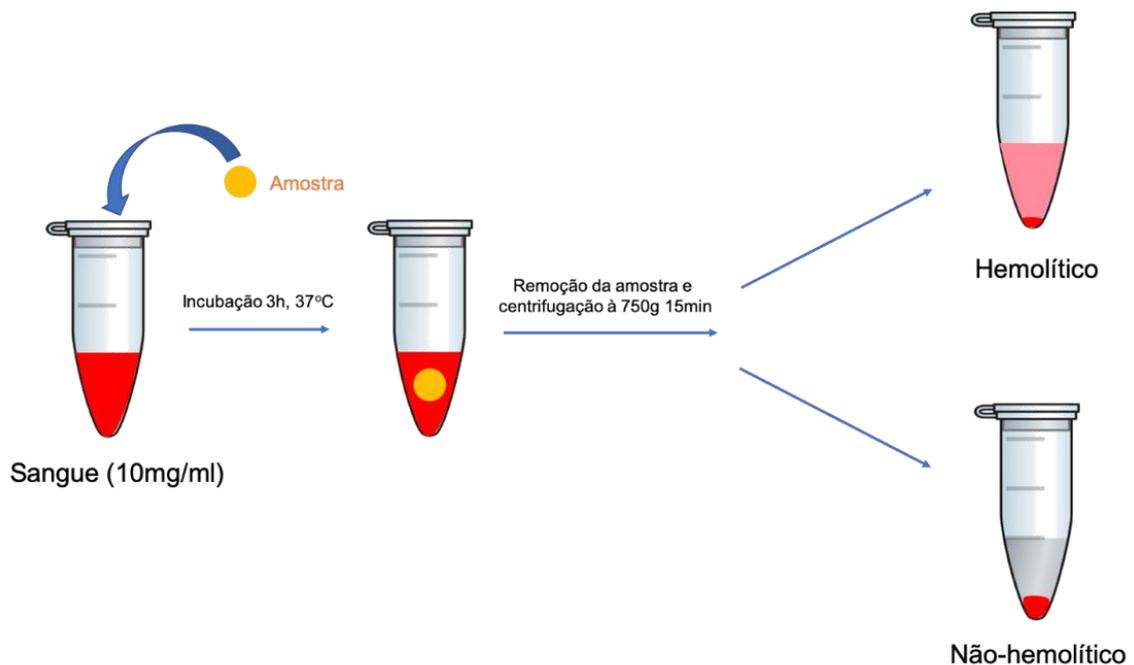
$$HC = A \times F \times d \quad (13)$$

onde A, é a absorbância; F a inclinação da curva de calibração; d o fator de diluição.

O índice hemolítico (HI) foi obtido pela equação 8, onde HC é a concentração de hemoglobina liberada no sobrenadante e HCt é a concentração total no tubo Falcon. Tampão PBS (livre de Ca e Mg) foi usado como controle negativo e água ultrapura como controle positivo. Como material de referência foi usado o curativo comercial de alginato de cálcio e sódio da Empresa Curatec (São José dos Campos, SP, Brazil).

$$HI(\%) = \frac{HC}{HCt} \times 100 \quad (14)$$

Figura 9 - Representação esquemática simplificada do ensaio de hemólise, ilustrando um resultado hemolítico e não hemolítico



4.6.2 Citotoxicidade

O teste de viabilidade celular foi realizado de forma indireta, que consiste na avaliação da citotoxicidade dos extrativos das amostras em contato com as células, segundo metodologia adaptada de QIU *et al.*, 2016.

Para a obtenção dos extrativos as amostras (1x1,4 cm²) foram colocadas em placas de 24 poços e 8 réplicas foram feitas. Posteriormente, 1mL do meio de cultura DMEM com 1% de penicilina-estreptomicina e 10% de soro fetal bovino foi adicionado sobre as amostras e então incubado por 24 horas à 37 °C, segundo a norma International Organization for Standardization, 10993-5 (2009) (BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES—PART 5: TESTS FOR IN VITRO CYTOTOXICITY, 2009). Após esse período, o extrato foi recolhido e armazenado em tubos Falcon sob refrigeração.

Para o ensaio de viabilidade celular, 100 µL de suspensão celular (10x10⁴ células/mL) de fibroblastos (Linhagem L929, passagem 18) e queratinócitos (HaCat) em meio DMEM com 1% de penicilina-estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (no caso dos queratinócitos 1mM piruvato de sódio no meio) foram adicionadas em cada poço de uma placa de 96-poços. As placas foram então incubadas por 24 horas à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade para adesão das células à superfície da placa. Depois desse período de incubação, o meio de cultura foi removido e substituídos por 100 µL dos extrativos das amostras, havendo um novo período de incubação por 24 e 48 horas nas mesmas condições. Após os tempos de incubação, os extratos foram removidos e os poços lavados uma vez com PBS estéril. Em seguida, 100 µL de meio de cultura contendo 10% (v/v) de MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium) foram adicionados e deixado em repouso por 4 horas à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Finalmente, o meio foi removido e os cristais formados foram dissolvidos pela adição de 100 µl de dimetilsulfoxido em cada poço. A absorbância (A) foi lida à 570 nm (em um espectrofotômetro (ELISA da BioRad, modelo 540). A viabilidade das células do grupo contendo o controle positivo foi ajustada para 100%.

Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular dado segundo a Equação 15. O grupo controle foi composto pelas células que só

receberam o meio DMEM com 1% de penicilina-estreptomicina e 10% de soro fetal bovino.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (15)$$

4.6.3 Atividade antibacteriana

Para comprovação da pureza e caracterização morfológica das estirpes isoladas, foi semeado material em ágar TSA para as bactérias provenientes de água doce e ágar TSA para as bactérias de água salgada e após o período de 24 horas de incubação, em estufa a 35°C, utilizou-se a técnica de coloração de Gram, que permite a classificação das bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas ou Gram negativas, baseado em sua reação aos corantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012);

Uma vez purificadas, as estirpes foram crescidas em ágar TSA Difco e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Após incubação, foi retirado material de colônia crescida e transferido para tubos contendo 9 mL de solução salina 0,85%. O conteúdo foi homogeneizado com ajuda de um agitador do tipo vórtex para a padronização de densidade de cada inóculo, de modo a se obter aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A absorbância de cada inóculo foi conferida em um espectrofotômetro (Micronal B542) com comprimento de onda de 625 nm.

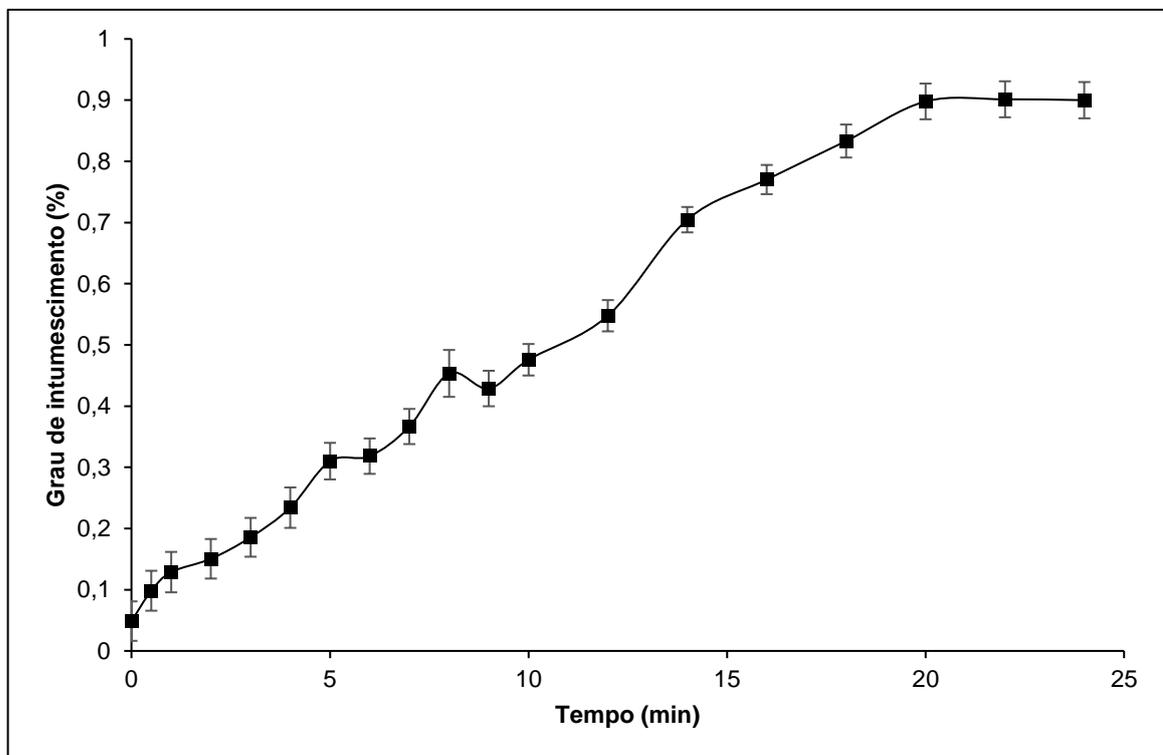
Em seguida, com o auxílio de um *swab* estéril, as culturas foram semeadas sobre toda a superfície das placas de Petri contendo Ágar *Muller-Hinton*. Os discos de CaAlg contendo papaína foram aplicados no meio com a ajuda de uma pinça estéril. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas, segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2016). Considerou-se que houve atividade antibacteriana na formação de alo superior a 2mm medido através de paquímetro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Intumescimento

Intumescimento em meio simulado (PBS) foi medido nesse trabalho pois é uma propriedade interessante para curativos, visto que o material deve ser capaz de absorver excesso de líquidos e exsudatos da ferida, uma característica ideal para os curativos que serão aplicados em ferimentos que podem possuir uma quantidade considerável de exsudato (MATTO; HUSAIN, 2009).

Figura 10 – Variação da massa (%) pelo tempo ao imergir as membranas de alginato em PBS



Observa-se (Figura 10) que a membrana é capaz de intumescer quase sua massa em 20 minutos, mostrando um alto grau de intumescimento. Isso mostra que a membrana constituída de hidrogel de alginato é capaz de absorver uma boa quantidade de fluido, o que para sua aplicação desejada irá proporcionar um meio mais adequado para a cicatrização (sem excesso de líquidos).

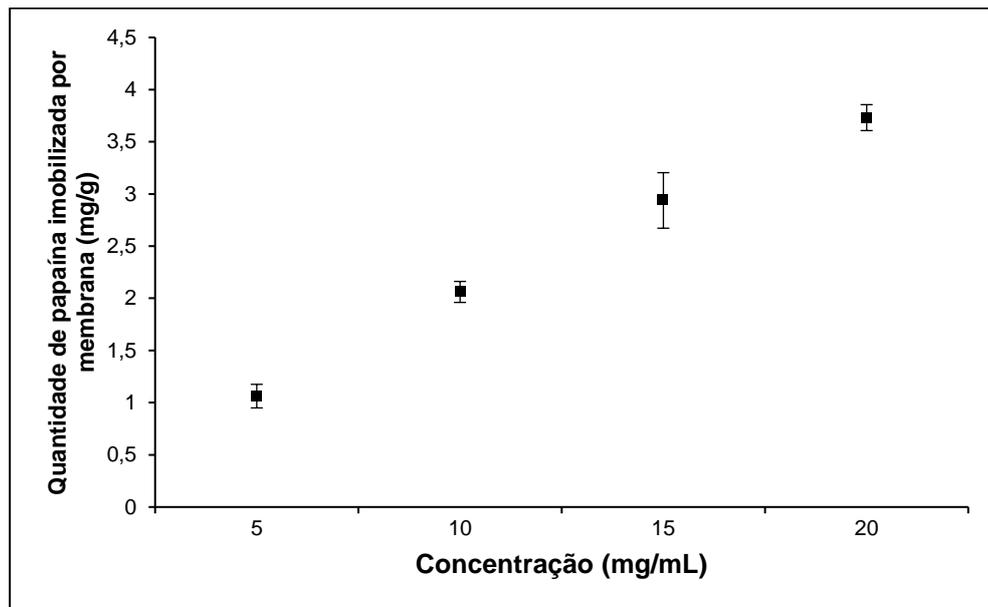
5.2 Imobilização enzimática

5.2.1 Otimização das condições de imobilização

5.1.1.1 Efeito da concentração inicial

A concentração de papaína na solução tampão fosfato foi variada (5, 10, 15 e 20 mg/ml) e seu efeito na adsorção da proteína foi estudado, através da razão entre a massa de enzima adsorvida e a massa de membrana de alginato (Figura 11).

Figura 11 – Influência da concentração de papaína na imobilização da enzima em membranas de CaAlg (n = 3)



Como mostrado na Figura 11, houve adsorção significativa na concentração de 20 mg/mL de solução de papaína com valor de capacidade adsortiva de 3,8 mg/g ($\pm 0,0067$), o que significa que 37,25% da papaína disponível foi imobilizada e foi escolhida como a melhor condição de concentração para a imobilização. A solução de 2,5% (m/l) de papaína não foi estudada devido a sua difícil solubilização em tampão citrato-fosfato.

Os resultados condizem com a equação de equilíbrio já que uma maior concentração de adsorbato [A] forçará o deslocamento do equilíbrio para uma maior formação de [AS].

Ao tirar a linha de tendência exponencial dos valores obtidos, obteve-se $K_F = 1,075$ e $n = 0,99$ com $R^2 = 0,99$, esse alto valor de R^2 mostra que a isoterma de Freundlich é aplicável. Na literatura, um maior valor de K_F significa maior adsorção e valores de $n > 1$ representam uma adsorção energeticamente favorável (SUDHA BAI; ABRAHAM, 2003). Quando $n = 1$, implica-se que não há interação entre o adsorbato e adsorvente e que a substância livre não tem preferência nem pelo adsorvente nem por ficar em solução.

Logo, a adsorção de papaína no alginato mostra-se favorável e o baixo valor de n mostra que a interação é fraca, sendo um fator promissor visto a aplicabilidade do curativo. A intenção é que essa enzima esteja disponível durante o tempo de aplicação do curativo, logo uma interação forte possivelmente faria com que parte da enzima não fosse utilizada no tratamento.

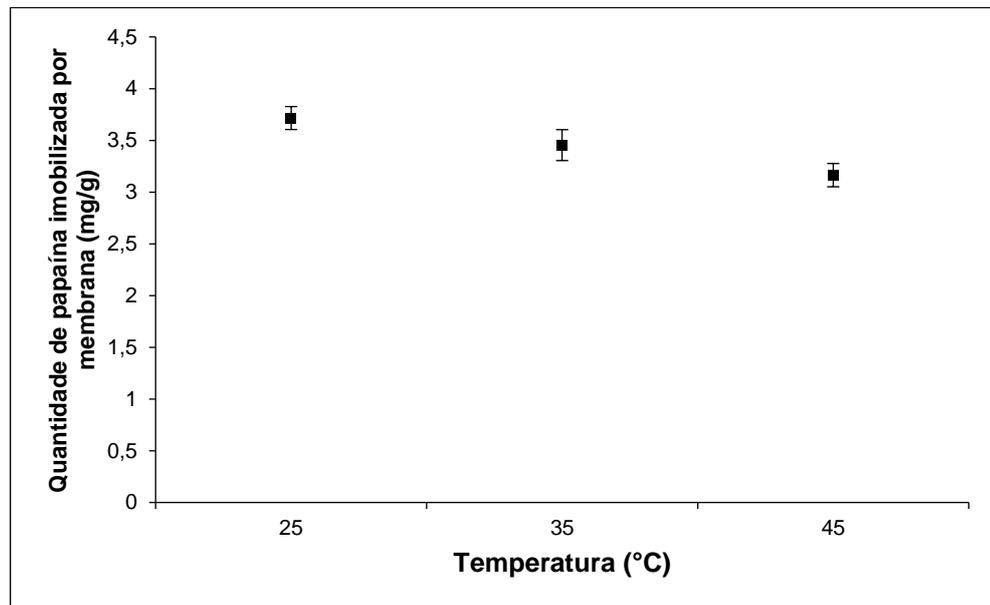
5.1.1.2 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura foi estudado ao variar a mesma durante a imobilização da enzima, usando as temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C e obteve-se na Figura 12.

O fenômeno da adsorção é um processo exotérmico, com isso, o aumento da temperatura dificulta a adesão da proteína na superfície da membrana. Isso acontece devido ao aumento da energia cinética das moléculas, onde ficam mais agitadas e menos predispostas a se depositar na superfície da matriz (MYERS, 2004).

É possível observar que o aumento da temperatura teve um efeito negativo na imobilização, onde a temperatura de 25°C obteve a maior capacidade adsortiva de 3,8 (mg/g) ($\pm 0,0062$). Esse valor representa 32,9% da papaína disponível para a imobilização e essa temperatura foi escolhida como a melhor para a imobilização.

Figura 12 – Influência da temperatura na imobilização de papaína (n = 3)



Calculando a entropia do processo usando a equação de Van't Hoff, obteve-se $\Delta H = - 6,32$ KJ. O valor negativo mostra que a adsorção de papaína em alginato é um processo exotérmico, então o aumento da temperatura dificulta o depósito das moléculas na matriz, uma vez que a agitação (energia cinética) também aumenta (MYERS, 2004).

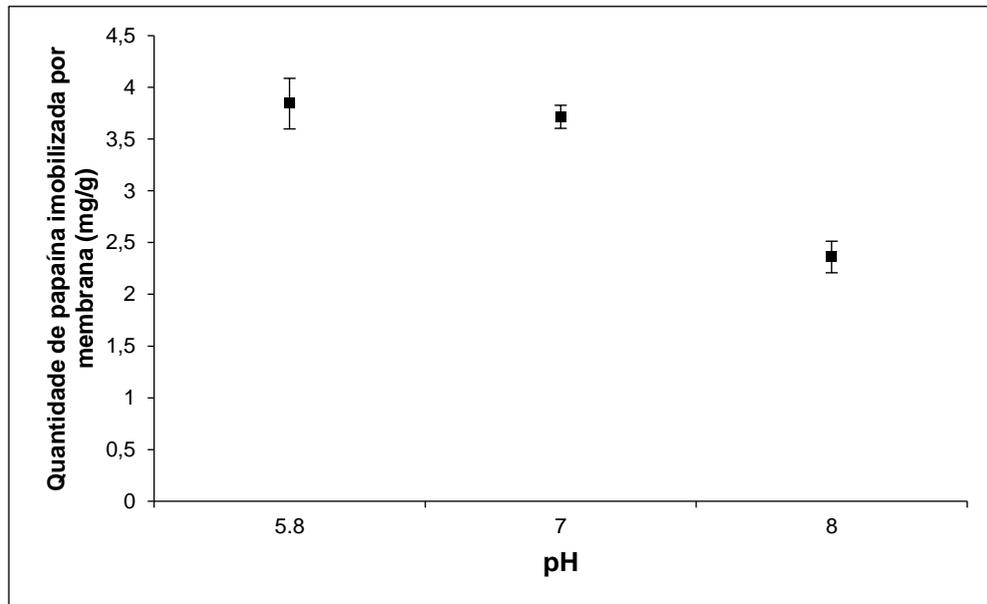
5.1.1.3 Efeito do pH

Pela natureza da adsorção, espera-se que o pH do meio tenha bastante influência na imobilização da enzima, já que a adsorção física acontece devido a atração eletrostática das partículas envolvidas e o pH tem efeito direto nas cargas das partículas (ORTEGA et al., 2009).

Como observado na Figura 13, o meio básico teve efeito negativo na capacidade adsortiva. Isso provavelmente ocorre devido ao acúmulo de cargas negativas nos grupos hidroxila do alginato e do ácido carboxílico da papaína o que

aumenta a repulsão do grupo, para pH maior de 7,0. (SANGEETHA; ABRAHAM, 2006).

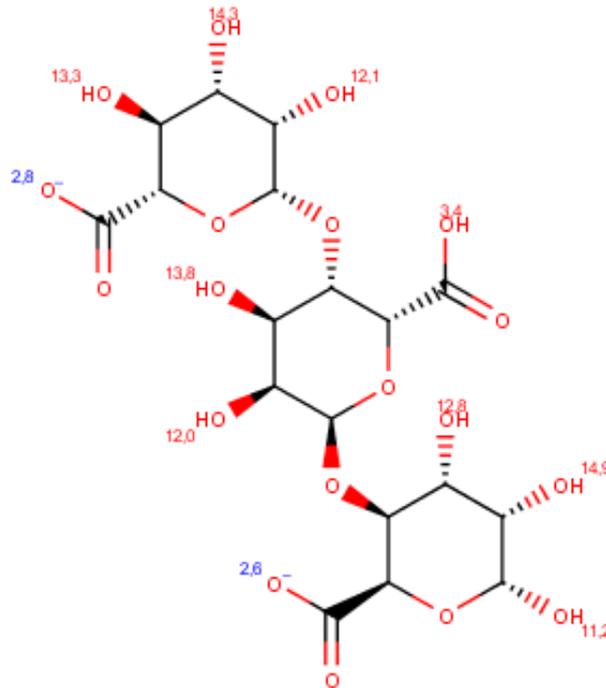
Figura 13 – Influência do pH na imobilização de papaína (n = 3)



A papaína possui um ponto isoelétrico de 9,5 (LI; XING; DING, 2007) o que significa que nos pH estudados a proteína se encontra carregada positivamente. Isso é ideal para uma interação mais forte com o grupo ácido carboxílico do alginato (CHAUDHARI; KAR; SINGHAL, 2015). Em contrapartida, a interação fica mais fraca ao aumentar a carga negativa (OH^-) do sistema, o que resultou em menor adsorção.

Como observado na Figura 14, os agrupamentos hidroxilas possuem pKa entre 11,2 e 14,3, o que ao aumentar o pH do meio, aumenta a desprotonação desses grupos, aumentando a carga negativa. Os grupos carboxílicos já se encontram completamente desprotonados, o que é fundamental para a interação com a amina da proteína.

Figura 14 – pKa dos grupamentos do alginato calculados através do software Marvin®



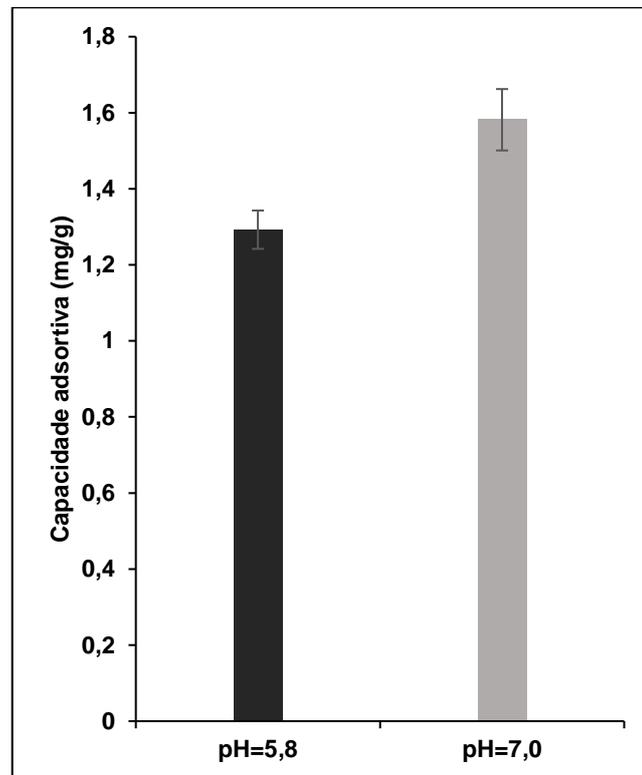
Já em meio ácido, há um acúmulo das cargas positivas (H^+) nos grupos $-COO^-$ do alginato (CHAUDHARI; KAR; SINGHAL, 2015), diminuindo a carga negativa da região o que diminui a interação entre o ácido carboxílico e a amina da proteína.

A melhor condição de imobilização foi meio neutro, onde supostamente houve maior adsorção, provavelmente devido ao balanço de cargas envolvidas. Mas estatisticamente não pode ser confirmado, visto o desvio padrão. A atividade enzimática também deve ser estudada nessas duas condições, já que é um fator primordial para a utilização da enzima.

5.2.2 Quantificação e rendimento de imobilização

Foi utilizado o método de Bradford para quantificar a proteína imobilizada nas melhores condições previamente estudadas. Trata-se de um método colorimétrico eficiente devido a especificidade da interação do reagente com a proteína.

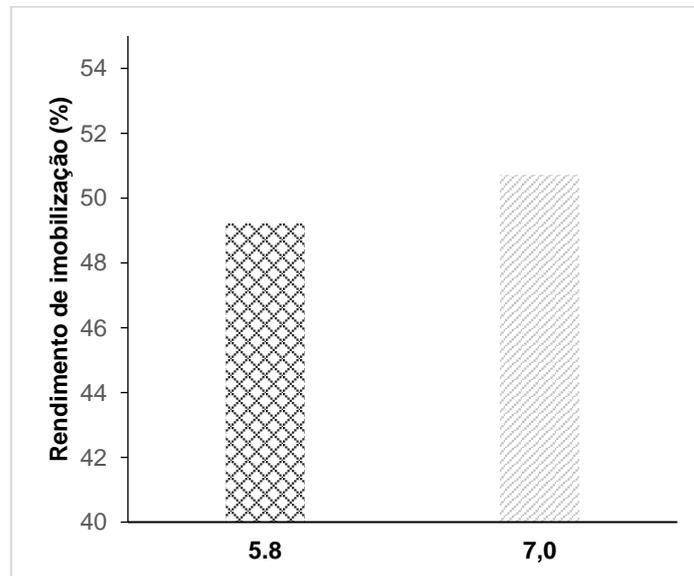
Figura 15 – Capacidade adsortiva em pH 5,8 e 7,0 de papaína em membranas de CaAlg quantificados através do método de Bradford (n = 3)



Com o teste de Bradford foi possível observar que há maior imobilização de proteína no pH=7, apresentando valor de capacidade adsortiva de 1,58 mg/g ($\pm 0,08$) em relação a 1,29 mg/g ($\pm 0,05$) no pH = 5,8.

Para melhor estudar o pH ideal de imobilização, pode-se observar o rendimento de imobilização nas duas condições (Figura 15). O pH = 7,0 teve um rendimento ligeiramente maior, com o valor de 50,7% ($\pm 0,026$) contra 49,2% ($\pm 0,002$) do pH 5,8. Apesar de próximos, houve pouca variância dos resultados apresentados. A atividade será o fator principal para a definição do melhor pH.

Figura 16 – Rendimento de imobilização da papaína nas membranas de CaAlg em pH 5,8 e 7,0.

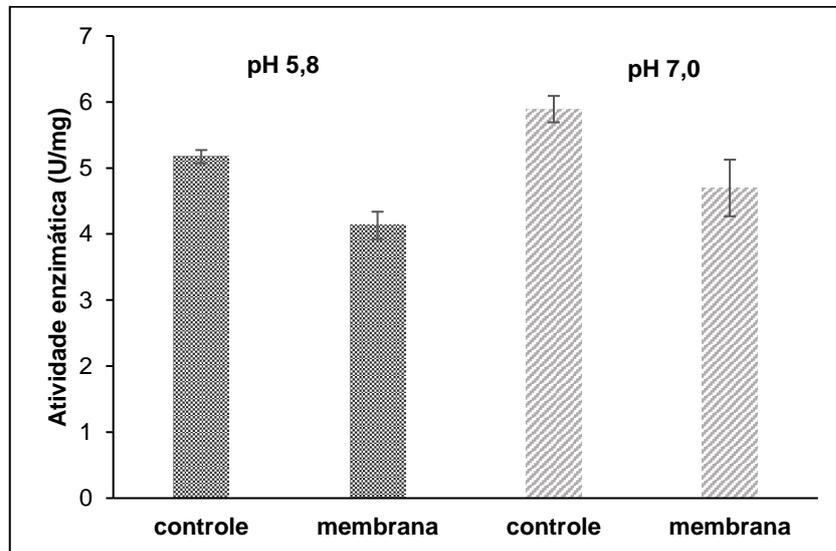


5.2.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática é um parâmetro fundamental para estudar a eficiência da imobilização, já que a enzima deve manter sua função proteolítica após a imobilização. A papaína possui faixa de atividade de pH entre 3,9 e 9 (TURK; TURK; TURK, 1997), logo os pH estudados se encontram dentro da faixa de atividade.

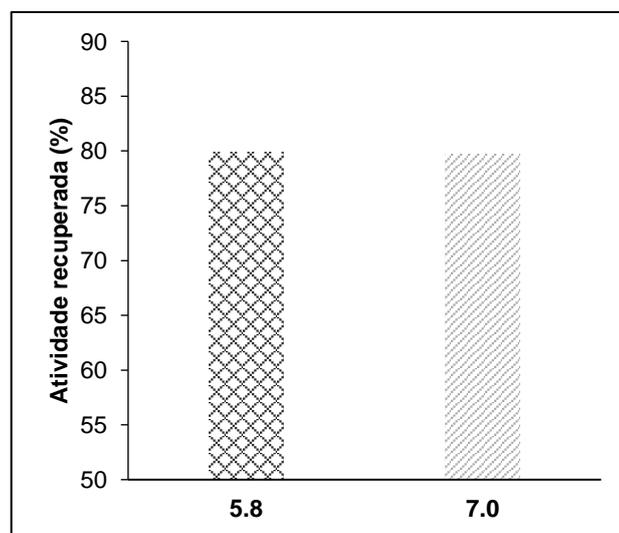
A Figura 17 mostra que a atividade da papaína livre em meio neutro foi ligeiramente maior do que em ácido (5,89 e 5,17 U/mg, respectivamente). Isso também foi observado pelos estudos de SANGEETHA; ABRAHAM, 2006, que estudaram várias faixas de pH e acharam em meio neutro a maior atividade dessa enzima.

Figura 17 – Atividade enzimática da papaína livre (controle) e imobilizada (membrana).



Analisando as atividades proteolíticas da papaína imobilizada nos dois pH testados, o mesmo fenômeno acontece em relação as enzimas livres, nos respectivos pH. Em meio neutro a enzima imobilizada obteve a maior atividade enzimática, apresentando valores de 4,13 U/mg ($\pm 0,58$) para o pH = 5,8 e de 4,7 U/mg ($\pm 0,73$) para pH neutro. Assim pH 7 foi considerado a melhor condição de pH para a imobilização.

Figura 18 – Atividade recuperada (%) da papaína imobilizada em relação a papaína livre



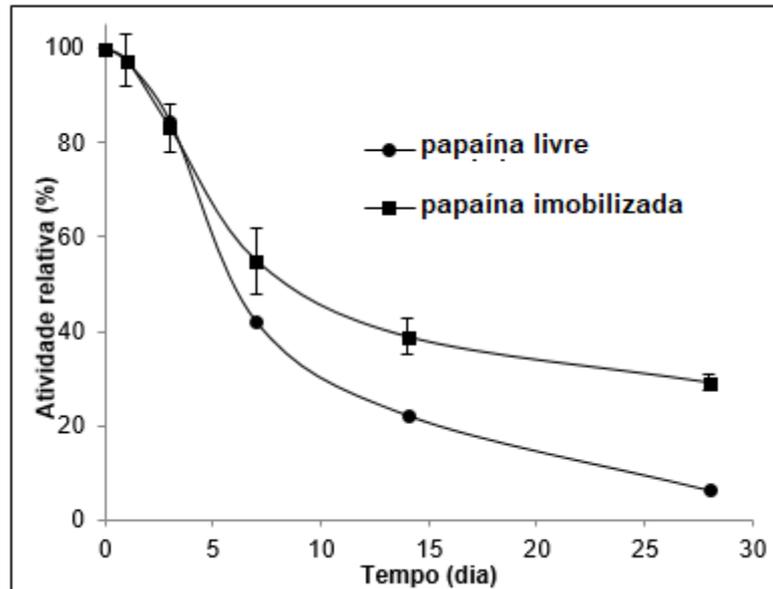
A Figura 18 apresenta a atividade recuperada (A_r) das duas condições. Em ambos os pH a enzima obteve A_r de aproximadamente 80%, ou seja, apenas 20% das enzimas foram desativadas. Esse valor ainda é inferior ao 87,21% encontrado por GU *et al.*, 2018 na imobilização de papaína em micropartículas de quitosana. Uma possível explicação para a diminuição da atividade, pode ser devido ao fato de que a dessorção (liberação) da enzima pela membrana seja lenta, como será visto no próximo tópico, e que 10 minutos de reação seja pouco para que toda a papaína presente tenha reagido. Porém, essa redução de 20% na atividade é satisfatória para o objetivo final e mostra que a enzima continua bastante ativa após a imobilização.

5.2.4 Estabilidade

A estabilidade da papaína livre e imobilizada foi avaliada ao longo de 28 dias de armazenamento a 4°C. Como mostrado na Figura 19, a enzima livre perdeu 94% de sua atividade inicial após 28 dias, enquanto a enzima imobilizada perdeu 70% no mesmo período de tempo. A estabilidade melhorada é provavelmente um resultado da prevenção da autólise e desdobramento das moléculas de papaína pela imobilização. Resultados semelhantes foram relatados por NIKOLIC *et al.*, 2010, que usaram tripsina imobilizada em fios de algodão.

Para aplicação clínica, o melhor momento para imobilizar a enzima seria imediatamente antes do uso no paciente. Kits com membranas e sais para o tampão seriam entregues em hospitais, por exemplo, e quando necessário, alguém imobilizava a enzima na membrana e usava como curativo. Por exemplo, em odontologia, o alginato é comumente usado como material de impressão e, antes de sua aplicação, o material é preparado de acordo com o instrutor do fabricante (NALLAMUTHU; BRADEN; PATEL, 2012).

Figura 19 – Estabilidade da papaína livre e imobilizada em membrana de CaAlg durante armazenamento a 4 °C, medida através da atividade enzimática



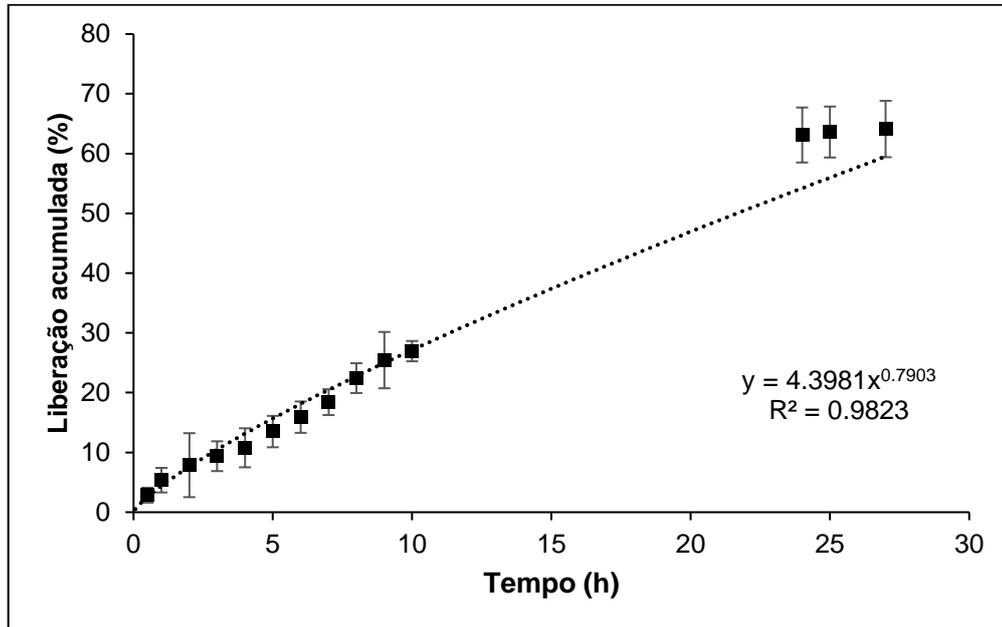
5.2.5 Célula de Franz

O estudo cinético *in vitro* é importante para avaliar como seria a liberação de papaína pela matriz polimérica em uma ferida.

Como mostrado na Figura 19, foi observado um gradiente lento no início. Depois de 24 horas, a liberação permaneceu constante e aproximadamente 65% da enzima foi liberada. Uma liberação mais lenta é interessante pelo prolongamento da ação da papaína na pele, além de garantir que durante o tempo de aplicação do curativo o mesmo esteja ainda bioativo, diminuindo também o número de trocas necessárias (BOATENG et al., 2008; THU; ZULFAKAR; NG, 2012).

A fim de determinar a cinética de liberação, o modelo de Korsmeyer-Peppas foi utilizado. Os parâmetros obtidos foram $k = 2,248$ e $n = 0,9354$ ($R^2 = 0,9521$). Como n foi menor do que 1 e superior a 0,5, a liberação é caracterizada como anômala, o que significa que há ação conjunta da difusão e intumescimento do material (mudança da estrutura na cadeia do polímero). A constante cinética foi baixa, demonstrando uma liberação lenta da papaína pela matriz polimérica.

Figura 20 – Teste de liberação *in vivo*. A liberação da papaína expressa em porcentagem considerando a massa total inicial (n = 4)



Aplicando outras equações cinéticas (4-6), obteve-se a seguinte tabela com os parâmetros.

Tabela 2 - Parâmetros obtidos utilizando os modelos cinéticos de liberação

Modelo	k	n	R ²
Zero ordem	3,7415		0,984
Primeira ordem	0,1048		0,781
Segunda ordem	0,007		0,404
Korsmeyer–Peppas	4.39	0.79	0,982

Conforme mostrado na Tabela 1, os modelos de ordem zero e Korsmeyer-Peppas foram os mais próximos dos dados coletados. Korsmeyer-Peppas foi usado porque dá um melhor entendimento sobre a cinética de liberação e propriedades do fenômeno (n depende do mecanismo de liberação).

5.3 Caracterização físico-química

5.3.1 Espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros das membranas de alginato de cálcio estão apresentados na Figura 22. Foram feitos espectros de antes da imobilização e depois para avaliar se houve mudança química no processo. A Tabela 3 mostra as bandas característica de cada ligação presentes no alginato e papaína, respectivamente.

Os espectros do alginato obtidos estão de acordo com a literatura (LAWRIE et al., 2007) com as ligações características do polímero aparecendo nas suas respectivas bandas (Tabela 1). Como esperado, o processo de autoclavagem não alterou a estrutura química da membrana, pois não há grande diferença entre os espectros.

Não foi observado nenhuma formação de ligação química no espectro do alginato com papaína, logo descarta-se a possibilidade formação de ligação (adsorção covalente) e a interação é de fato apenas eletrostática.

Figura 21 – Espectros obtidos por FTIR das membranas de CaAlg antes da imobilização (a) e depois da imobilização (b).

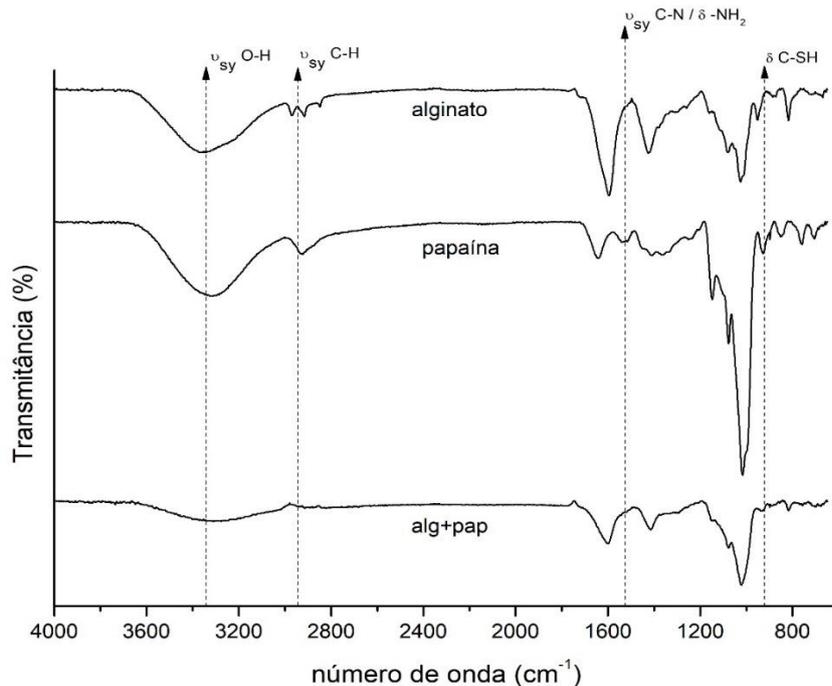


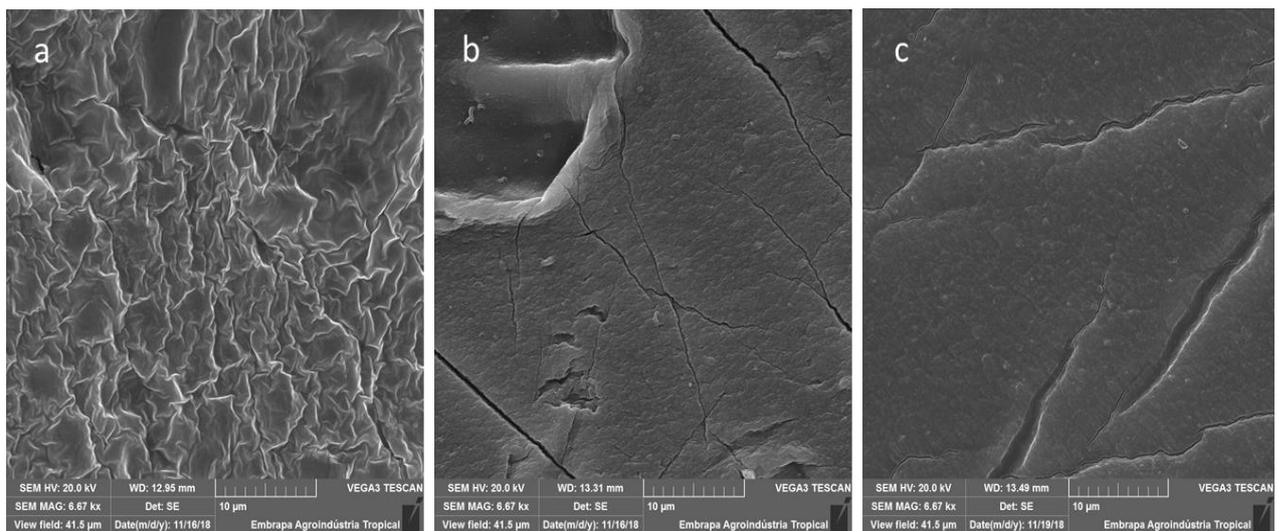
Tabela 3 – Bandas do FTIR do alginato e papaína com suas atribuições no espectro (LAWRIE et al., 2007; SANKALIA et al., 2005).

Alginato (cm ⁻¹)	Atribuição	Papaína (cm ⁻¹)	Atribuição
3500-3200	Estiramento O-H	3500-3200	Estiramento O-H
3000-2850	Estiramento C-H	3274	Estiramento N-H
1412	Deformação C-H	3000-2850	Estiramento C-H
1385	Deformação O-H	1640-1540	Deformação C=O-N-H
1347	Deformação C-O	1149-1020	Deformação C-S
1081-1027	Deformação C-O-C		
820	Deformação C-C		

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das membranas de alginato de cálcio estão mostradas na imagem de MEV (Figura 23).

Figura 22 – MEV da superfície da membrana de alginato de cálcio a) antes da autoclavagem, b) depois da autoclavagem e c) membrana de alginato de cálcio com papaína imobilizada.

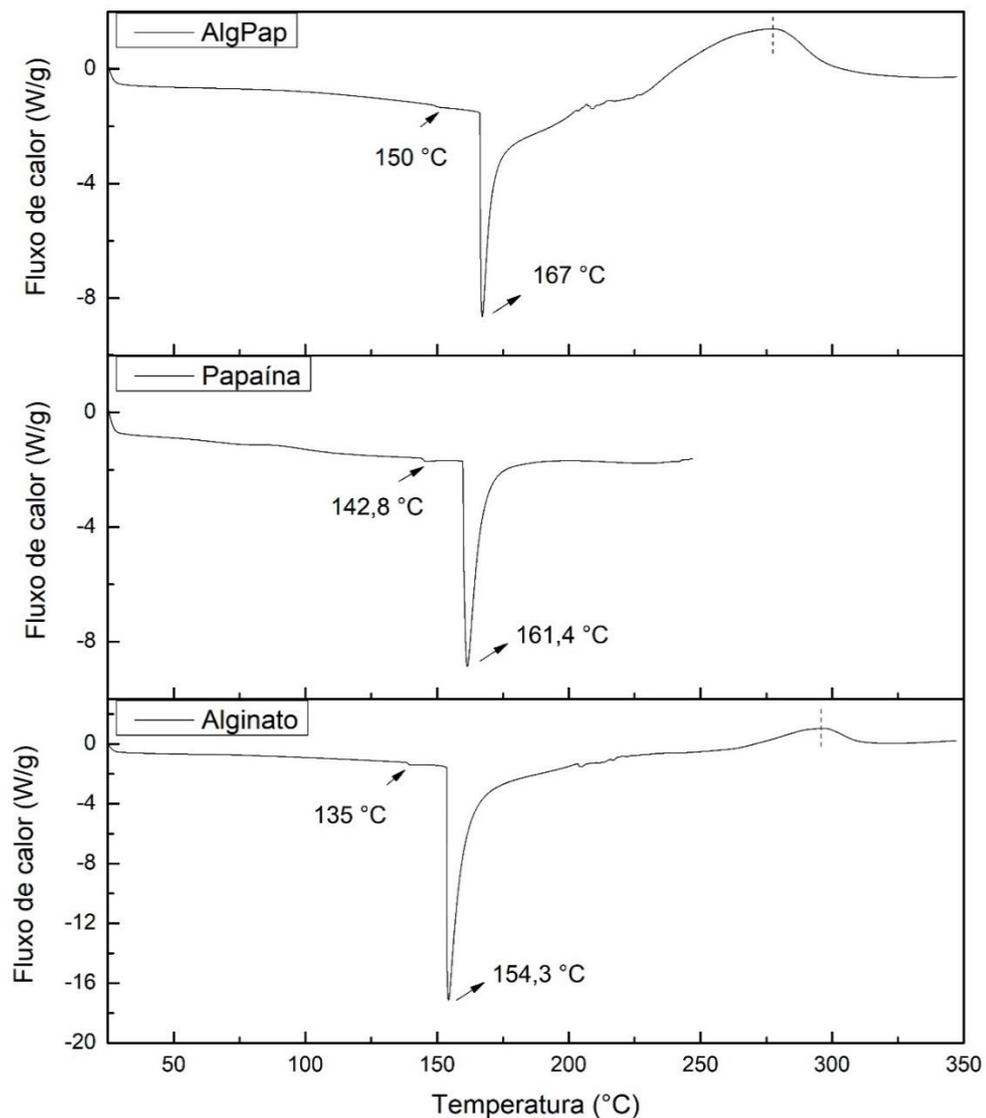


É possível verificar que o processo de autoclavagem compactou a estrutura da membrana, que antes era rugosa e passou para uma estrutura menos rugosa e com rachaduras. Não houve mudança estrutural aparente depois da imobilização da papaína.

5.3.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

DSC foi usado para investigar qualquer interação físico-química entre a droga e o polímero da matriz. O termograma DSC de alginato, papaína e alginato com papaína são mostrados na Fig. 23.

Figura 23 - Curvas DSC para amostras de alginato, papaína e CaAlg + papaína, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio



Um pico endotérmico ocorre freqüentemente em compostos orgânicos, e é atribuído à temperatura de fusão (T_m) (FAN et al., 2016). O segundo evento exotérmico ocorre em temperaturas superiores a $280\text{ }^\circ\text{C}$ e está relacionado à degradação da temperatura do alginato (T_d).

O alginato sofre três estágios de degradação térmica. Um pico endotérmico inicial próximo a $130\text{ }^\circ\text{C}$ está correlacionado com a perda de água nos grupos hidrofílicos do polímero que não foi removido durante a liofilização. O segundo pico endotérmico ocorreu em $T_m = 154,3\text{ }^\circ\text{C}$ devido à alteração da entalpia de fusão. Ocorreu a decomposição do polímero representada por um pico exotérmico em torno de $T_d = 300\text{ }^\circ\text{C}$. O pico exotérmico resultou das reações de degradação e despolimerização, muito provavelmente para a descarboxilação parcial dos grupos carboxílicos protonados e oxidação (EL-HOUSSINY et al., 2016) Resultados semelhantes foram observados por DUTRA *et al.*, 2017.

O primeiro evento endotérmico na curva de papaína está relacionado ao desdobramento da estrutura da enzima (desnaturação). As curvas DSC da papaína mostraram um aumento da estabilidade térmica confirmado pela medição da temperatura de desnaturação térmica aparente da papaína na ausência e presença de alginato (de $141,8\text{ }^\circ\text{C}$ a $151\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente) (SATHISH; KUMAR; PRAKASH, 2007). Além disso, o evento exotérmico ocorreu em temperatura mais baixa em comparação ao alginato sozinho por causa da presença da enzima, que degrada em temperatura mais baixa.

5.4 Ensaios biológicos

5.4.1 Hemólise

O estudo do contato do material com células sanguíneas é um ponto importante quando se pretende aplicar o material como compressa hemostática devido à um contato maior do material com o sangue do paciente. Neste caso a membrana seria aplicada em ferimentos com sangramento mais intenso e por isso o estudo foi realizado.

A Tabela 4 mostra os resultados do índice hemolítico (HI) para a membrana com e sem papaína. Um curativo comercial também foi testado para efeito de comparação. Foi observado que a membrana de alginato e o curativo comercial são considerados hemolíticos, segundo a norma (Tabela 5). No entanto, dependendo do tipo de ferida isso não limitaria a aplicação das membranas obtidas como curativo visto que o próprio curativo comercial é bastante hemolítico.

Tabela 4 – Resultados do ensaio hemolítico das membranas de CaAlg

Amostra	HI (%)
Membrana	
CaAlg	66
Curativo	59
CaAlg comercial*	
Membrana	0
CaAlg + papaína	
PBS (controle positivo)	0
<i>H₂O (controle negativo)</i>	
	93

*Curativo de alginato de cálcio e sódio da Empresa Curatec

Tabela 5 - Classificação do grau hemolítico (%) segundo a norma ASTM F756-00

Índice hemolítico (%)	Grau hemolítico
0-2	Não hemolítico
2-5	Levemente hemolítico
>5	Hemolítico

A Tabela 5 mostra os resultados do índice hemolítico (HI) para a membrana com e sem papaína. Um curativo comercial também foi testado para efeito de comparação. Foi observado que a membrana de alginato e o curativo comercial são

considerados hemolíticos, segundo a norma (Tabela 3). No entanto, dependendo do tipo de ferida isso não limitaria a aplicação das membranas obtidas como curativo visto que o próprio curativo comercial é bastante hemolítico.

A membrana com papaína imobilizada apresentou ser não hemolítica, pois seu índice hemolítico igual a zero, sendo uma característica promissora, já que as hemácias são responsáveis pelo transporte de oxigênio ao local e assim haverá trocas gasosas apropriadas, permitindo a neovascularização da área. A baixa oxigenação do tecido (hipóxia) é prejudicial pois prolonga a fase inflamatório, o que pode acarretar em infecções e enfraquecimento do novo tecido, além de retardar o fechamento da ferida (SIQUEIRA, 2001).

5.4.2 Citotoxicidade

A viabilidade celular é importante parâmetro biológico para entender o comportamento do material com as células. Fibroblastos fazem parte do sistema de cicatrização e são eles os responsáveis pela produção de colágeno, proteína constituinte das novas fibras formadas no processo de fechamento da ferida e queratinócitos são células presentes na epiderme que constitui 80% da pele (FALANGA, 1998) e por isso a citotoxicidade das membranas de alginato com e sem papaína foi avaliada pelo método indireto, no qual a viabilidade celular é medida após a exposição aos extratos das amostras.

Com os valores apresentados nas Figuras 24 e 25, é possível perceber que a membrana com papaína imobilizada apresentou pouca viabilidade celular em relação ao controle (células que estiveram em contato somente com o meio de cultivo e considerada como sendo 100% de viabilidade) e as amostras de CaAlg. Isso não necessariamente significa que a papaína é citotóxica, mas como os fibroblastos e queratinócitos aderem ao plástico da placa de cultura através de proteínas de adesão constituído principalmente de colágeno (SAED; ZHANG; DIAMOND, 2001). Provavelmente a papaína (uma protease) liberada pelo suporte digeriu essas proteínas de adesão e ocasionou o destaque das células do fundo do poço da placa, de modo semelhante à tripsina (enzima utilizada comumente na cultura de células

para promover o destacamento das células dos frascos de cultivo). Estes resultados são interessantes por confirmarem que a papaína mantém sua atividade proteolítica após liberação do suporte, o que indica que possivelmente esta proteína poderá atuar como agente ativo no processo de desbridamento de feridas da pele.

Os resultados também mostram que o CaAlg puro não apresentou citotoxicidade, pois obteve viabilidade de 81% e 93% em 24 horas. Esses resultados concordam com os experimentados por REZVANIAN, AMIN, SHIOW-FERN, (2016) que fizeram testes em fibroblastos e houve viabilidade de 83,2%. Segundo ISO 10993-5, (2009) a viabilidade celular superior a 80% significa que o material não é citotóxico, assim as membranas de CaAlg não são citotóxicas nas primeiras 24 horas. Enquanto os curativos de CaAlg encontrados comercialmente que obtiverem viabilidade de 53,3% neste mesmo tempo. No entanto, após 48h de exposição ao extrativo da membrana de CaAlg produzida a viabilidade celular baixou para cerca de 65% e 70%.

Figura 24 – Viabilidade celular (%) de fibroblastos em contato com os extrativos das amostras testadas. A viabilidade das células nos materiais testados é relativa ao controle.

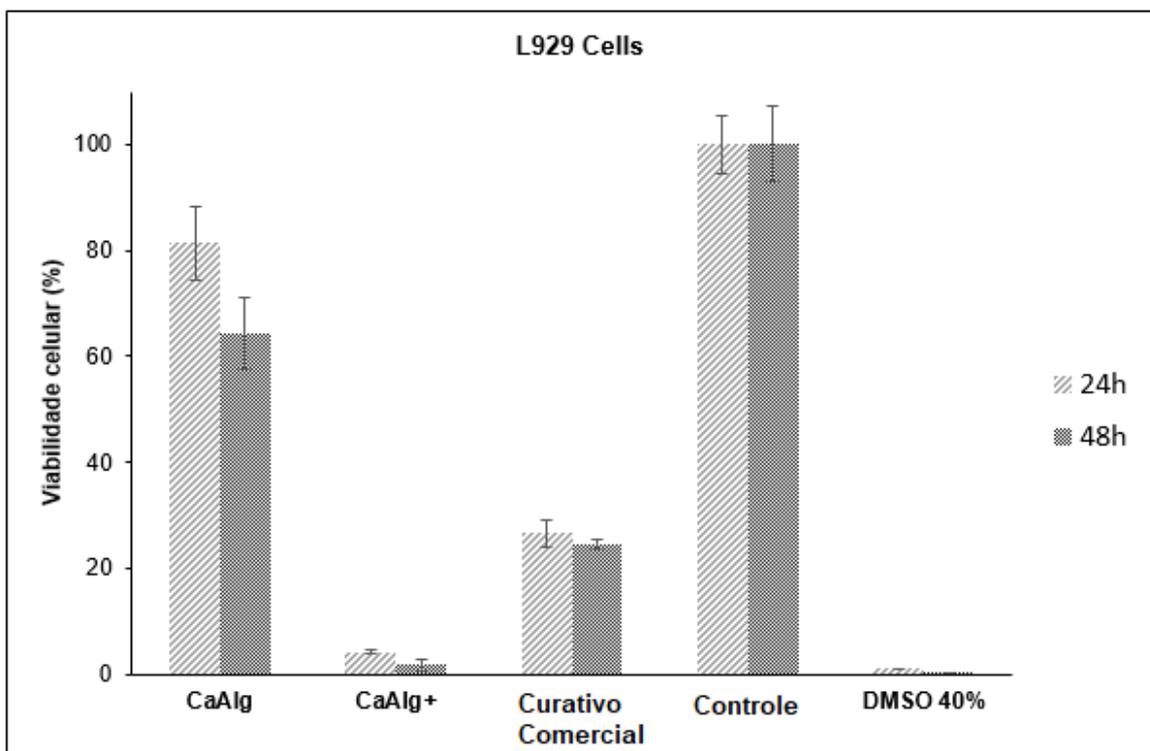
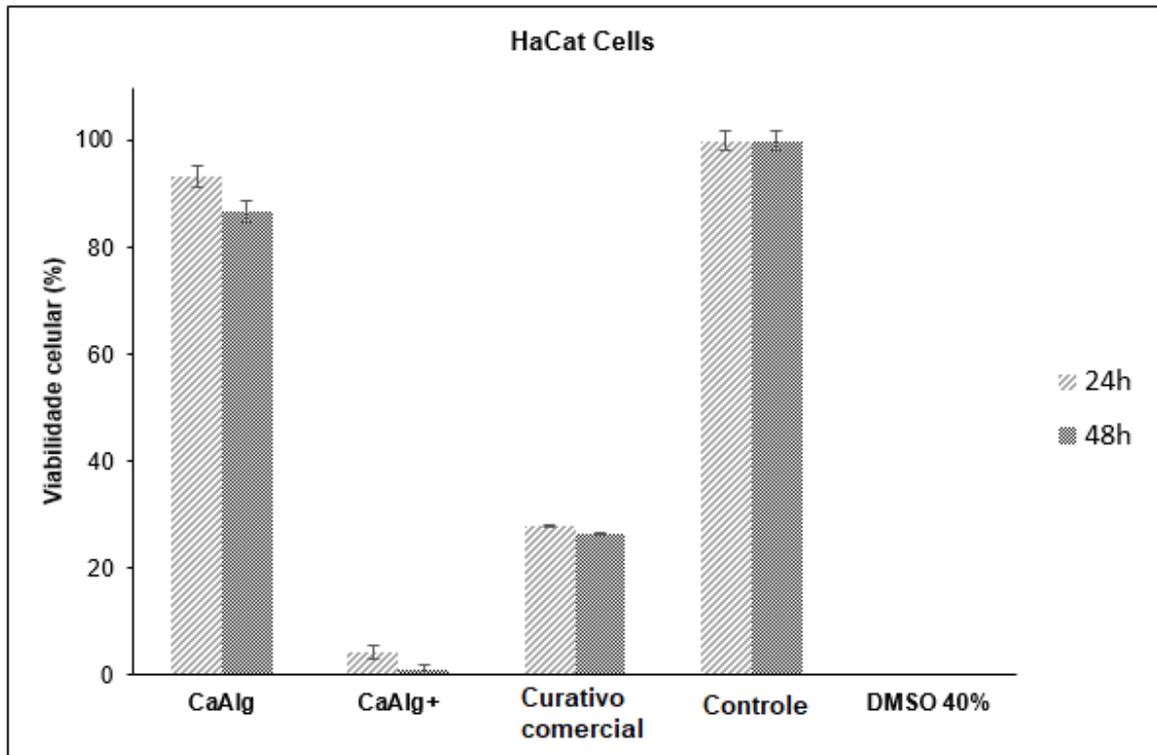


Figura 25 – Viabilidade celular (%) de queratinócitos em contanto com os extrativos das amostras testadas. A viabilidade das células nos materiais testados é relativa ao controle.



5.4.3 Atividade antibacteriana

Ensaio bacteriano foi realizado por disco, onde foi avaliada a formação de halo de inibição. Das quatro bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus mutans*), apenas a *S. mutans* formou halo de inibição visível.

Essas cepas são as mais utilizadas nos testes para determinar o efeito antimicrobiano de amostras. *E. coli* estão presentes no trato intestinal de animais e sua ocorrência é indicador de contaminação. *S. mutans* são bactérias causadoras de cáries e *P. aeruginosa* podem causar inflamações na pele ao se aproveitarem de feridas e queimaduras para se multiplicarem (HACHEM et al., 2007). *S. aureus* são bactérias gram positivas presentes na pele que podem causar desde pequenas infecções como acne e celulite, até infecções mais graves na epiderme, como furúnculos e impetigo, que são inflamações na pele que podem se espalhar para outras regiões (TENOVER; MCDONALD, 2005).

Essa seria uma grande vantagem da adição de papaína ao curativo de alginato, visto que trará uma propriedade antibacteriana fundamental para evitar inflamações.

Figura 26 – Placas de Petri contendo as quatro bactérias testadas e as amostras em discos de CaAlg com papaína, CaAlg (-) e antibiótico (+). Do lado esquerdo da figura estão as bactérias gram negativas (*E. coli* (superior) e *P. aeruginosa* (inferior)) e do lado direito estão as bactérias gram positivas (*S. mutans* (superior) e *S. aureus* (inferior))

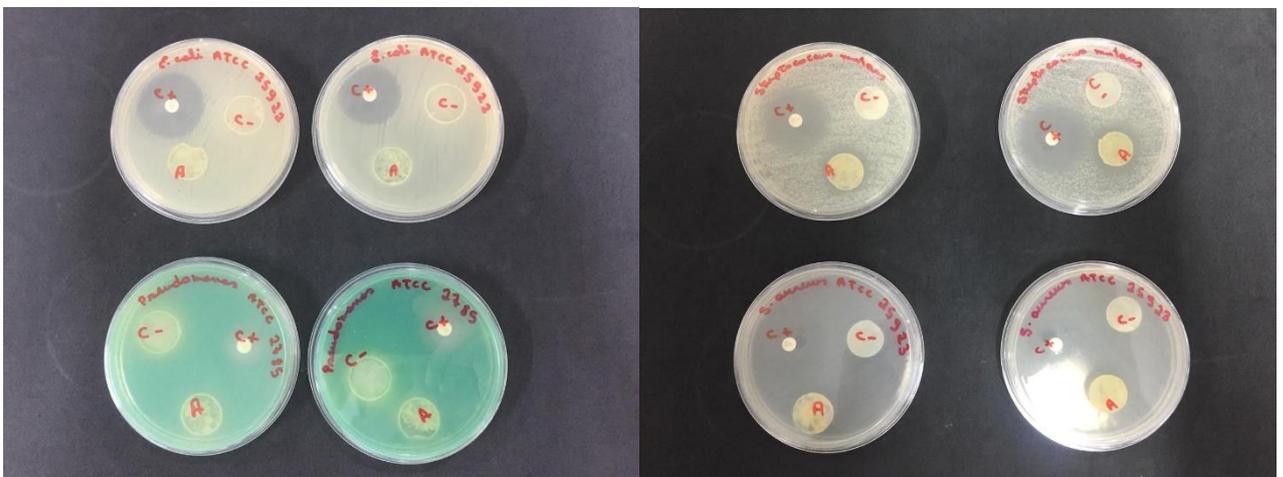


Tabela 6 – Formação de alo de inibição em bactérias. Sinal (–) significa que não houve formação de alo e (+) houve formação

Bactéria	Atividade bacteriana	
	AlgCa	AlgCa + papaína
<i>E. coli</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-
<i>S. mutans</i>	-	+

Todavia, no primeiro experimento houve contaminação da amostra e para confirmar que a inibição foi causada realmente pela presença de papaína, o experimento será refeito.

6 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a imobilização de papaína em membranas de alginato de cálcio é possível e que as condições otimizadas de imobilização ocorrem em meio neutro e temperatura de 25°C. A isoterma de adsorção mostrou também maior imobilização utilizando concentração inicial de solução de papaína 20 mg/mL. A imobilização obteve rendimento satisfatório, e o mais importante, a enzima continuou ativa após a imobilização com pouca desativação em relação a mesma em estado livre. Ao longo do tempo foi visto que a matriz polimérica protege a enzima de sua desativação. A liberação da droga pela matriz foi satisfatória, e obteve uma boa permeabilidade observada pela célula de Franz. Os testes de caracterização do material mostraram que não houve grande mudança na membrana antes e depois do processo de esterilização, fator importante para o produto final que deve ser comercializado de forma estéril, visto sua aplicação na área médica. Os testes de hemólise apontam que o material produzido não é hemolítico. Os ensaios com cultura de células mostraram que a papaína mantém a sua atividade proteolítica após liberação do suporte, apontando seu potencial como agente ativo no processo de desbridamento de feridas da pele. No entanto, ainda são necessários testes adicionais para uma completa avaliação da ação da papaína associada à membrana de alginato no processo de cicatrização de feridas.

De modo geral, os resultados aqui apresentados apontam para a obtenção de um bom biomaterial com propriedades interessantes para ser utilizado como curativo bioativo para o tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

- ALPAY, Pelin; UYGUN, Deniz Aktaş. Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 111, p. 56–63, 2015.
- AU - CUPP-ENYARD, Carrie. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. **JoVE**, [s. l.], n. 19, p. e899, 2008.
- BHATNAGAR, Monica; BHATNAGAR, Ashish. Wound Dressings from Algal Polymers. *In: Marine Algae Extracts*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. v. 2–2p. 523–556.
- Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. **International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland (ISO 10993-5)**, [s. l.], 2009.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CHAUDHARI, S. A.; KAR, J. R.; SINGHAL, R. S. Immobilization of proteins in alginate: Functional properties and applications. **Current Organic Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 17, p. 1732–1754, 2015.
- D'AYALA, Giovanna; MALINCONICO, Mario; LAURIENZO, Paola. Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. **Molecules**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2069–2106, 2008.
- DUTRA, J. A. P.; CARVALHO, S. G.; ZAMPIROLI, A. C. D.; DALTOÉ, R. D.; TEIXEIRA, R. M.; CARETA, F. P.; COTRIM, M. A. P.; ORÉFICE, R. L.; VILLANOVA, J. C. O. Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 113, p. 11–23, 2017.
- EL-HOUSSINY, A. S.; WARD, A. A.; MOSTAFA, D. M.; ABD-EL-MESSIEH, S. L.; ABDEL-NOUR, K. N.; DARWISH, M. M.; KHALIL, W. A. Drug–polymer interaction between glucosamine sulfate and alginate nanoparticles: FTIR, DSC and dielectric spectroscopy studies. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 25014, 2016.
- FALANGA, V. Wound healing and chronic wounds. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, 1998.
- FALANGA, Vincent. Wound bed preparation and the role of enzymes: A case for multiple actions of therapeutic agents. **Wounds**, [s. l.], v. 14, p. 47–57, 2002.
- FAN, Xin; GAO, Yue; HE, Wanying; HU, Hao; TIAN, Ming; WANG, Kexing; PAN, Siyi. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v.

151, p. 1068–1072, 2016.

FOGLER, H. Scott. **Elements of chemical reaction engineering**. 4th. ed. [s./.] : Forth edition. Upper Saddle River, N.J. : Prentice Hall PTR, [1999], 2005.

GASPAR-PINTILIESCU, Alexandra; STANCIUC, Ana-Maria; CRACIUNESCU, Oana. Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. /.], v. 138, p. 854–865, 2019.

GEORGE, Meera; ABRAHAM, T. Emilia. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**. Elsevier, 2006.

GU, Yan Jie; ZHU, Min Liang; LI, Yan Li; XIONG, Chun Hua. Research of a new metal chelating carrier preparation and papain immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. /.], v. 112, p. 1175–1182, 2018.

GURUNG, Shila; ŠKALKO-BASNET, Nataša. Wound healing properties of Carica papaya latex: In vivo evaluation in mice burn model. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. /.], v. 121, n. 2, p. 338–341, 2009.

HACHEM, Ray Y.; CHEMALY, Roy F.; AHMAR, Corine A.; JIANG, Ying; BOKTOUR, Maha R.; RJAILI, Georges Abou; BODEY, Gerald P.; RAAD, Issam I. Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cancer patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. /.], v. 51, n. 6, p. 1905–1911, 2007.

HENKELMAN, Sandra; RAKHORST, Gerhard; BLANTON, John; VAN OEVEREN, Willem. Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, [s. /.], v. 29, n. 5, p. 1650–1654, 2009.

JADHAV, Sanket H.; GOGATE, Parag R. Intensification in the activity of lipase enzyme using ultrasonic irradiation and stability studies. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. /.], v. 53, n. 4, p. 1377–1385, 2014.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, [s. /.], v. 20, p. 801–821, 2014.

KORSMEYER, Richard W.; GURNY, Robert; DOELKER, Eric; BURI, Pierre; PEPPAS, Nikolaos A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. /.], v. 15, n. 1, p. 25–35, 1983.

MYERS, Alan L. Thermodynamics of adsorption. *In*: LETCHER, Trevor (org.). **Chemical Thermodynamics for Industry**. [s./.] : The Royal Society of Chemistry, 2004. p. 243–253.

NALLAMUTHU, Navina A.; BRADEN, Michael; PATEL, Mangala P. Some aspects of the formulation of alginate dental impression materials—Setting characteristics and mechanical properties. **Dental Materials**, [s. /.], v. 28, n. 7, p. 756–762, 2012.

NASERI-NOSAR, Mahdi; FARZAMFAR, Saeed; SAHRAPEYMA, Hamed; GHORBANI, Sadegh; BASTAMI, Farshid; VAEZ, Ahmad; SALEHI, Majid. Cerium oxide nanoparticle-containing poly (ϵ -caprolactone)/gelatin electrospun film as a potential wound dressing material: In vitro and in vivo evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 81, p. 366–372, 2017.

NIKOLIC, Tanja; KOSTIC, Mirjana; PRASKALO, Jovana; PEJIC, Biljana; PETRONIJEVIC, Zivomir; SKUNDRIC, Petar. Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 976–981, 2010.

ORTEGA, Natividad; PEREZ-MATEOS, Manuel; PILAR, María C.; BUSTO, María D. Neutrase Immobilization on Alginate–Glutaraldehyde Beads by Covalent Attachment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 109–115, 2009.

PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends Biomater Artif Organs**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 18–23, 2004.

QIU, Yuyu; QIU, Liying; CUI, Jing; WEI, Qufu. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 59, p. 303–309, 2016.

RUSMINI, Federica; ZHONG, Zhiyuan; FEIJEN, Jan. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1775–1789, 2007.

SAED, Ghassan M.; ZHANG, Wendy; DIAMOND, Michael P. Molecular characterization of fibroblasts isolated from human peritoneum and adhesions. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 763–768, 2001.

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. Emilia. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 38, n. 3–6, p. 171–177, 2006.

SANKALIA, Mayur G.; MASHRU, Rajshree C.; SANKALIA, Jolly M.; SUTARIYA, Vijay B. Papain entrapment in alginate beads for stability improvement and site-specific delivery: Physicochemical characterization and factorial optimization using neural network modeling. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. E209–E222, 2005

SATHISH, H. A.; KUMAR, Parigi Ramesh; PRAKASH, V. Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 383–390, 2007.

SCHOUKENS, G. Bioactive dressings to promote wound healing. **Advanced Textiles for Wound Care**, [s. l.], p. 114–152, 2009.

SHAO, Yi; DANG, Minyan; LIN, Yukiati; XUE, Feng. Evaluation of wound healing activity of plumbagin in diabetic rats. **Life Sciences**, [s. l.], v. 231, p. 116422, 2019.

SINGH, Durgeshwer; SINGH, Rita. Papain incorporated chitin dressings for wound debridement sterilized by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, [s. l.], v. 175, p. 109077, 2020.

I.], v. 81, n. 11, p. 1781–1785, 2012. DOI: 10.1016/J.RADPHYSICHEM.2012.06.010.

SUDHA BAI, R.; ABRAHAM, T. Emili. Studies on chromium(VI) adsorption–desorption using immobilized fungal biomass. **Bioresource Technology**, [*s. I.*], v. 87, n. 1, p. 17–26, 2003.

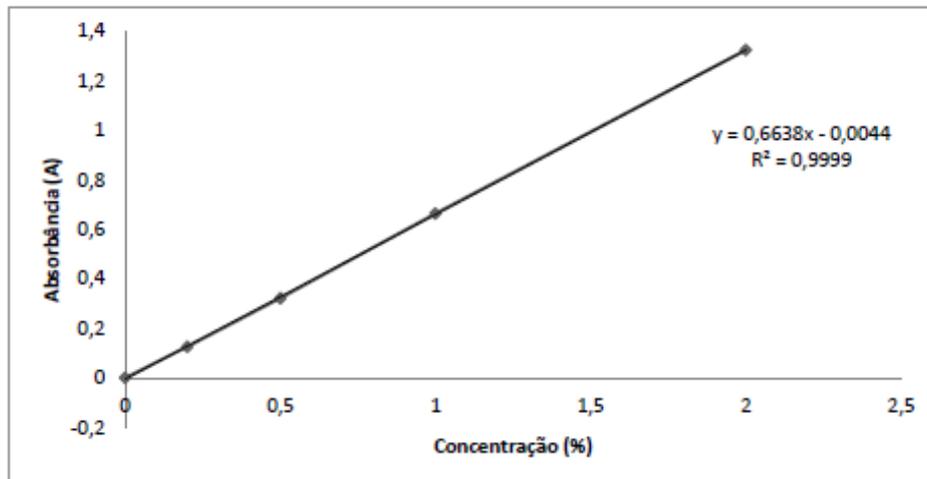
TANG, Yadong; LAN, Xingzi; LIANG, Chengfeng; ZHONG, Zhixin; XIE, Rongtao; ZHOU, Ying; MIAO, Xiaomin; WANG, Han; WANG, Wenlong. Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, [*s. I.*], v. 219, p. 113–120, 2019.

TENOVER, Fred C.; MCDONALD, L. Clifford. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [*s. I.*], v. 18, n. 4, p. 300–305, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12th. ed. Porto Alegre.

TURK, Boris; TURK, Vito; TURK, Dušan. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biological Chemistry**, 1997.

VAKILIAN, Saeid et al. A Keratin-based biomaterial as a promising dresser for skin wound healing. **Wound Medicine**, [*s. I.*], v. 25, n. 1, p. 100155, 2019.

APÊNDICE A - CURVA PADRÃO PARA A PAPAÍNA

APÊNDICE B - CURVA PADRÃO PARA O REAGENTE DE BRADFORD EM BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA)

