INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ POLIMÉRICA PARA
INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE PAPAÍNA**

GISLAINE ZULLI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientadora:

Dra. Monica Beatriz Mathor

SÃO PAULO

2007

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ POLIMÉRICA PARA
INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE PAPAÍNA**

GISLAINE ZULLI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientadora:

Dra. Monica Beatriz Mathor

SÃO PAULO

2007

*Este trabalho é dedicado a todos que participaram direta ou
indiretamente de sua realização.*

À minha família, pelo apoio e incentivo constantes.

*Aos meus queridos amigos, pela força e pelo suporte que me deram
durante todo este período.*

A você, Fernando, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda de muitas pessoas.

À Dra Monica Mathor, obrigada pelo exemplo de profissional ética que sempre foi. Obrigada por todo apoio e compreensão.

À Dra Patrícia Lopes, obrigada pela oportunidade de conhecer o fantástico mundo da pesquisa e por todo apoio.

Ao Dr Lugão, obrigada por todo suporte e pela grande contribuição dados durante a realização deste projeto.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

À Sizue Rogero, à Dra Maria Valéria Velasco, à Dra Telma Kaneko e ao Dr Humberto, obrigada pelo importante suporte dado para a realização deste trabalho.

À Lígia Miyamaru, do Instituto Adolfo Lutz, muito obrigada pela gentileza em nos auxiliar na parte experimental.

À Dra Marisa Herson e ao Dr César, do Hospital das Clínicas, muito obrigada pelo esforço em nos fornecer as amostras de pele humana.

À Claudinéia Pinto, muito obrigada pela disposição em me ensinar e me ajudar em todos os momentos em que precisei de seus conhecimentos.

À Gabriele Ruas, obrigada pela ajuda e pelo companheirismo na fase inicial deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Mara e Nadia, muito obrigada pela amizade, pelo carinho, compreensão e ajuda nos momentos difíceis. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos felizes também. Ao tio Olegário, muito obrigada pelo carinho e dedicação de pai.

Aos meus queridos amigos Vivian, Michele, Tércio, Susana, Kelly, Juliano e Daniela, muito obrigada pela amizade, pelo carinho e pelo apoio e incentivo constantes.

Obrigada aos amigos Sousa, Renata, Roberta, Bruna, Lígia e Sirlene, do Laboratório de Biomateriais – IPEN, pelo carinho e apoio.

Obrigada André e Eremita, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, pela contribuição dada para a realização deste trabalho.

Obrigada à Dra Mitiko Yamura, Dra Maria Cláudia, Cláudia, Andréa Rodas, Cristina, Heloísa, Cidinha e Luísa, do IPEN, pelo apoio.

Obrigada Lucas, Paloma, Fernando (Mig), Fábio (Pererê) e Cristiane (Cris) pela gentileza de nos ajudar sempre na parte experimental. Lucas e Mig, obrigada pelo exemplo, carinho e amizade.

Henrique, obrigada por confiar em mim e no meu trabalho. Obrigada pelo apoio e compreensão valiosos.

Que Deus abençoe todos vocês.

DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ POLIMÉRICA PARA INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE PAPAÍNA

Gislaine Zulli

RESUMO

A papaína é uma enzima proteolítica extraída do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto. Tem sido amplamente utilizada como agente debridante de escaras e cicatrizante de feridas. No entanto, apresenta baixa estabilidade, o que limita seu uso a formulações de manipulação extemporânea ou de curto prazo de validade. O objetivo deste trabalho foi incorporar a papaína em uma matriz polimérica de modo a obter um sistema de liberação controlada do fármaco. Polímeros de aplicação médica foram selecionados e inicialmente avaliados quanto à sua citotoxicidade. Os polímeros não-citotóxicos foram submetidos ao ensaio de irritação cutânea primária *in vivo* em animais, para avaliar sua capacidade de causar irritação na pele humana. Diversas membranas foram preparadas com os polímeros considerados adequados para aplicação biomédica para incorporação da papaína. As membranas preparadas com 2% de papaína foram selecionadas para serem submetidas ao ensaio de liberação com células de difusão de Franz. Parte dessas membranas foi irradiada com raios γ na dose de 25 kGy para esterilização do material. As membranas irradiadas e não-irradiadas foram testadas simultaneamente a fim de verificar se a radiação γ interferiria no perfil de liberação do fármaco. Os resultados do ensaio de liberação indicaram que o fármaco é liberado de maneira constante durante as 12 horas iniciais do experimento. A análise, por Microscopia Eletrônica de Varredura, das membranas irradiadas revelou que as membranas formadas são bastante densas e que seus poros são pequenos.

DEVELOPMENT OF A POLYMERIC MATRIX FOR INCORPORATION AND CONTROLLED RELEASE OF PAPAIN

Gislaine Zulli

ABSTRACT

Papain is a proteolytic enzyme extracted from the latex of green papaya leaves and fruits. It has been widely used as debridant for scars and wound healing agent. However, papain presents low stability, which limits its use to extemporaneous or short shelf life formulations. The purpose of this study was to entrap papain into a polymeric matrix in order to obtain a drug delivery system. Polymers of medical application were selected and firstly assessed for cytotoxicity. Non-cytotoxic polymers were evaluated for primary cutaneous irritation test *in vivo* in animals, in order to verify if they are able to cause irritation to human skin. Many membranes were prepared with the polymers considered suitable for biomedical application for papain entrapment. Membranes containing 2% papain were selected to be evaluated in the releasing test using Fanz diffusion cells. Some of these membranes were irradiated by γ rays with 25 kGy dose for material sterilization. Irradiated and non-irradiated membranes were simultaneously assessed in order to verify if γ radiation interferes on drug releasing profile. Results obtained from releasing test indicated the drug is released in a constant manner over 12 hours in the beginning of the experiment. Scanning Eletronic Microscopy analysis of the irradiated membranes revealed that membranes are very dense and its pores are small.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 A pele e suas funções	15
3.1.1 A epiderme.....	16
3.1.2 A derme.....	18
3.2 Absorção percutânea	19
3.3 Cicatrização.....	21
3.4 Papaína	23
3.4.1 Propriedades e aplicações da papaína	25
3.5 Polímeros	27
3.5.1 Interação da radiação eletromagnética com a matéria e sua ação sobre polímeros.....	27
3.5.1.1 Aplicações biomédicas dos polímeros.....	30
3.5.1.1.1 Propriedades das membranas de silicone.....	33
3.6 Sistemas transdérmicos de liberação controlada	34
3.6.1 Difusão através de membranas	39
3.6.1.1 Primeira Lei de Fick.....	39
3.6.1.2 Segunda Lei de Fick.....	40
3.6.2 Liberação de fármacos	42
3.6.2.1 Princípios de difusão na pele	43
3.6.3 Avaliações cinéticas de STLC.....	43
3.6.4 Desenvolvimento e otimização de STLC.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Materiais	45
4.1.1 Matérias-primas.....	45
4.1.2 Reagentes	46
4.1.3 Materiais.....	46
4.1.4 Equipamentos.....	46
4.2 Métodos	47
4.2.1 Seleção e preparo das membranas poliméricas para os testes de ...	47
4.2.2 Teste de Citotoxicidade	47
4.2.3 Ensaio de Irritação Cutânea Primária.....	50
4.2.4 Teste de incorporação máxima de papaína	52
4.2.5 Preparo das membranas poliméricas contendo papaína	52
4.2.6 Curva analítica.....	54
4.2.7 Ensaio de liberação em Célula de Franz	55
4.2.8 Ensaio de doseamento com substrato específico	57
4.2.9 Análise do tamanho dos poros das membranas por Microscopia Eletrônica de Varredura	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Teste de Citotoxicidade.....	59
5.2 Ensaio de Irritação Cutânea Primária	60

5.3	<i>Teste de incorporação máxima de papaína.....</i>	<i>61</i>
5.4	<i>Preparo das membranas poliméricas contendo papaína.....</i>	<i>61</i>
5.5	<i>Ensaio de Liberação e Doseamento com Substrato Específico.....</i>	<i>63</i>
5.6	<i>Análise do tamanho dos poros das membranas por Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	<i>70</i>
6	<i>Discussão</i>	<i>74</i>
7	<i>CONCLUSÕES.....</i>	<i>81</i>

LISTA DE FIGURAS

	Página
<i>FIGURA 1 – Esquema das camadas da pele.</i>	16
<i>FIGURA 2 - As rotas pelas quais os fármacos penetram na pele e exemplos de substâncias medicamentosas disponíveis para o tratamento de afecções das várias camadas da pele.</i>	21
<i>FIGURA 3 – Domínio L da papaína.</i>	23
<i>FIGURA 4 – Domínio R da papaína.</i>	24
<i>FIGURA 5 – Sítio ativo da papaína.</i>	25
<i>FIGURA 6 – Etapas de uma reação de polimerização induzida por radiação gama..</i>	29
<i>FIGURA 7 - Ilustração diagramática de uma Célula de difusão de Franz.....</i>	44
<i>FIGURA 8 - Esquema da distribuição dos extratos das amostras e dos controles na microplaca.....</i>	49
<i>FIGURA 9 – Representação da microplaca de 96 poços indicando a distribuição das amostras.....</i>	54
<i>FIGURA 10 - Viabilidade celular em função da concentração dos extratos ds membranas preparadas com os Polímeros SM e SB.</i>	59
<i>FIGURA 11 - Viabilidade celular em função da concentração dos extratos dsa membranas preparadas com os Polímeros LBNB e AA.</i>	60
<i>FIGURA 12 - Região dorsal de animal submetido ao Ensaio de Irritação Cutânea Primária com o polímero SM.....</i>	61
<i>FIGURA 13 – Aspecto da Membrana 13, feita com o polímero SM.</i>	62
<i>FIGURA 14 – Membrana-controle feita com o polímero SM.</i>	62
<i>FIGURA 15 - Formação de grumos após a incorporação da papaína ao adesivo acrílico.....</i>	62
<i>FIGURA 16 – Formação de coágulo após a incorporação da papaína no LBNB.....</i>	62
<i>FIGURA 17 – Filme da Membrana 9 formado sem resistência mecânica.....</i>	63
<i>FIGURA 18 – Filme da Membrana 11 irradiada com 25 kGy formado sem resistência mecânica.....</i>	63
<i>FIGURA 19 – Curva analítica da papaína.</i>	64
<i>FIGURA 20 – Média dos valores obtidos para as réplicas das Membranas-controle durante os ensaios com as Membranas 13 irradiada e não-irradiada.....</i>	65
<i>FIGURA 21 – Perfil de liberação das três réplicas da Membrana 13 não-irradiada. ...</i>	66
<i>FIGURA 22 – Perfil de liberação das três réplicas da Membrana 13 irradiada.</i>	67
<i>FIGURA 23 – Média dos valores obtidos para as três réplicas das Membranas 13 irradiada e não-irradiada.</i>	68
<i>FIGURA 24 – Concentração acumulada de papaína liberada a partir das Membranas 13 irradiada e não-irradiada nos intervalos de coleta da célula de Franz.....</i>	69
<i>FIGURA 25 – Estrutura da matriz polimérica da Membrana 13 irradiada e seu respectivo controle analisados por MEV.</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Adesivo acrílico

LBNB – Látex de borracha natural bicentrifugado

SB – Dispersão de silicone bicomponente

SLCT – Sistema transdérmico de liberação controlada

SM – Dispersão de silicone monocomponente

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo de reparo tecidual feito à custa da proliferação do tecido conjuntivo fibroso, no qual o tecido preexistente é substituído por uma cicatriz fibrosa (Montenegro, 2004).

O debridamento de ferimentos é um importante mecanismo de auxílio à cicatrização, sendo uma etapa essencial no tratamento de escaras, por exemplo. Esse mecanismo é realizado por enzimas proteolíticas, que liquefazem o tecido necrótico, facilitando sua separação do tecido sadio e favorecendo o processo de cicatrização (Mc Grath, 1988).

A papaína é uma enzima proteolítica isolada do látex das folhas e dos frutos do mamão verde adulto (*Carica papaya* Linné) (O'Neil, 2001). Segundo Monetta (1987, 1988, 1990), o látex do mamão verde é utilizado para cicatrização de feridas há muito tempo por tribos da América, África e ilhas do Caribe. O valor terapêutico da papaína é especialmente reconhecido no tratamento de ferimentos de difícil recuperação (Mc Grath, 1988; Monetta, 1987; Monetta, 1988).

No entanto, apesar de sua ampla utilização como agente debridante e cicatrizante, a papaína apresenta baixa estabilidade, o que dificulta sua comercialização em uma forma farmacêutica definida.

Velasco (1993) padronizou um gel de papaína 0,4% p/v, para aplicação diária em pacientes com abscessos e úlceras de decúbito, com estabilidade durante até 60 dias. No entanto, a forma farmacêutica gel não oferece proteção contra agentes externos e, como citado, a estabilidade da papaína permanece relativamente baixa.

Uma opção encontrada para utilizar a papaína como agente cicatrizante que aumente sua estabilidade e permita seu uso em uma forma farmacêutica estabelecida é desenvolver um sistema tópico de liberação controlada.

De maneira geral, de acordo com Sinha & Trehan (2003), as complexidades bioquímicas e estruturais das proteínas utilizadas como fármacos, comparadas àqueles convencionais, torna o desenvolvimento de formulações para liberação de proteínas terapêuticas uma tarefa desafiadora e muito difícil.

O desenvolvimento de um sistema de liberação controlada requer, inicialmente, uma seleção criteriosa dos polímeros a serem testados como matriz

polimérica. Para serem utilizados no preparo de dispositivos biomédicos, esses materiais precisam ser avaliados quanto à sua citotoxicidade e quanto à capacidade de causar reações cutâneas (Rogerio et al., 2003; Ministério da Saúde, 2002). Uma vez preparadas as membranas com o fármaco incorporado, realiza-se o ensaio de liberação utilizando células de difusão de Franz, para avaliar o perfil de liberação do fármaco a partir da matriz e verificar a viabilidade comercial do sistema (Guimarães, 2001; Lopes, 1999).

2 OBJETIVOS

Os objetivos propostos neste projeto são:

- Avaliar a citotoxicidade de polímeros potenciais para incorporação da papaína;
- Selecionar os polímeros não-citotóxicos para avaliar o potencial irritante para o ser humano;
- Avaliar a capacidade de incorporação da papaína nesses polímeros;
- Avaliar o perfil de liberação da papaína a partir das membranas selecionadas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A pele e suas funções

Para que se compreenda a dinâmica da penetração e absorção de fármacos na pele e o modo como nela agem, é imprescindível conhecer as estruturas e a fisiologia desse fantástico órgão.

A pele, o maior órgão do corpo humano, interage com a mucosa dos tratores respiratório, digestivo e urogenital formando uma cápsula que protege as estruturas internas, do corpo, do meio externo (Barry, 1983).

É responsável por desempenhar diversas funções que podem ser resumidas, de forma geral, pela atuação como a primeira proteção do organismo contra as agressões do ambiente. A pele saudável constitui uma barreira mecânica, densa e relativamente seca que impede que microrganismos penetrem e atinjam as camadas viáveis, causando infecção. Constitui ainda a principal barreira química que controla tanto a perda de água, eletrólitos e outros constituintes do organismo, como a entrada de substâncias nocivas provenientes do ambiente externo (Banga & Chien, 1993; Barry, 1983). É capaz de filtrar a radiação ultravioleta, especialmente a compreendida entre 290 e 400 nm, que abrange os raios UVA e UVB, minimizando prejuízos como queimaduras solares, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. A pele também tem um papel importante na termorregulação: lança mão de artifícios como a vasoconstrição periférica ou a sudorese em ambientes frios e aquecidos, respectivamente, para manter a temperatura corporal isotermicamente em torno de 37 °C. A função mecânica da pele é a responsável pelo confinamento dos tecidos subjacentes e pelo controle de seus movimentos (Barry, 1983). Além dessas, a pele tem muitas outras funções, cuja citação e explicação fogem dos objetivos deste trabalho.

Um homem de cerca de 70 kg tem uma área superficial de pele de 1,8 m² e em cada centímetro quadrado encontram-se 10 folículos pilossebáceos, 12 nervos, 15 glândulas sebáceas, 100 glândulas sudoríparas, 3 vasos sangüíneos com 92 cm de comprimento total, 360 cm de nervos e 3 X 10⁶ células (Lubowe, Wells e Lubowe citados por Barry, 1983, p.1-2).

A pele humana compreende basicamente dois tecidos distintos, mas mutuamente dependentes. A epiderme — a camada mais externa, estratificada e

avascular — e a derme, a camada mais interna formada de tecido conectivo. Uma terceira região histologicamente distinta, a hipoderme, subjacente à derme, pode ainda ser identificada e constitui um verdadeiro reservatório de energia armazenada na forma de lipídeos, especialmente como triglicerídeos (Barry, 1983; Baumann & Weisberg, 2002). As camadas da pele humana estão ilustradas na FIG. 1.

FIGURA 1 – Esquema das camadas da pele.

Fonte: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/8912.htm. Acesso em 2 julho 2004. Traduzido pela autora.

3.1.1 A epiderme

A epiderme é uma camada multilaminada cuja espessura varia de acordo com o tamanho e o número de camadas de células, sendo cerca de 0,8 mm nas palmas e plantas e 0,06 mm nas pálpebras (Barry, 1983). As subcamadas da epiderme, partindo da mais interna para a superfície, são: camada basal ou estrato germinativo, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo.

A camada basal contém células tronco epidérmicas não diferenciadas, nucleadas, colunares, que estão ligadas por pontes citoplasmáticas intercelulares. É uma região de constante mitose e responsável pela renovação da epiderme que ocorre a cada 28 dias, em média, em um indivíduo saudável. Essas células se destacam da membrana basal e migram para a superfície com o compromisso de

diferenciar-se, sofrendo uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas conforme vão atravessando o tecido. Essa especialização celular progressiva tem como propósito preparar os queratinócitos para a fase final da diferenciação, a cornificação, que produz a barreira epidérmica inerte, o estrato córneo. Sua proliferação controla a perda de células córneas mortas, mantendo a espessura da epiderme constante (Barry, 1983; Harding et al., 2000). É perdida, aproximadamente, uma camada de células por dia (Banga & Chien, 1993).

As células do estrato espinhoso são poligonais, mais achatadas e o núcleo é reduzido. Apresentam prolongamentos citoplasmáticos na forma de espinhos que formam pontes entre as células adjacentes chamadas desmossomos, os quais são responsáveis pela manutenção da integridade da epiderme. Entre esses prolongamentos há um espaço preenchido com tecido fluido que separa as células vizinhas e permite que nutrientes e oxigênio difundam-se em direção às demais camadas da epiderme (Barry, 1983). Os corpos lamelares, reconhecidos como o primeiro sinal de queratinização, surgem no estrato espinhoso. Esses grânulos contêm lipídeos como ceramidas, ácidos graxos e colesterol, além de proteases, fosfatases ácidas, lípases e glicosidases (Baumann & Weisberg, 2002).

Na camada granulosa encontram-se queratinócitos em intensa atividade bioquímica e mudança morfológica. As células produzem grânulos de querato-hialina, que contêm pró-filagrina, o precursor da filagrina. A filagrina é a proteína que une os filamentos de queratina, conferindo força e estrutura (Baumann & Weisberg, 2002). Esta é, de fato, uma zona de transição entre células vivas e células mortas repletas de queratina (Barry, 1983).

O estrato lúcido é uma camada fina, translúcida e anatomicamente distinta que existe imediatamente acima da camada granulosa apenas nas palmas das mãos e plantas dos pés (Barry, 1983).

Para desempenhar a função barreira, a principal função da pele, e evitar a desidratação por controlar a TEWL (*Transepidermal Water Loss* ou perda transepidérmica de água), a epiderme sofre um processo de diferenciação para formar uma barreira delgada e capaz de reter água, chamada estrato córneo (Harding et al., 2000). Nas áreas do corpo em geral o estrato córneo é constituído por 10 a 15 camadas de células anucleadas, compactas, planas, desidratadas e queratinizadas, dispostas lado a lado como escamas, denominadas corneócitos

(Barry, 1983; Chien, 1987a). Os corneócitos são compostos basicamente de filamentos de queratina ligados por pontes dissulfeto envolvidos por um envelope cornificado formado por proteínas altamente ligadas à isopeptídeos. Em uma pele saudável, os corneócitos maduros também contêm altas concentrações de uma mistura de compostos hidrossolúveis de baixa massa molar que se ligam à água e evitam a desidratação do tecido pela ação do ambiente, chamado de Fator de Hidratação Natural ou *Natural Moisturizing Factor* (NMF). Envolvendo os corneócitos está a matriz intercelular, composta essencialmente de proteínas e lipídeos altamente estruturados, extrusados dos corpos lamelares, que constitui uma barreira efetiva à perda de água (Baumann & Weisberg, 2002; Harding et al., 2000). O estrato córneo tem um conteúdo de água de apenas 20% em comparação com o nível normal e fisiológico de 70% na camada basal. Em virtude disso, os corneócitos são fisiologicamente inativos (Barry, 1983; Chien, 1987a).

A interação entre a superfície protéica hidrofílica dos corneócitos e a lamela lipídica hidrofóbica extracelular é possível graças à presença de lipídeos covalentemente ligados à superfície externa do envelope cornificado. A integridade total do estrato córneo é dependente da força de coesão dada pelos corneodesmossomos, que são estruturas protéicas intercelulares (Harding et al., 2000).

Segundo Barry (1983), a camada córnea tem um papel crucial no controle da absorção percutânea de substâncias farmacologicamente ativas.

3.1.2 A derme

A derme constitui essencialmente uma matriz de tecido conectivo formado por proteínas fibrosas, sendo cerca de 75% delas colágeno, 4% elastina e 0,4% reticulina, dispostas em uma sustância amorfa de mucopolissacarídeo (Wilkes *et al.* citado por Barry, 1983, p. 7). Possui de 3 a 5 mm de espessura sendo, portanto, responsável pelo volume da pele (Barry, 1983).

A porção superior da derme é conhecida como derme papilar, sendo a camada imediatamente inferior à epiderme e que apresenta maior densidade de elementos vasculares. A derme reticular, por sua vez, possui maiores feixes de fibras colágenas (Baumann & Weisberg, 2002).

A derme abriga os fibroblastos, células responsáveis pelo reparo da pele lesada. A capacidade de cicatrização deve-se à formação e secreção de colágeno por essas células na forma de seu precursor solúvel, o tropocolágeno (Barry, 1983). Os resíduos de prolina na cadeia do tropocolágeno são convertidos em hidroxiprolina pela enzima prolil-hidroxilase, em uma reação dependente de Fe^{2+} , vitamina C e α -cetoglutarato (Baumann & Weisberg, 2002). As moléculas de tropocolágeno agregam-se formando filamentos (compostos de três a cinco moléculas), microfibrilas e então fibrilas. Feixes de fibrilas, por sua vez, agrupam-se para formar as fibras colágenas (Barry, 1983).

A pele humana é rica em fibras elásticas, estruturas caracterizadas pela elasticidade que conferem ao tecido. Essas fibras estão reunidas em feixes de microfibrilas compostas de fibrilina. A fibrilina forma um molde, sobre o qual a elastina é depositada (Baumann & Weisberg, 2002). As fibras elásticas estão localizadas na periferia dos feixes de fibras colágenas e formam uma rede estrutural na derme e, juntamente com o colágeno, respondem pelas propriedades mecânicas dos tecidos conectivos (Barry, 1983; Baumann & Weisberg, 2002).

A derme requer um grande aporte sangüíneo para permitir a passagem de nutrientes e a remoção de metabólitos. Em um adulto de porte médio, a pele recebe cerca de um terço de todo o sangue que circula no corpo (Chien, 1987a). O farto suprimento sangüíneo faz com que substâncias químicas capazes de penetrar o estrato córneo e atingir a epiderme viável sejam prontamente absorvidas e diluídas sistemicamente (Barry, 1983), como é o caso dos fármacos administrados pela via transdérmica.

O volumoso aporte sangüíneo dérmico mantém as *sink conditions*, que têm como efeito a garantia da absorção das moléculas do fármaco de forma que sua concentração na derme mantenha-se próxima de zero, fazendo com que o gradiente de concentração através da epiderme seja máximo (Barry, 1983).

3.2 Absorção percutânea

Uma vez em contato com a pele, um fármaco com menos de 500 Dalton (Bos & Meinardi, 2000), em geral, pode penetrar o estrato córneo através das seguintes rotas: via transepidérmica e via anexos cutâneos. No primeiro caso,

o fármaco pode atravessar os corneócitos através de uma micro rota denominada transcelular, mais utilizada por substâncias hidrossolúveis, ou penetrar o estrato córneo deslocando-se através do cimento intercelular, a micro rota intercelular (De Polo, 1998).

A absorção de fármacos via anexos cutâneos contribui muito pouco com o perfil cinético global da permeação transdérmica, embora a permeação de substâncias, especialmente as hidrossolúveis, seja mais rápida por essa via do que através do estrato córneo íntegro. As palmas das mãos e as plantas dos pés são ricas em glândulas sudoríparas e são as partes menos permeáveis do corpo humano. Portanto, a permeação transdérmica de moléculas neutras no estado de equilíbrio é feita principalmente por um processo de difusão passiva através do estrato córneo íntegro na região interfolicular (Chien, 1987a; De Polo, 1998).

As rotas e micro rotas de penetração de fármacos estão representadas na FIG. 2.

FIGURA 2 - As rotas pelas quais os fármacos penetram na pele e exemplos de substâncias medicamentosas disponíveis para o tratamento de afecções das várias camadas da pele.

Fonte: Bentley (1994), adaptado de Barry, 1983, p. 32.

3.3 Cicatrização

A cicatrização de feridas é o resultado de uma série de eventos altamente coordenados, iniciada pela formação de um coágulo de fibrina seguida pelo recrutamento de células inflamatórias, formação de tecido de granulação com angiogênese, proliferação de fibroblastos e migração de queratinócitos, contração da derme e remodelagem da cicatriz (Roh & Lyle, 2006). Em resumo, a cicatrização é um processo de reparo tecidual feito por meio da proliferação do tecido conjuntivo fibroso, no qual o tecido preexistente é substituído por cicatriz fibrosa (Montenegro, 2004). O debridamento é um mecanismo importante para o

reparo de ferimentos realizado por enzimas proteolíticas que liquefazem o tecido necrótico, facilitando sua separação do tecido sadio e favorecendo a cicatrização (Mc Grath, 1988).

Existem dois tipos de cicatrização: cicatrização por primeira intenção e cicatrização por segunda intenção. A primeira ocorre em casos de incisões cirúrgicas limpas não-infectadas, cujas bordas são aproximadas por suturas. A lesão provoca a morte de um número limitado de células epiteliais e do tecido conjuntivo, além da ruptura da continuidade da membrana basal epitelial. A reação inflamatória é mais branda e ao final do processo observa-se uma cicatriz formada por tecido conjuntivo destituído de infiltrado inflamatório recoberto por uma epiderme intacta (Cotran *et al.*, 2000).

Cicatrização por segunda intenção ocorre quando há uma perda extensa de células e tecido que deve ser preenchida, como na ulceração inflamatória, formação de abscesso e em feridas superficiais que geram grandes defeitos. Observa-se uma reação inflamatória mais intensa e são necessárias a regeneração das células parenquimatosas e a formação de um tecido de granulação abundante para completar o reparo tecidual. Grandes feridas de superfície podem sofrer contração, um efeito possivelmente causado pela presença de miofibroblastos, que resulta na redução do tamanho da lesão ao final do processo cicatricial (Cotran *et al.*, 2000). A papaína é uma enzima muito utilizada nesses casos, pois age reduzindo a inflamação e acelerando o processo de cicatrização. Segundo Flindt (1978), a papaína age apenas no tecido lesado devido à ausência da α 1-anti-tripsina, uma anti-protease plasmática que impede a ação proteolítica da papaína em tecidos normais.

Bernard e colaboradores (2003) identificaram no estrato córneo humano uma protease até então desconhecida, pertencente à família da papaína, denominada SCCL (Stratum Corneum Cathepsin-L-like Protease). Os pesquisadores verificaram que a protease degrada as corneodesmosinas, um dos componentes dos corneodesmosomos, favorecendo o processo de descamação epidérmica.

3.4 Papaína

A papaína é uma enzima proteolítica isolada do látex das folhas e dos frutos do mamão verde adulto, *Carica papaya* Linné (O'Neil, 2001). Sua forma é elipsoidal, com dimensões aproximadas de 5,0 x 3,7 x 3,7 nm e apresenta massa molar de 23.350 (Kamphuis *et al.*, 1984; Sasmito *et al.*, 1982). É constituída de apenas uma cadeia polipeptídica, composta de 212 resíduos de aminoácidos, que é dobrada para formar dois domínios, L e R (Zhuang & Butterfield, 1991) (FIG. 3 e 4, respectivamente). O domínio L apresenta basicamente estrutura secundária em α -hélice, enquanto o domínio R está principalmente na conformação de β -folha anti-paralela (Kamphuis *et al.*, 1984).

FIGURA 3 – Domínio L da papaína.

FIGURA 4 – Domínio R da papaína.

Entre os domínios forma-se um profundo vale, onde se encontra o sítio ativo da enzima. Os resíduos Cys-25, His-159 e Asp-158 constituem o sítio ativo (FIG. 5). O resíduo Cys-25 tem o grupo sulfidríla essencial, que permanece livre na enzima ativa, enquanto outros seis resíduos de cisteína formam entre si pontes dissulfeto que estabilizam a conformação tridimensional da molécula (Kamphuis et al., 1984; Zhuang & Butterfield, 1991).

FIGURA 5 – Sítio ativo da papaína. Notar que os resíduos Asp-158 e His-159 estão em uma parede do vale e o resíduo Cys-25 está na outra parede.

A papaína é encontrada em três formas diferentes no látex bruto do mamão, com relação à ligação dos átomos ou grupos de átomos à Cys-25. Cerca de 50% da enzima presente tem seu átomo de enxofre, do grupo sulfidril essencial, irreversivelmente oxidado. Em outra parte o grupo SH está livre e é proteoliticamente ativo sem ativação. O terceiro componente pode ser ativado por um pequeno composto tiol, como o β -mercaptoetanol ou o Na_2SO_3 (Kamphuis et al., 1984). A papaína pode ser ativada por redução, quando se utiliza cisteína, HCN ou H_2S por exemplo, e inativada por oxidação, por ação de H_2O_2 ou iodoacetato (O’Neil, 2001).

3.4.1 Propriedades e aplicações da papaína

Dentre as diversas aplicações da papaína pode-se citar o amaciamento de carnes, clarificação de bebidas, agente debridante, removedor de depósito de proteína da superfície de lentes de contato, promotor de absorção cutâneo, agente esfoliante e despigmentante (O’Neil, 2001; Sweetman, 2002; Lopes, 2003; Brooks, 1999; Santos, 2001). A papaína pode hidrolisar ligações peptídicas do colágeno e da queratina do estrato córneo da pele (Sim et al., 2000).

Lopes (2003) avaliou a segurança e eficácia da papaína como promotor de absorção cutâneo. O uso seguro da enzima foi confirmado utilizando cultura celular de queratinócitos humanos e estrato córneo humano. A eficácia foi

comprovada pela análise da desestruturação dos componentes do estrato córneo humano utilizando métodos biofísicos.

Segundo Monetta (1987, 1988, 1990), o látex do mamão verde é utilizado há muito tempo por tribos da América, África e ilhas do Caribe para cicatrização de feridas. O valor terapêutico da papaína é reconhecido no tratamento de ferimentos cuja recuperação é difícil por meio das terapias convencionais (Mc Grath, 1988; Monetta, 1987; Monetta, 1988). De acordo com as observações de Monetta (1990, 1988, 1987), a papaína facilita a limpeza de feridas, tecidos necrosados e secreções, estimulando os processos regenerativos e acelerando a cicatrização.

Starley e colaboradores (1999) relataram o uso tópico de uma pasta preparada com a polpa do mamão em pacientes pediátricos com queimaduras infectadas na Gâmbia, África. Os ferimentos tratados durante algumas semanas tornam-se suficientemente limpos para receber um enxerto.

Pieper e Caliri (2003) fizeram um levantamento sobre as formas de uso da papaína e do mamão em ferimentos em diversos países, especialmente no Brasil. Foi relatada a utilização da pasta preparada com a polpa da fruta e da papaína incorporada em gel, solução preparada com água estéril e em solução salina, nas concentrações de 10% em tecidos necrosados e de 1 a 4% para favorecer a regeneração tecidual (potência desconhecida).

Diversos hospitais de São Paulo utilizavam a papaína sob forma de solução aquosa preparada extemporaneamente, porém com manipulação e dose não padronizadas. Essa forma farmacêutica apresenta os inconvenientes de não se manter restrita ao local de aplicação, despende tempo para seu preparo no momento do uso e ainda não oferece estabilidade aceitável ao fármaco (Velasco, 1993).

Velasco (1993) desenvolveu e padronizou um gel de papaína 0,4% p/v para aplicação diária em pacientes com ferimentos, abscessos, úlceras e úlceras de decúbito. A aplicação da papaína na forma de gel representa vantagens para o corpo médico e de enfermagem, pois viabiliza redução de custos, economia de tempo, otimização do trabalho e apresenta estabilidade durante até 60 dias.

No entanto, a forma farmacêutica gel não oferece proteção contra agentes externos e, como foi citado, a estabilidade da papaína permanece relativamente baixa. Além disso, segundo Cooper (1987), a taxa de permeação do

fármaco deve ser determinada pela taxa de liberação deste na superfície da pele e não pela própria permeabilidade do tecido, para que esse evento não seja afetado pela variabilidade na permeabilidade da pele intra ou interpaciente. Esse perfil é atingido quando a taxa de liberação do fármaco, a partir da forma farmacêutica, é baixa, como ocorre em sistemas de liberação controlada. Ainda, Brooks e colaboradores (1999) sinalizam que há problemas associados com a aplicação geral de proteases na pele, uma vez que é difícil estancar sua ação.

3.5 Polímeros

3.5.1 Interação da radiação eletromagnética com a matéria e sua ação sobre polímeros

Os elétrons interagem com a matéria por um número de processos dos quais os mais importantes são a emissão de radiação eletromagnética e colisões elásticas e inelásticas (Spinks & Woods, 1990).

Os raios gama são um tipo de radiação eletromagnética de origem nuclear. Atualmente a fonte de raios γ mais utilizada é o ^{60}Co , que gera fótons com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV, que possuem alto poder de penetração na matéria. Uma das vantagens que isso representa é a possibilidade de irradiar materiais de grande espessura (Spinks & Woods, 1990).

Os fótons que constituem a radiação eletromagnética têm alta energia (maior que 10 MeV) e formam elétrons secundários energéticos conforme interagem com a matéria, causando ionização do material. Uma quantidade relativamente grande de energia tende a ser perdida quando ocorre a interação. No entanto, nem todos os fótons incidentes interagem com o material absorvedor e aqueles que não interagem passam através do material sem sofrer mudança de energia ou direção. Dessa forma, compreende-se que o efeito do material absorvedor é reduzir o número de fótons transmitidos e a intensidade da radiação (Spinks & Woods, 1990).

Quando a radiação eletromagnética interage com a matéria, três principais processos de atenuação da radiação podem acontecer: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares (Spinks & Woods, 1990).

O efeito fotoelétrico ocorre principalmente com fótons de baixa energia, menor que 1 MeV, que interagem com átomos de elevado número atômico. Nesse caso, toda a energia do fóton é transferida para um único elétron do átomo, que é ejetado com uma energia igual à diferença entre a energia do fóton e a energia de ligação do elétron ao átomo. A vaga criada pela perda do elétron é preenchida por um elétron de um orbital de menor energia, ou seja, de uma camada mais externa, com emissão de raios x ou de elétrons Auger de baixa energia (Spinks & Woods, 1990).

Já o efeito Compton é o efeito mais comum e ocorre quando o fóton interage com um elétron das camadas mais externas, o que resulta na ejeção do elétron e no desvio do fóton, com perda de energia. A energia do fóton incidente é dividida entre o fóton e o elétron. Ocorre predominantemente o efeito Compton nas fontes de ^{60}Co , cujos fótons gerados têm energia entre 1 e 10 MeV (Spinks & Woods, 1990).

A produção de pares envolve a completa absorção de um fóton nos arredores de um núcleo atômico ou, com menor frequência, de um elétron com a formação de duas partículas: um elétron e um pósitron. Cada partícula tem energia cinética igual à metade da diferença entre a energia do fóton e a energia de repouso das partículas. As duas partículas são substituídas por dois raios gama de 0,51 MeV emitidos em direções opostas (Spinks & Woods, 1990).

A aplicação da radiação para modificar as propriedades dos polímeros vem crescendo nos últimos anos. As características mecânicas e de resistência a solventes e temperatura dessas moléculas são alguns exemplos de propriedades que podem ser melhoradas (Artel, 2000).

A aplicação de radiação de alta energia sobre um polímero induz a ionização e excitação da molécula, devido à absorção de parte da energia irradiada pelo polímero. As espécies reativas assim formadas passam por uma variedade de reações químicas, cujos produtos refletem a alteração das propriedades químicas e físicas originais (Reichmanis & O'Donnell, 1989).

A absorção da energia irradiada depende apenas da densidade eletrônica do substrato e, portanto, ocorre espacialmente ao acaso em uma escala molecular. No entanto, isso não ocorre com as mudanças químicas subsequentes. Algumas ligações e grupos sensíveis às reações induzidas pela radiação são: $\text{C}=\text{C}$, COOH , $\text{C}-\text{X}$ (onde X é um halogênio), $-\text{SO}_2-$, NH_2 .

Grupos aromáticos, ao contrário, dão grande resistência à radiação ao polímero (Reichmanis & O'Donnell, 1989).

Os principais efeitos da radiação sobre os polímeros são: cisão da cadeia principal, com conseqüente redução da massa molar; reticulação, com conseqüente aumento da massa molar (podendo formar uma rede tridimensional insolúvel), formação de insaturações e formação de produtos de moléculas pequenas. Como conseqüência da modificação estrutural do polímero irradiado verifica-se alteração de suas características morfológicas como, por exemplo, perda da cristalinidade e alteração de cor (Reichmanis & O'Donnell, 1989).

Uma das mais importantes aplicações industriais da radiação γ , no campo dos polímeros, é a indução da polimerização. Na FIG. 6 estão representadas as reações que ocorrem em um monômero ou polímero após absorção de uma determinada dose de radiação gama. Após a irradiação, a molécula dá origem a dois radicais (Etapa 1). Um radical inicia o ataque a outros monômeros (Reação de Iniciação - Etapa 2), cuja reação se repete inúmeras vezes para formar a cadeia polimérica (Reação de Propagação – Etapa 3). Por fim, dois radicais se combinam para formar uma molécula grande e estável, que é o próprio polímero (Reação de Terminação – Etapa 4). A radiação γ também pode induzir reações de reticulação, nas quais as cadeias do polímero podem unir-se umas às outras por ligações cruzadas.

FIGURA 6 – Etapas de uma reação de polimerização induzida por radiação gama.

O polímero formado pode ser submetido ao processo de reticulação, que consiste em formar ligações covalentes entre as cadeias, formando uma única e ampla estrutura em rede (Bogner et al., 1990).

Todos os processos durante a fabricação de formas farmacêuticas que podem influenciar o produto final devem ser investigados, validados e controlados. Para dispositivos de silicone o processo de reticulação é um deles, que pode ser uma fonte de variabilidade no manuseio e nas propriedades de liberação do dispositivo (Bogner et al., 1990).

Bogner e colaboradores (1990) estudaram a relação entre o grau de reticulação e as propriedades de membranas preparadas com elastômeros de silicone. Segundo eles, quaisquer mudanças nas propriedades físico-mecânicas refletem diferenças no grau de reticulação e não variações nas interações físico-químicas entre as cadeias dos polímeros ou entre o polímero e o fármaco. Foi observado também que a elasticidade de membranas parcialmente reticuladas com 300 unidades ou mais de siloxano entre as ligações cruzadas diminui com o aumento do número dessas unidades. Isso ocorre devido ao baixo grau de formação de ligações cruzadas na membrana.

Os pesquisadores (Bogner et al., 1990) também estudaram a cinética de reticulação das membranas preparadas. Essas foram submetidas ao processo de reticulação em forno laboratorial e em um equipamento de DSC (Differential Scanning Calorimetry) a cinco temperaturas, de 25 °C a 90 °C para o primeiro processo e de 85 °C a 100 °C para o segundo. Para as membranas reticuladas, tanto no forno laboratorial como no DSC, verificou-se que quanto maior a temperatura, maior o grau de reticulação do polímero e que esta ocorre também em menor tempo. No entanto, observou-se que o processo de reticulação ocorre mais rapidamente na câmara do DSC que no forno, provavelmente porque no primeiro o processo é facilitado em termos de transferência de calor. Os autores alertam para o risco de uma reticulação incompleta a temperaturas inferiores a 37 °C.

3.5.1.1 Aplicações biomédicas dos polímeros

Diversos polímeros têm sido desenvolvidos para aplicações biomédicas, entre elas o preparo de sistemas de liberação controlada. Hidrogéis de quitosana (Berger et al., 2004), hidrogéis de poliacrilamida e quitosana sensíveis à variação

de pH (Bonina et al., 2004), hidrogéis de gelatina e dextrano sensíveis a estímulos duplos (Kurisawa & Yui, 1998), matrizes poliméricas biodegradáveis (Ye & Chien, 1996), microesferas biodegradáveis para liberação de proteínas (Sinha & Trehan, 2003) e hidrogéis de hidroxietil metacrilato e ácido metacrílico sensíveis ao pH para liberação de biomoléculas (Mahkam, 2004) são alguns exemplos.

Silicones são polímeros sintéticos cuja cadeia é formada por ligações silício-oxigênio (Si-O) à qual estão ligados grupos orgânicos por meio de ligações silício-carbono. Apresentam propriedades diferenciadas da maioria dos polímeros como estabilidade térmica e oxidativa, alto grau de inércia química e baixa tensão superficial.

Os elastômeros de silicone são chamados de borrachas que vulcanizam à temperatura ambiente (Room-temperature Vulcanizing - RVT), de consistência líquida ou pastosa, que reticulam *in situ* sem aquecimento (Mark et al., 1989). São biomateriais bastante conhecidos que têm sido amplamente utilizados em aplicações médicas e odontológicas devido às suas boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade (Xu et al., 2005; Lawrence & Turner, 2005). Os tipos mais comumente empregados de polímeros de silicone são baseados em polidimetilsiloxano.

Os silicones apresentam muitas vantagens como boa resistência à umidade, estabilidade e natureza não tóxica e não irritante. Também são conhecidos por aderir a superfícies de baixa e alta energia e podem ser facilmente aplicados à pele (Toddywala & Chien, 1990). Uma membrana de silicone completamente reticulada possui natureza elástica resultante da flexibilidade das cadeias do polímero, bem como das ligações cruzadas que mantêm a rede unida (Bogner et al., 1990).

Folhas de silicone na forma de gel têm sido testadas no tratamento de escaras hipertróficas e quelóides desde a década de 1980 com bons resultados. Estudos randomizados controlados demonstraram que as bandagens de silicone em gel são seguras e efetivas para essa aplicação, podendo ser especialmente úteis para crianças e outros pacientes intolerantes à dor e a outros procedimentos (Valenta & Auner, 2004).

Abbasi e Mirzadeh (2004) desenvolveram um eletrodo intracoclear, utilizando polidimetilsiloxano enxertado com poli-2 hidroxietil metacrilato

(PHEMA), para um sistema de implante para pacientes com problemas de audição.

Polímeros de silicone podem ser utilizados como revestimento de cateteres urinários de látex, utilizados por pacientes com incontinência urinária. Os revestimentos de silicone são primariamente usados para lubrificar o cateter, mas também contribuem para a solução de alguns problemas relacionados ao cateterismo a longo prazo (maior que 30 dias), como infecção do trato urinário, incrustação — por precipitação de sais presentes na urina geralmente pela ação de *Proteus mirabilis* — e alergia ao látex. Em comparação com o látex de borracha natural, os revestimentos de silicone apresentam excelente resistência à radiação ultravioleta, boa resistência química, moderada aderência e não são alergênicos. Ainda apresentam boa resistência mecânica e elasticidade, características requeridas para a produção de cateteres, e são um dos materiais mais resistentes à formação de biofilme (Lawrence & Turner, 2005).

Elastômeros de silicone também são empregados no revestimento de comprimidos devido ao seu potencial para obter uma liberação controlada do fármaco de ordem zero (Nahrup et al., 2004).

Uma importante e comum aplicação dos elastômeros de silicone é a fabricação de sistemas de liberação controlada. Esses materiais são amplamente utilizados tanto na produção de membranas controladoras de taxa de liberação como das próprias matrizes desses sistemas, devido à sua inércia química, biocompatibilidade e alta permeabilidade a vários fármacos (Sutinen et al., 1989). Além disso, apresentam um estado inerte relativo que minimiza o risco de intolerância cutânea e de reação química com o fármaco (Maillard-Salin et al., 2000).

Polímeros de silicone hidrofóbicos podem ser usados para controlar a liberação de fármacos lipofílicos ou relativamente não polares, que são capazes de se solubilizar no polímero. Segundo Sutinen e colaboradores (1989), fármacos polares podem ser liberados a partir de matrizes de silicone apenas quando aditivos hidrofílicos estão dispersos no silicone. Neste caso, a liberação do fármaco é desencadeada por embebição osmótica da água na matriz.

Matrizes de silicone também têm sido desenvolvidas para a produção de sistemas de liberação controlada de fármacos para uso veterinário. Um exemplo é a incorporação de ivermectina para obtenção de uma curva de

liberação linear do fármaco (Valenta & Auner, 2004). Ainda, matrizes de polidimetilsiloxano têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada na forma de implantes (Golomb et al., 1990).

3.5.1.1.1 Propriedades das membranas de silicone

Xu e colaboradores (2005) estudaram a influência da temperatura de vulcanização nas propriedades mecânicas de elastômeros de silicone. Foi demonstrado que há uma boa correlação entre a dureza da superfície das amostras dos polímeros testados e a temperatura à que o material foi exposto.

Sabe-se que álcoois como o glicerol, etilenoglicol, polietilenoglicol 400 e propilenoglicol são capazes de influenciar significativamente as propriedades das matrizes de silicone. Em um estudo verificou-se que a quantidade de cumarina liberada a partir de uma membrana de silicone contendo propilenoglicol foi duas vezes maior que a quantidade liberada a partir da membrana sem o excipiente (Valenta & Auner, 2004).

De acordo com Golomb e colaboradores (1990), como já foi sugerido por vários estudos, o mecanismo de liberação de um fármaco disperso em uma matriz polimérica hidrofóbica, não degradável e insolúvel seria como descrita a seguir: inicialmente a água se difunde para a matriz tanto através da fase hidrofílica — onde os fármacos estão dispersos — como através da fase hidrofóbica — a própria fase polimérica. Uma vez que a camada superficial contendo as partículas do fármaco em pó é liberada formam-se poros na matriz e assim outras partículas do fármaco podem difundir-se através da rede de poros formada. Dessa forma, uma maior taxa de liberação é observada quanto mais carregada de fármaco estiver a matriz e quanto maior for sua solubilidade, já que mais poros são formados na matriz, a uma taxa maior. Por outro lado, as propriedades físicas do polímero, isto é, hidrofobicidade e elasticidade, determinam a taxa de penetração do solvente através da fase polimérica para dissolver as partículas do fármaco encapsuladas e induzir o intumescimento. Estudos demonstraram que isso ocorre porque as matrizes de polidimetilsiloxano, contendo partículas sólidas do fármaco, intumescem durante a liberação. No entanto, matrizes planas de elastômeros de silicone, de maneira geral, praticamente não intumescem em água, devido à sua alta hidrofobicidade. Uma

membrana de silicone pode absorver apenas 3% de água, mesmo durante sete dias à 100 °C, e apenas 1% à temperatura ambiente.

Segundo Braden e colaboradores (2005), embora os polímeros de silicone sejam extremamente hidrofóbicos, a captação de água pode ser drasticamente aumentada pela presença de substâncias hidrossolúveis. Gotículas se formam em torno dessas substâncias, que crescem devido à pressão osmótica gerada, até que ocorra um equilíbrio entre as forças elástica e osmótica ou sua ruptura. Esse último processo é utilizado em sistemas de liberação controlada. O crescimento da gotícula é facilitado pelos altos coeficientes de difusão da água em polímeros de silicone.

3.6 Sistemas transdérmicos de liberação controlada

Segundo Chien (1987a), durante décadas a pele tem sido comumente usada como via de administração de substâncias dermatologicamente ativas, ou seja, com ação farmacológica nos tecidos da pele. Nessas terapias, considera-se que as moléculas do fármaco difundem-se para o tecido alvo, localizado próximo ao local da aplicação, para produzir seus efeitos terapêuticos antes de serem removidas pela circulação sangüínea. Alguns exemplos dessa aplicação são: o uso de hidrocortisona para dermatite, peróxido de benzoila para acne e neomicina para infecção cutânea.

O uso da pele intacta como local de administração contínua de fármacos tem sido reconhecido recentemente. O desenvolvimento de síndromes femininas em homens operadores de áreas de produção de formas farmacêuticas contendo esteróides estrogênicos despertou os cientistas para o entendimento de que a pele não é uma barreira completamente impermeável. Os achados acumulados ao longo dos anos revolucionaram essa tradicional crença e fizeram com que diversos trabalhos começassem a ter sistemas transdérmicos de liberação controlada como objetos de estudo (Chien, 1987a).

A administração intravenosa contínua, a uma taxa de infusão controlada, é vista como um excelente modo de liberação de fármaco, pois, evita o efeito de primeira passagem no fígado e mantém o nível de fármaco no organismo constante, prolongado e terapeuticamente efetivo, além da vantagem da administração direta na circulação sistêmica (Chien, 1987a). Segundo Chien

(1987a), esse modo de administração, no entanto, oferece riscos e, em razão desse fato, requer hospitalização do paciente e uma rigorosa supervisão médica da medicação. De acordo com o autor, tem aumentado recentemente o reconhecimento de que os benefícios da infusão intravenosa podem ser obtidos usando a pele intacta como local de administração de fármacos a fim de se conseguir a liberação transdérmica e contínua do fármaco na circulação sistêmica, sem seus riscos inerentes.

O primeiro sistema terapêutico transdérmico a ser comercializado baseava-se na liberação de escopolamina durante 72 horas para profilaxia ou tratamento de contração induzida por náusea, com o nome comercial de Transderm-Scop[®], da Ciba. Na seqüência, outros sistemas bem-sucedidos começaram a ser comercializados, desta vez tendo a nitroglicerina como fármaco para o tratamento diário de *angina pectoris*. São eles: Deponit[®], da Pharma – Schwartz / Lohmann; Nitrodisc[®], da Searle; Nitro-Dur[®], da Key; e Transderm-Nitro[®], da Ciba. Algum tempo depois, surgiu no mercado o sistema transdérmico de liberação de clonidina (Catapres-TTS, da Boehringer Ingelheim) para tratamento semanal de hipertensão (Chien, 1987a).

Chien (1987a) relacionou as vantagens potenciais de sistemas transdérmicos de liberação controlada:

- não apresentam os riscos e inconveniências inerentes à terapia intravenosa;
- não enfrentam as condições variadas de absorção e metabolismo que estão associadas à terapia oral;
- garantem a continuidade da administração do fármaco, permitindo o uso de substâncias de meia-vida biológica curta;
- são eficazes em menores doses diárias totais graças à contínua permeação do fármaco e por não sofrerem o efeito de primeira passagem no fígado;
- oferecem menor risco de superdosagem ou subdosagem como resultado da liberação prolongada e pré-programada à taxa terapêutica desejada;
- oferecem um regime terapêutico simplificado, levando à melhor aceitação do paciente;

- há possibilidade de interromper facilmente a administração da dose por simples remoção do dispositivo da superfície da pele, em caso de reações adversas.

No entanto, a via transdérmica de absorção de fármacos não pode ser utilizada por muitas substâncias, pois a eficiência da função barreira da pele permite que apenas pequenas quantidades do fármaco atravessem-na (Valenta & Auner, 2004).

Segundo Barry (2005), o passo prático mais inovador na ciência de liberação transdérmica nos últimos anos foi a introdução dos dispositivos transdérmicos na medicina. O sistema terapêutico transdérmico (STT) ou sistema de liberação transdérmica (SLT) foi introduzido como um dispositivo que liberaria o fármaco para a pele a uma velocidade controlada, bem abaixo do máximo que o tecido pode receber. Assim, a velocidade com a qual o fármaco se difundiria pela pele seria controlada pelo dispositivo e não pelo estrato córneo, uma vez que o fluxo pretendido seria muito inferior ao máximo fluxo da pele.

Os sistemas transdérmicos de liberação controlada disponíveis no mercado têm dispositivos com tecnologias diferentes, fornecendo mecanismos diversos de controle da liberação do(s) fármaco(s) e veiculam principalmente hormônios esteróides, nicotina, nitroglicerina e analgésicos (Valenta & Auner, 2004).

De acordo com Barry (2005), esses dispositivos podem ser classificados em duas categorias principais: Sistema Matricial ou Monolítico, no qual a quantidade de fármaco liberada depende do coeficiente de difusão, concentração e solubilidade do fármaco e é proporcional à raiz quadrada do tempo; e Sistema de Membrana Limitante da Velocidade, no qual a quantidade de fármaco liberada é controlada por uma membrana.

Os adesivos transdérmicos são divididos historicamente em controlados por membrana e controlados por matriz. Nos primeiros utiliza-se principalmente polietileno vinilacetato ou polietileno. Nos dispositivos controlados por matriz, atualmente as matrizes são auto-adesivas. Antigamente tinham uma camada adesiva adicional. Nestes, o fármaco é dissolvido ou suspenso na matriz hidrofílica ou lipofílica (Valenta & Auner, 2004).

Um adesivo sensível à pressão é um material polimérico que adere ao substrato por aplicação de uma leve pressão e deixa pouco ou nenhum resíduo

quando removido. O adesivo é então um importante componente dos dispositivos de sistema de liberação transdérmicos (SLT), pois garante um íntimo contato da área de liberação do fármaco com a superfície da pele (Toddywala & Chien, 1990).

Os principais polímeros utilizados como adesivos são os poliisobutilenos, acrílicos e silicones (Toddywala & Chien, 1990). Adesivos de silicone sensíveis à pressão não são irritantes, tóxicos e sensibilizantes, possuem *tack* suficiente e propriedades de remoção que podem ser customizados para acomodar necessidades específicas de SLT (Toddywala et al., 1991).

Maillard-Salin e colaboradores (2000b) desenvolveram um sistema de liberação transdérmico multi-laminado contendo 3% de um derivado da progesterona. O objetivo do estudo foi caracterizar as propriedades adesivas da matriz do dispositivo, bem como determinar o mecanismo de adesão entre polímero e substrato e identificar os fatores que o influencia. As amostras foram submetidas ao *Peel Test* sobre a pele humana *in vivo*, vidro e amostras de polidimetil metacrilato, policarbonato e politetrafluoretileno. Os resultados para os substratos poliméricos foram bastante similares. Uma maior adesão da amostra teste foi observada para o vidro, devido à alta energia de superfície desse material. A presença do fármaco no filme polimérico em teste reduz a adesão do polímero ao substrato.

Toddywala e Chien (1990) avaliaram a utilização de um adesivo de silicone sensível à pressão no preparo de um SLT e o mecanismo de liberação dos fármacos dispersos. Foram utilizados a progesterona e seis derivados hidroxilados como fármacos para avaliar o efeito da variação na hidrofiliabilidade do penetrante na taxa de liberação do fármaco e a cinética de permeação *in vitro* dos fármacos na pele de camundongos *hairless*. Observou-se que quanto maior o número de hidroxilas na molécula, maior sua solubilidade em uma solução aquosa de PEG-400 40% (v/v) e menor a solubilidade no adesivo. A progesterona apresentou maior fluxo de liberação que diminuiu com o aumento do número de hidroxilas nas moléculas dos derivados. A posição das hidroxilas no esqueleto da progesterona interfere na difusividade do fármaco a partir do adesivo.

Golomb e colaboradores (1990) estudaram a relação entre o tamanho das partículas do fármaco, sua taxa de liberação e o intumescimento da matriz. Para isso, membranas de polidimetilsiloxano foram preparadas contendo 30%

(p/p) de dicromato de potássio como fármaco padrão, que foi encapsulado usando três faixas de tamanho de partículas. Os pesquisadores verificaram que nas membranas contendo partículas menores que 75 μm a taxa de liberação do fármaco foi de 65% após 20 dias, enquanto que nas membranas contendo partículas de 90-125 μm e 355-425 μm observou-se a liberação de apenas 50% e 40% do fármaco, respectivamente, após o mesmo período. Isso ocorre porque em matrizes contendo o fármaco em partículas de tamanho menor uma maior área superficial fica disponível para dissolução e mais poros são formados, criando uma rede de canais que levam uma taxa de liberação relativamente mais rápida.

Quanto menor o tamanho da partícula incorporada na matriz mais rápida é a taxa de liberação e maior é o intumescimento, devido à pressão osmótica (Golomb et al., 1990).

Pela experiência dos autores, uma matriz aerada devido a um erro de processo permite uma taxa de liberação maior do fármaco, já que o número de canais para a passagem do fármaco aumenta (Golomb et al., 1990).

Toddywala e colaboradores (1991) estudaram as propriedades físicas e mecânicas de adesivos de silicone e correlacionaram-nas com a taxa de liberação de esteróides (progesterona, testosterona e hidrocortisona) neles incorporados, formando um sistema a-TTD (Adhesive-type Transdermal Drug Delivery System). A taxa de permeação, determinada pela inclinação da porção do *steady-state* do gráfico $Q \times t$, aumenta com o aumento da carga de fármaco na membrana / adesivo e então atinge um platô em concentrações maiores de fármaco no adesivo.

Sutinem e colaboradores (1989) determinaram a permeação de cinco alquil p-aminobenzoatos (ácido p-aminobenzóico - PABA, seu sal de potássio e os ésteres metil, etil, propil, butil e hexil) através de membranas de silicone e suas taxas de liberação dos dispositivos de reserva de silicone, com o objetivo de avaliar a cinética de difusão desses fármacos / compostos e o efeito do aditivo osmótico no centro do dispositivo sobre a taxa de liberação.

A solubilidade dos fármacos na forma de éster no polímero aumentou com o aumento do tamanho da cadeia do metil até o butil (Sutinem et al., 1989).

Os testes de permeação foram feitos a 5 °C e 34 °C. Os pesquisadores observaram que houve um aumento de duas a seis vezes na taxa de permeação com o aumento da temperatura (Sutinem et al., 1989).

Observou-se que a presença de um sal hidrossolúvel na membrana de silicone, no caso o cloreto de sódio (aditivo osmótico), aumenta a taxa de liberação dos ésteres do PABA e esse efeito é intensificado com o aumento da hidrofiliabilidade do éster (Sutinem et al., 1989).

Muitos estudos têm sido feitos no campo de sistemas transdérmicos. Um dos destaques é a melhora da adesividade na pele por combinação de diferentes polímeros ou por derivatização do polímero. Um exemplo de combinação de polímeros é a obtenção de uma matriz à base de polimetil metacrilato (PMMA) com adesividade 40 vezes maior devido à adição de polivinil pirrolidona (PVP). O sistema pode ser removido facilmente da pele e aplicado repetidas vezes no mesmo local (Valenta & Auner, 2004).

3.6.1 Difusão através de membranas

O processo de difusão representa a transferência de massa de moléculas individuais de uma substância, provocada pela movimentação molecular randômica, associado a um gradiente de concentração. A passagem de uma matéria através de uma barreira pode ocorrer por simples permeação molecular ou por movimentação através de poros e canais. A difusão molecular através de meios não porosos depende da dissolução das moléculas do permeante no corpo da membrana, enquanto o segundo processo pode envolver a passagem de uma substância através dos poros de uma membrana, preenchidos com solvente e é influenciado pelo tamanho relativo das moléculas do permeante e pelo diâmetro dos poros. O transporte de um fármaco através de uma membrana polimérica envolve sua dissolução na matriz da membrana e é um caso de difusão molecular simples (Martin, 1993).

3.6.1.1 Primeira Lei de Fick

Em um sistema composto por um compartimento doador e outro receptor, separados por uma barreira, a quantidade de difusante contida no compartimento doador que atravessa a área S da barreira em direção ao compartimento receptor, por unidade de tempo, é chamada de fluxo (J) e pode ser calculado com a Equação 1:

$$J = \frac{dM}{S \cdot dt} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

M é a quantidade do difusante, em g;

S é a unidade de seção cruzada da barreira, em cm;

t é a unidade de tempo, em s.

Sendo assim, o fluxo é proporcional ao gradiente de concentração dC/dx :

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

D é o coeficiente de difusão da substância difundida, em $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$;

C é a concentração da substância difundida, em g/cm^3 ;

x é a distância do movimento perpendicular à superfície da barreira, em cm.

A Equação 2 é conhecida como a Primeira Lei de Fick e refere-se à taxa de difusão do penetrante no *steady-state* — estado estacionário de difusão, no qual não há variação na concentração da substância. O sinal negativo indica que a difusão ocorre na direção em que a concentração do difusante é reduzida e, assim, o fluxo tem sempre uma quantidade positiva (Martin, 1993).

3.6.1.2 Segunda Lei de Fick

A concentração da substância difundida em um determinado ponto do sistema é modificada pelo fluxo das moléculas do difusante para dentro ou para fora da região em questão, em função do tempo. Considerando que a difusão ocorre apenas na direção x, a mudança na concentração em um determinado intervalo de tempo é proporcional à mudança no gradiente de concentração em um ponto do sistema, de acordo com a Equação 3:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Equação 3})$$

O compartimento receptor da célula de difusão é preenchido com solvente adequado, que é constantemente removido e substituído por solvente limpo a fim de que a concentração no compartimento seja mantida baixa. Essa dinâmica é chamada de *sink conditions*, uma vez que o compartimento receptor não se mantém saturado de difusante e permite que seu fluxo ocorra constantemente, como ocorre com uma pia que tem a torneira ligada e a abertura inferior livre para o escoamento da água (Martin, 1993).

Após um determinado tempo de funcionamento do sistema, a concentração do difusante no compartimento receptor aumenta e fica constante no compartimento doador, estabelecendo-se um equilíbrio. Deste ponto em diante, que depende da taxa de remoção do difusante da “pia” e da natureza da barreira para ser atingido, a concentração do difusante em ambos os compartimentos mantém-se constante em relação ao tempo (Martin, 1993).

O tempo necessário para o difusante estabelecer um gradiente de concentração uniforme dentro da membrana que separa os compartimentos da célula de difusão é chamado de *lag time* (L). O *lag time* pode ser calculado em função do coeficiente de difusão D (Equação 4) ou do coeficiente de permeabilidade P (Equação 5):

$$L = \frac{h^2}{6D} \quad (\text{Equação 4})$$

$$L = \frac{h}{6P} \quad (\text{Equação 5})$$

Em situações em que se consideram membranas biológicas como a pele, não é possível separar o valor de D do valor do coeficiente de partição K. Nesses casos, emprega-se então um parâmetro composto, o coeficiente de permeabilidade (P), onde $P = K \cdot D$ ou $P = K \cdot D / h$. Essa última definição é usada quando a espessura h não é exatamente conhecida como, por exemplo, na difusão através da pele (Barry, 2005).

3.6.2 Liberação de fármacos

A liberação de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica e sua subsequente absorção são eventos controlados pelas propriedades físico-químicas do fármaco e da forma farmacêutica e pelas características fisiológicas e físico-químicas do sistema biológico. Algumas dessas características são: concentração do fármaco, solubilidade em água, massa molar, forma cristalina, ligação à proteínas e pKa.

Quando o fluxo do fármaco contido no dispositivo é controlado pela membrana, ou seja, quando a resistência à difusão da membrana é pelo menos 10 vezes maior que a das camadas de difusão aquosas, a etapa limitante do processo é a difusão através da membrana. Nesse caso, o fluxo pode ser calculado utilizando a Equação 6:

$$J = \left(\frac{K \cdot D_m}{h_m} \right) \cdot C_1 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

K é o coeficiente de partição;

D_m é a difusividade da membrana;

h_m é a espessura da membrana;

C_1 é a concentração do fármaco no lado da membrana voltada ao compartimento doador.

A teoria de transferência de massa considera que existe uma camada estacionária de solvente na superfície de um sólido em processo de dissolução, chamada de camada de difusão aquosa. As moléculas do soluto são encontradas na camada em diferentes concentrações, variando do equivalente a uma solução saturada do fármaco — na região próxima à forma farmacêutica — até uma concentração menor e constante no limite entre a camada e o restante da solução. Esse sistema atende às *sink conditions*.

Na interface entre a superfície do sólido e a camada de difusão aquosa, o fármaco no sólido está em equilíbrio com o fármaco presente na camada e o gradiente de concentração é constante. Mas a força de agitação do sistema pode alterar a espessura h da camada de difusão estática (Martin, 1993).

3.6.2.1 Princípios de difusão na pele

O processo de absorção percutânea envolve três etapas básicas: dissolução do fármaco no veículo, difusão deste do veículo para a superfície da pele e penetração do fármaco. A etapa limitante do processo, que controla a permeação, é a passagem do difusante através do estrato córneo (Martin, 1993).

O estrato córneo em seu estado normal e hidratado é uma membrana biológica praticamente impermeável, permitindo apenas a passagem de pequenas moléculas polares não carregadas de massa molar até 500 Da (Bos & Meinardi, 2000). Essas substâncias atravessam lentamente essa barreira, utilizando principalmente a via transcelular (Martin, 1993).

Os fatores mais importantes que estão relacionados com a absorção percutânea de um fármaco são a concentração do fármaco dissolvido (C_s), o coeficiente de partição entre a pele e o veículo (K) e os coeficientes de difusão do fármaco no veículo e na pele (D_v e D_s , respectivamente). Sabe-se que, quanto maior for a concentração do fármaco no veículo, maior será sua taxa de penetração (Martin, 1993).

3.6.3 Avaliações cinéticas de STLC

A cinética de liberação e permeação de fármacos a partir dos sistemas transdérmicos de liberação controlada pode ser avaliada utilizando uma célula de difusão bicompartimental, usualmente chamada de Célula de Franz (Chien, 1987b), como a esquematizada na FIG. 7.

As amostras de pele utilizadas podem ser provenientes de pele abdominal íntegra e viável obtida de cadáver humano ou de camundongos *hairless* (Chien, 1987b). Atualmente a pele de porco é a mais empregada.

Na montagem da célula aplica-se o dispositivo com a face de liberação sobre a superfície do estrato córneo da pele. O perfil de permeação do fármaco na pele é obtido pela amostragem da solução receptora em intervalos pré-determinados durante 30 horas e pela análise das concentrações do fármaco nas amostras utilizando um método analítico sensível, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os perfis de liberação do fármaco do sistema também podem ser avaliados usando o mesmo procedimento experimental sem a pele (Chien, 1987b).

FIGURA 7 - Ilustração diagramática de uma Célula de difusão de Franz. O dispositivo é mostrado em contato com a superfície do estrato córneo.
Fonte: Chien, 1987b.

3.6.4 Desenvolvimento e otimização de SLCT

O desenvolvimento de um sistema de liberação controlada transdérmica requer a observação da relação entre a taxa de liberação do fármaco na superfície da pele e a taxa máxima de sua absorção pelo tecido. Esse aspecto é de extrema relevância, uma vez que o estrato córneo é sabidamente uma camada altamente impermeável a várias substâncias (Chien, 1987b).

Segundo Chien (1987b), em um SLCT adequado a taxa de permeação do fármaco é determinada pela taxa de liberação deste na superfície da pele e não pela própria permeabilidade do tecido. Dessa forma, a biodisponibilidade transdérmica do fármaco torna-se independente de qualquer possível variabilidade na permeabilidade da pele intra ou interpaciente. Esse perfil é atingido quando a taxa de liberação do fármaco do sistema é baixa, fazendo com que o sistema controle a permeação. À medida que a taxa de liberação aumenta, a taxa de permeação aumenta em um padrão hiperbólico até atingir um platô no qual a taxa de permeação torna-se limitada pela permeabilidade ao fármaco inerente ao estrato córneo (Chien, 1987b).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Papaína 30000 USP/mg, grau de pureza analítico — Merck;
 - Aparência: pó fino amarelado a marrom;
 - pH: 4,8 – 6,2;
 - Conteúdo de água (por Karl Fischer): $\leq 6\%$;
 - Perda por evaporação (60 °C, 4 h, à vácuo): $\leq 7\%$;
- Cloridrato de L-cisteína monohidratado, grau de pureza analítico — Merck;
- Cloridrato de Carbobenzoxi-L-fenilalanina-L-argina- 4 metilcoumarina-7 amido (N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA), grau de pureza analítico — Sigma Aldrich;
- Dispersões de silicone monocomponente, grau médico — Nusil;
 - Aparência: líquido transparente a translúcido;
 - Sistema de cura: acetóxi;
 - Conteúdo não-volátil: 29%;
 - Solvente: xileno;
 - Viscosidade: 700 cP.
- Dispersões de silicone bicomponente, grau médico — Nusil;
 - Aparência: líquido transparente a translúcido;
 - Sistema de cura: oxime;
 - Conteúdo não-volátil: 20%;
 - Solvente: xileno;
 - Viscosidade: 4000 cP.
- Adesivo acrílico, grau médico — Rohm and Haas Company;
 - Aparência: líquido branco leitoso;
 - pH: 7,3 – 8,1;
 - Viscosidade: 40 – 200 cP;
 - Solvente: água;
 - Teor de sólidos: 55%;

- Látex de borracha natural bicentrifugado, desproteínizado, preparado no IPEN;
 - Sólidos totais: 62%;
 - Borracha seca: 61,5%;
 - pH: 7,4.

4.1.2 Reagentes

- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado, grau de pureza analítico — LabSynth;
- Etilenodiaminotetracetato dissódico (E.D.T.A.), grau de pureza analítico — Merck;

4.1.3 Materiais

- Microplacas de 96 poços;
- Vidrarias.

4.1.4 Equipamentos

- Células de Franz modificadas, com 13,5 mL de capacidade do compartimento receptor e 0,95 cm² de área de contato;
- Banho de água termostatizado;
- Espectrofluorímetro de placas — Packard Fluorocount, modelo AF10.000 e BF10.000 para fonte de xenônio;
- Micropipeta de 1000 µL — Rainin, modelo SL-1000
- Micropipeta multicanal de 20 a 200 µL — Rainin
- Pipetador automático — Pipet-Aid
- Câmara de fluxo laminar Classe 100 — Filtracom
- Estufa incubadora de CO₂ — Binder, modelo CB150
- Leitora automática de microplacas — Tecan, modelo RC Sunrise
- Microscópio invertido — Olympus, modelo CK-40

4.2 Métodos

4.2.1 Seleção e preparo das membranas poliméricas para os testes de citotoxicidade e irritação cutânea primária

Foram selecionados inicialmente quatro polímeros para serem testados quanto à citotoxicidade, irritação cutânea primária e capacidade de incorporar a papaína formando uma membrana.

Os polímeros selecionados foram: látex de borracha natural bicentrifugado (LBNB), adesivo acrílico (AA), dispersão de silicone monocomponente (SM) e dispersão de silicone bicomponente (SB). O LBNB reticula por secagem em temperatura ambiente após cerca de 24 horas. O polímero AA sofre reticulação quando submetido à estufa à temperatura de 110 °C durante um minuto. A dispersão de silicone SM reticula por reação química à temperatura ambiente após cinco dias. O polímero SB é reticulado por tratamento térmico, à 75 °C por 45 minutos.

Membranas de 1,0 g foram preparadas com todos os polímeros para servirem como amostras para os testes de Citotoxicidade e Irritação Cutânea Primária. Cada membrana foi preparada sobre filme de poliéster apoiado sobre a base de uma placa de Petri de acrílico.

4.2.2 Teste de Citotoxicidade

Para avaliar a segurança biológica *in vitro* dos polímeros empregados no preparo das matrizes realizou-se o ensaio de citotoxicidade utilizando o Método da Captura do Vermelho Neutro. O ensaio é feito em placas de 96 orifícios e em cada placa podem ser avaliadas até quatro amostras, como está demonstrado na FIG. 8.

O teste de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN, em capela de fluxo laminar. Todo o trabalho foi desenvolvido utilizando material esterilizado e técnicas assépticas.

A linhagem celular escolhida foi a NCTC clone 929 (ATCC), células de tecido conjuntivo de camundongo, por se tratar de uma linhagem estabelecida, com características estáveis, de fácil manuseio e que apresenta resultados reprodutíveis (Cruz, 2003). As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle

(MEM – Minimum Essencia Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1,0 mM de piruvato de sódio, sem antibiótico, o que foi chamado de MEM-uso. A manutenção da linhagem foi feita a 36 °C em garrafas de 75 cm² ou 250 mL e repiques com intervalos médios de 72 horas. A cultura de células foi preparada em placa de 96 poços contendo 200 µL de uma suspensão de 2×10^5 células/mL em cada poço. A placa foi incubada em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ durante 24 horas para a formação da monocamada celular. A cultura celular foi preparada e cedida pelo Instituto Adolfo Lutz.

Membranas foram preparadas com os polímeros SM e SB, seguindo as recomendações do fabricante para reticulação. Realizou-se a extração das membranas com 1 mL de MEM-uso para cada 1 cm² de área superficial, durante 24 horas a 37 °C. *Pellets* de PVC (Dacarto) foram utilizados como controle negativo, sendo previamente submetidos à extração com 5 mL de MEM-uso para cada 0,3 g de pellets a 37 °C por 24 horas. Como controle positivo empregou-se uma solução de fenol 0,02% em MEM-uso. Procedeu-se a diluição dos extratos das amostras e dos controles com MEM-uso de maneira a obter as diluições 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. O excesso de meio de cultura da microplaca foi substituído por 200 µL de cada diluição dos extratos, de acordo com a distribuição mostrada na FIG. 8, sendo que todas as amostras e controles foram testados em triplicata. A placa preparada foi novamente incubada em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂, a 37 °C por 24 horas (Rogerio et al., 2003).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
C	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%
D	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%
E	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%
F	MEM- uso	MEM- uso	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
G	MEM- uso	MEM- uso	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
H	MEM- uso	MEM- uso	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	100%	50%	25%	12,5%	6,25%

FIGURA 8 - Esquema da distribuição dos extratos das amostras e dos controles na microplaca.

Legenda:

■ Amostra 1; ■ Amostra 2; ■ Amostra 3; ■ Amostra 4;

■ Controle de células; ■ Controle negativo; ■ Controle positivo

Retiraram-se os extratos da microplaca e adicionou-se 200 μ L de solução de vermelho neutro em cada poço. A placa foi mantida durante 3 horas em estufa a 37 °C para que o corante vital fosse incorporado pelas células viáveis. Após esse período, a solução de vermelho neutro foi desprezada e a placa foi lavada duas vezes com solução tampão fosfato (PBS) com pH 7,4. Cada poço foi preenchido com 200 μ L de solução de lavagem (10% de CaCl₂ em solução de formaldeído 0,5%) e então substituídos por 200 μ L de solução de extração para que as células viáveis fossem lisadas e liberassem o corante vital. A leitora de microplacas foi utilizada para fazer a leitura da densidade óptica em 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi obtida pela divisão da média da densidade óptica de cada diluição pela média da densidade óptica do controle de células, multiplicada por 100. O IC₅₀ — 50% de Índice de Citotoxicidade —, que indica a morte celular de 50% das células, foi verificado após a montagem dos gráficos da concentração dos extratos em função da porcentagem de viabilidade celular.

4.2.3 Ensaio de Irritação Cutânea Primária

Os polímeros utilizados com sucesso no preparo das membranas também foram submetidos à avaliação do seu potencial irritante para a pele humana, mediante a observação e quantificação das reações cutâneas que podem surgir após uma única aplicação do produto sobre a pele dos animais.

Foram utilizados 6 coelhos da raça Nova Zelândia, machos ou fêmeas, com peso superior a 2,0 kg, para cada polímero avaliado. Os animais foram tricotomizados em duas áreas de 6,25 cm² na região dorsal, cerca de 24 horas antes do início do ensaio. Durante o período que se seguiu, foram mantidos em gaiolas individuais, em sala com temperatura controlada em 20 °C +/- 2 °C e com umidade relativa de 30 a 70%. Em cada animal, uma das áreas tricotomizadas serviu de controle negativo e na outra foi aplicada uma amostra de 1 cm² da membrana. As duas áreas foram cobertas com gaze e esparadrapo e protegidas por outra gaze envolvendo o corpo do animal. As amostras foram deixadas em contato com a pele do animal durante 24 horas e em seguida removidas. Realizou-se a leitura das áreas testadas após 24 e 72 horas do início do ensaio, avaliando-se a formação de eritema e edema. A formação de eritema é avaliada visualmente, de acordo com o método de Draize (Draize, 1944, 1959). Para avaliar a formação de edema utilizou-se um paquímetro para medir a espessura da pele do animal dobrada longitudinalmente. O cálculo do valor do edema é realizado através das seguintes equações:

$$Ed \text{ (mm)} = \frac{L_{24} - L_i}{2} \text{ e } Ed \text{ (mm)} = \frac{L_{72} - L_i}{2} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

Ed é o valor do edema, em milímetros;

L₂₄ é a medida da área teste na leitura de 24 horas;

L_i é a medida da área teste antes da aplicação do produto;

L₇₂ é a medida da área teste na leitura de 72 horas.

A graduação da intensidade das reações é baseada no método de Draize e está relacionada nas TAB. 1 e 2.

TABELA 1 - Graduação do eritema formado como reação cutânea a produtos que não alteram a cor da pele

Grau de reação	Reação	Características
0	Pele normal	Pele geralmente de cor branca ou rósea.
1	Eritema leve	Pele ligeiramente avermelhada, com tonalidade diferente da área controle.
2	Eritema bem definido	Pele avermelhada, geralmente em toda área.
3	Eritema moderado	Pele com vermelhidão intensa e difusa.
4	Eritema severo	Pele vermelha escura, com formação de escara.

TABELA 2 - Graduação do edema formado como reação cutânea à produtos que não alteram a cor da pele

Grau de reação	Reação	Características
0	Nenhum edema	O valor de edema está entre 0 e 0,24 mm.
1	Edema muito leve (pouco perceptível)	O valor de edema está entre 0,25 e 0,49 mm.
2	Edema leve	Existem áreas de bordas bem definidas com aumento perceptível. Ed deve estar entre 0,5 e 0,74 mm.
3	Edema moderado (bastante perceptível)	O valor de edema deve estar entre 0,75 e 1 mm.
4	Edema severo	O valor de edema é maior que 1 mm ou até maior que a área de exposição.

4.2.4 Teste de incorporação máxima de papaína

Para determinar a quantidade máxima possível de papaína que pode ser incorporada em cada polímero pesou-se uma quantidade conhecida do fármaco em um recipiente adequado, sendo este adicionado aos poucos, com homogeneização constante, em uma massa conhecida do polímero. O limite para a incorporação do fármaco foi a formação de uma mistura homogênea que ainda poderia ser facilmente distribuída sobre a superfície do molde. Por diferença entre as massas final e inicial do recipiente contendo a papaína determinou-se a concentração máxima possível de fármaco que poderia ser incorporado (comunicação oral Mara Tânia Silva Alcântara).

4.2.5 Preparo das membranas poliméricas contendo papaína

Os polímeros selecionados foram empregados no preparo de membranas incorporadas com a papaína. A TAB. 3 mostra como foi preparada cada membrana. Somente as membranas com resultados positivos de incorporação seguiram as etapas posteriores de análise.

TABELA 3 – Relação das membranas preparadas para incorporação da papaína

Membrana	Polímero	Concentração de papaína (% p/p)	Concentração de Cloridrato de L-cisteína (% p/p)	Solvente	Procedimento
1	AA	0,4	0,32	Água destilada (q.s.)	Adição do polímero sobre a dispersão
2	AA	0,4	0,32	Água destilada (q.s.)	Adição da dispersão sobre o polímero
3	LBNB	0,4	0,32	Água destilada (q.s.)	Adição do polímero sobre a dispersão
4	LBNB	0,4	0,32	Água destilada (q.s.)	Adição da dispersão sobre o polímero
5	LBNB	0,2	0,16	Água destilada (q.s.)	Adição da dispersão sobre o polímero
6	LBNB	0,4	0,32	10 partes de água destilada	Adição da solução sobre 10 partes do látex
7	LBNB	0,4	0,32	3 partes de água destilada	Adição da solução sobre 10 partes de látex diluído com 7 partes de água
8	LBNB	0,2	0,16	3 partes de água destilada	Adição da solução sobre 10 partes de látex diluído com 7 partes de água
9	SM	4,0	3,2	Água destilada (q.s.)	Adição do polímero sobre a solução
10	SB	4,0	3,2	Água destilada (q.s.)	Adição do polímero sobre a solução
11	SB	4,0	3,2	—	Adição do polímero sobre os pós
12	SM	1,0	0,8	—	Incorporação dos pós no polímero
13	SM	2,0	1,6	—	Incorporação dos pós no polímero

4.2.6 Curva analítica

Para construir a curva analítica pesaram-se exatamente cerca de 25 mg de papaína Merck 30000 USP/mg que foram solubilizados em solução tampão fosfato com cisteína-EDTA em um balão volumétrico de 250 mL. Desta solução-mãe transferiram-se de 300 μ L a 800 μ L para cinco balões volumétricos de 50 mL, cujo volume foi completado com solução tampão fosfato com cisteína-EDTA, de forma a obter as concentrações de 0,6; 1,2; 1,4; 1,5 e 1,6 μ g/mL.

Microplacas de 96 poços foram utilizadas para realizar a reação enzimática da papaína com seu substrato específico, de acordo com o procedimento de Pinto (2005). Cada diluição da papaína foi ensaiada em triplicata, de acordo com o esquema da FIG. 9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T ₀	t ₀	t ₀									
B	t ₁₅	t ₁₅	t ₁₅									
C	t ₃₀	t ₃₀	t ₃₀									
D	t ₄₅	t ₄₅	t ₄₅									
E												
F												
G												
H												

FIGURA 9 – Representação da microplaca de 96 poços indicando a distribuição das amostras.

Os poços da microplaca foram preenchidos com as seguintes soluções, na seqüência:

- 55 μ L de solução tampão fosfato com cisteína-EDTA;
- 125 μ L de solução do substrato N-CBZ-PHE-ARG-7-MCA;
- 40 μ L de solução de ácido acético 30% v/v nos poços da primeira linha de cada diluição, a fim de impedir que a reação acontecesse (t₀);
- 20 μ L da diluição de papaína preparada previamente;

- 40 µL de solução de ácido acético 30% v/v nos poços das linhas subseqüentes, a cada intervalo de 15 minutos, a fim de interromper a reação (t_{15} , t_{30} e t_{45}).

Durante todo o preparo da microplaca esta e todas as soluções foram mantidas em banho de gelo. Uma vez preparada, a microplaca foi levada ao banho-maria a 40 °C +/- 1 °C para iniciar a reação enzimática. Realizou-se a leitura no fluorímetro de placas FluorocountTM, com filtro de 360 nm para excitação e 460 nm para emissão. Os resultados obtidos para cada amostra foram utilizados na construção de gráficos de tempo em função do aumento de fluorescência, dos quais se obteve a velocidade de aumento de unidades de fluorescência por minuto para cada concentração de papaína (Pinto, 2005). As concentrações da papaína nos poços da microplaca foram: 1,5; 3,0; 3,5; 3,75 e 4,0 USP/mL.

De acordo com a Resolução Nº 899 (Brasil, 2003), calcularam-se os parâmetros precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação para a curva analítica obtida.

4.2.7 Ensaios de liberação em Célula de Franz

Foram preparadas 6 membranas de 0,08 g cada com o Polímero SM contendo 2% de papaína e 1,6% de cloridrato de L-cisteína monohidratado (Membrana 13). A cisteína é um ativador da papaína e foi utilizada no preparo da membrana por ser altamente solúvel em água, permitindo que poros fossem abertos na estrutura da matriz polimérica após sua solubilização, o que favoreceria a liberação da papaína. Os sólidos foram incorporados ao polímero por simples dispersão. O mesmo polímero foi utilizado para preparar outras 6 membranas de igual massa, sem papaína e cloridrato de L-cisteína monohidratado, para serem utilizadas como controle, a fim de verificar a interferência da matriz polimérica nos resultados. Metade das Membranas 13 e das membranas controle foram irradiadas com 25 kGy de raios γ , dose capaz de esterilizar materiais, a fim de verificar se a radiação γ pode interferir na estrutura da matriz polimérica e da enzima a ponto de alterar o perfil de liberação do fármaco.

A inativação de microorganismos por agentes esterilizantes envolve dano irreversível de moléculas essenciais à célula, como proteínas e o próprio DNA (Pinto, 2000). De acordo com Phillips (1997), a radiação ionizante apresenta uma vantagem como agente esterilizante de tecidos biológicos comparada aos métodos convencionais de esterilização de produtos médico-hospitalares: não gera resíduos radioativos, o material pode ser esterilizado na embalagem final e a confiabilidade é excelente. A referência normativa para o estabelecimento da dose esterilizante é a ISO 13409 (1996), que estabelece 25 kGy como a dose necessária para inativar os microorganismos viáveis presentes no material.

As membranas foram irradiadas na Embrarad no irradiador JS 9600, que utiliza fonte de ^{60}Co com atividade de 2.000.000 Ci. As amostras foram enviadas à Embrarad sempre em embalagens fechadas, protegidas da luz. As caixas contendo os materiais a serem irradiados são precisamente dispostas dentro de contêineres de modo a receberem a dose requerida. Os contêineres fazem um percurso dentro da câmara de irradiação em um intervalo de tempo determinado para que recebam a dose de radiação desejada. Todos os controles são automáticos, de maneira que se um dos contêineres desviar um pouco sua trajetória o irradiador é desligado imediatamente, garantindo a isodose.

As membranas foram submetidas ao teste de liberação utilizando células de difusão de Franz modificadas de fluxo estático e vertical. Foram realizados três ensaios de liberação com uma membrana-amostra (contendo papaína e cloridrato de L-cisteína monohidratado) e uma membrana-controle irradiadas e outros três ensaios com uma membrana-amostra e seu respectivo controle não irradiados. Em cada ensaio foi mantida também uma célula contendo uma solução de papaína com a mesma concentração do ponto médio da curva analítica, preparada em tampão fosfato com cisteína-EDTA, a fim de avaliar a recuperação do fármaco nas condições do experimento e verificar a interferência de sua instabilidade em solução aquosa nos resultados.

Recuperação ou Fator de Recuperação é a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material em teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Representa um dos processos utilizados para avaliar a exatidão de um método. A recuperação é expressa em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em

relação à quantidade adicionada na matriz, em um determinado número de ensaios. O intervalo aceitável de recuperação está geralmente entre 70 e 120%, com precisão de até +/- 20% (Ribani et al., 2004).

Na montagem das células, cada membrana avaliada foi presa entre os compartimentos doador e receptor da célula. O sistema foi preso com uma garra metálica e a membrana foi protegida com Parafilm®. O fluido receptor utilizado foi uma solução tampão fosfato com cisteína-EDTA, pH 6,0 +/- 0,1. As células montadas foram colocadas em banho termostaticado a 37 °C sob agitação. Coletas de 450 µL do fluido receptor foram realizadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 10, 12, 24, 26, 28 e 30 horas, acondicionadas em tubos eppendorf e mantidas em geladeira até o momento do ensaio de doseamento. O fluido receptor foi substituído completamente em cada célula após cada coleta (Guimarães, 2001; Lopes, 1999).

4.2.8 Ensaio de doseamento com substrato específico

Para verificar a quantidade de papaína liberada, as amostras coletadas de cada célula foram submetidas ao teste de doseamento. O doseamento da quantidade de papaína liberada em cada tempo de coleta foi realizado em placas de 96 poços utilizando-se o substrato específico fluorimétrico Carbobenzoxi-L-fenilalanina L-argina 4-metilcoumarina 7-amido, cujo produto hidrolítico é a metilcoumarina, um composto altamente fluorescente que é útil e sensível em determinações da atividade da papaína (Pinto, 2005).

O teste consiste em verificar a quantidade de metilcoumarina formada em função do tempo de reação. Para tanto, durante os 45 minutos do ensaio, a cada 15 minutos adiciona-se uma solução de ácido acético 30% nos poços correspondentes para inativar a enzima e paralisar a reação. A microplaca é analisada em fluorímetro e do gráfico gerado a partir dos valores de leitura obtém-se o aumento de fluorescência/minuto.

A microplaca é preparada em banho de gelo para garantir que a reação enzimática ocorra somente após o início do teste. Cada amostra coletada no ensaio de liberação é avaliada em triplicata. Em cada orifício são adicionadas as seguintes soluções, na ordem: 55µL de solução tampão fosfato com cisteína-EDTA, 125µL de solução do substrato específico em dimetilsulfóxido e 20µL da

amostra coletada no ensaio de liberação. Nos tempos 0, 15, 30 e 45 minutos adiciona-se 40 μ L da solução de ácido acético 30% para cessar a reação.

4.2.9 Análise do tamanho dos poros das membranas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV tem um importante papel na determinação da organização molecular e dos aspectos topográficos de polímeros. Neste método, um feixe de elétrons percorre a amostra com padrão constante e os elétrons secundários, emitidos da superfície do material, são coletados e cintilados. A potência do detector de cintilação é alimentada por um tubo de raios catódicos sincronizados com a varredura do feixe de elétrons, que são posteriormente processados por análise computacional, obtendo-se assim a imagem topográfica da amostra. As amostras são geralmente cobertas com uma fina camada de material condutor, como o ouro, antes de proceder a análise (Freeman, 1985).

Para esta análise foram utilizadas as seguintes membranas irradiadas: membrana-controle, Membrana 13 após ter sido submetida ao ensaio de liberação e Membrana 13 intacta, ou seja, não utilizada em um ensaio de liberação. Essas membranas foram fixadas com cola de prata sobre um suporte de alumínio e recobertas com ouro, na forma de plasma, em um pulverizador com corrente de 28 mA por três minutos. Após o tratamento com ouro, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura, no qual sua superfície foi visualizada.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro permite avaliar a capacidade, do material em análise, de causar a morte das células de uma cultura padronizada. A porcentagem de viabilidade celular da cultura determina se o material é seguro para ser utilizado como biomaterial (Rogerio et al., 2003), sendo que os valores superiores ao IC₅₀ são considerados não citotóxicos e os valores iguais ou inferiores são considerados citotóxicos.

A viabilidade das culturas celulares, após contato com ambas as dispersões de silicone (polímeros SM e SB), foi superior ao IC₅₀, como apresentado na FIG. 10. O LBNB e o adesivo acrílico, no entanto, se mostraram citotóxicos frente à cultura celular empregada, cuja viabilidade celular foi inferior ao IC₅₀ (FIG. 11).

FIGURA 10 - Viabilidade celular em função da concentração dos extratos das membranas preparadas com os Polímeros SM e SB.

FIGURA 11 - Viabilidade celular em função da concentração dos extratos das membranas preparadas com os Polímeros LBNB e AA.

5.2 Ensaio de Irritação Cutânea Primária

Materiais candidatos a serem utilizados para produção de dispositivos biomédicos e aprovados no teste de citotoxicidade *in vitro* podem ser submetidos ao ensaio de irritação cutânea primária para avaliar seu potencial irritante para o ser humano (Ministério da Saúde, 2002).

Os polímeros LBNB e AA resultaram citotóxicos (FIG. 11). Em razão disso, não foram submetidos ao ensaio de irritação cutânea primária.

Os doze animais testados apresentaram Grau de eritema 0 (Pele normal) e Grau de edema 0 (Nenhum edema), segundo a classificação apresentada nas TAB. 1 e 2 (vide item 4.2.2), como pode ser observado na FIG. 12. Dessa forma, o índice de irritação cutânea dos dois polímeros avaliados (SM e SB) é zero e, portanto, são considerados não irritantes.

FIGURA 12 - Região dorsal de animal submetido ao Ensaio de Irritação Cutânea Primária com o polímero SM. A - Área controle; B - Área com a amostra.

5.3 Teste de incorporação máxima de papaína

Este teste foi executado por diferença de massa de papaína incorporada nas membranas e a concentração máxima possível no polímero SM foi de 2% (Membrana 13).

5.4 Preparo das membranas poliméricas contendo papaína

Em paralelo aos testes de citotoxicidade e irritação cutânea primária foram preparadas as mesmas membranas poliméricas, porém com a papaína incorporada. O processo de reticulação foi realizado por reação química para as Membranas 3 a 9, 12 e 13 (TAB. 3). As Membranas 1 e 2 (polímero AA) e as Membranas 10 e 11 (polímero SB) foram submetidas ao processo de reticulação por tratamento térmico, conforme procedimento recomendado pelo fabricante. Nestas também foi testada a radiação γ para induzir a reticulação.

O critério para considerar as membranas preparadas adequadas ou não para serem submetidas ao ensaio de liberação foi a formação de um filme homogêneo e elástico, parâmetros avaliados visualmente. Nas figuras abaixo pode-se visualizar os aspectos resultantes dos procedimentos apresentados na TAB. 3, onde observa-se que apenas o polímero SM foi satisfatório (FIG. 13 a 18).

As Membranas 12 e 13 demonstraram resistência mecânica adequada, semelhante à membrana-controle feita com o mesmo polímero (FIG. 13 e 14). Nas Membranas 1 e 2 observou-se a formação de pequenos grumos (FIG. 15). As Membranas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 coagularam em contato com a papaína (FIG. 16).

Esse efeito foi menor para a membrana 5. A Membrana 9 formou filmes sem resistência mecânica (FIG. 17). Na Membrana 10 observou-se a formação de uma espécie de emulsão que não permitiu a formação do filme. No caso da Membrana 11 foi testada a radiação γ nas doses 5, 10 e 25 kGy para induzir a reticulação, após a verificação de que a papaína não suportou o processo de reticulação térmica. No entanto, esse procedimento também não se mostrou eficaz para induzir adequadamente a reticulação do polímero (FIG. 18).

FIGURA 13 –Aspecto da Membrana 13, feita com o polímero SM.

FIGURA 14 – Membrana-controle feita com o polímero SM.

FIGURA 15 - Formação de grumos após a incorporação da papaína ao adesivo acrílico.

FIGURA 16 – Formação de coágulo após a incorporação da papaína no LBNB.

FIGURA 17 – Filme da Membrana 9 formado sem resistência mecânica.

FIGURA 18 – Filme da Membrana 11 irradiada com 25 kGy formado sem resistência mecânica.

5.5 Ensaio de Liberação e Doseamento com Substrato Específico

Para determinar a quantidade máxima de papaína que pode ser liberada a partir dos dispositivos preparados, a Membrana 13 (2% de papaína) foi submetida ao ensaio de liberação *in vitro* com células de Franz.

O ensaio de liberação *in vitro* utilizando células de Franz foi realizado para determinar o perfil de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica. Em cada ensaio foram mantidas: uma célula para avaliação do perfil de liberação da Membrana 13, outra célula com uma membrana-controle e uma terceira contendo uma solução de papaína em tampão fosfato com cisteína-EDTA para verificar a recuperação do fármaco.

Para correlacionar os valores de unidades de fluorescência/minuto, obtidos após análise das amostras coletadas nas células de Franz, com a massa de papaína liberada construiu-se a curva analítica para a papaína (FIG. 19). Os limites de detecção e quantificação estimados foram de 0,25 USP/mL e 0,85 USP/mL, respectivamente.

FIGURA 19 –Curva analítica da papaína.

De acordo com os dados da TAB. 4 e como pode ser observado no gráfico da FIG. 20, a análise das amostras coletadas das membranas-controle durante os ensaios com as Membranas 13 irradiadas e não-irradiadas não apresentou leitura significativa.

TABELA 4 – Resultados obtidos das amostras coletadas das células de Franz contendo as membranas-controle durante os ensaios com as Membranas 13 irradiada e não-irradiada

USP/mL								
Membrana 13 não-irradiada					Membrana 13 irradiada			
Tempo (h)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média
0	0,9234	0,4634	0,4422	0,6097	0,3609	0,3864	0,4645	0,4040
2	0,6687	0,5161	0,4196	0,5348	0,4013	0,4380	0,3226	0,3873
4	0,5297	0,4643	0,3799	0,4580	0,5413	0,4196	0,4431	0,4680
6	0,6996	0,4450	0,4199	0,5215	0,4644	0,4229	0,4157	0,4343
10	0,5516	0,4431	0,4093	0,4680	0,4536	0,4128	0,4372	0,4345
12	0,5868	0,4450	0,4198	0,4839	0,3810	0,5442	0,4333	0,4528
24	0,4278	0,4138	0,4021	0,4145	0,4483	0,4870	0,3909	0,4421
26	0,4386	0,4318	0,3656	0,4120	0,4624	0,5381	0,3671	0,4559
28	0,5009	0,4160	0,4290	0,4486	0,4764	0,5684	0,3884	0,4777
30	0,4376	0,4313	0,5558	0,4749	0,4706	0,6053	0,4501	0,5087

FIGURA 20 – Média dos valores obtidos para as réplicas das Membranas-controle durante os ensaios com as Membranas 13 irradiada e não-irradiada.

Nos experimentos com as Membranas 13 não-irradiadas obteve-se 74,86% de recuperação da papaína e para as Membranas 13 irradiadas a recuperação do fármaco foi de 82,86%.

Os resultados obtidos do ensaio de liberação com as três réplicas das Membranas 13 não-irradiadas e sua média estão tabulados na TAB. 5. O perfil de liberação da papaína para as três réplicas está representado no gráfico da FIG. 21.

TABELA 5– Concentração de papaína liberada a partir da Membrana 13 não-irradiada nos intervalos de coleta da célula de Franz

USP/mL				
Tempo (h)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média
0	6,9991	0,4418	0,4882	2,6430
2	9,5101	11,6650	10,5916	10,5889
4	1,9036	1,8204	2,1176	1,9472
6	1,7792	2,1700	3,0689	2,3394
10	3,2281	1,5498	1,4233	2,0671
12	2,0266	2,4788	1,7923	2,0993
24	0,8203	1,9829	0,9523	1,2518
26	0,5653	1,8036	1,5221	1,2970
28	0,7508	1,6388	0,8726	1,0874
30	0,7629	1,3780	1,5320	1,2243

FIGURA 21 – Fluxo das três réplicas da Membrana 13 não-irradiada.

Pela visualização do gráfico da FIG. 21 observa-se que o perfil de liberação das três réplicas é bastante semelhante, como era esperado.

Os resultados obtidos do ensaio de liberação com a Membrana 13 irradiada estão tabulados na TAB. 6 e representados nos gráficos da FIG. 22.

TABELA 6 – Concentração de papaína liberada a partir da Membrana 13 irradiada nos intervalos de coleta da célula de Franz

USP/mL				
Tempo (h)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média
0	0,3669	0,4112	0,4444	0,4075
2	7,6706	11,1583	14,3117	11,0469
4	1,7408	2,5261	1,6037	1,9568
6	1,3987	2,6651	1,2276	1,7638
10	1,7068	1,4125	1,8802	1,6665
12	2,3902	1,6861	1,5240	1,8668
24	1,0148	0,6938	1,4877	1,0654
26	0,7846	0,6692	1,1226	0,8588
28	0,7441	0,6369	0,6930	0,6914
30	0,9794	0,8238	0,6793	0,8275

FIGURA 22 – Fluxo das três réplicas da Membrana 13 irradiada.

A FIG. 23 apresenta a média dos valores obtidos nos testes de liberação e doseamento das três réplicas das Membranas 13 não-irradiada e irradiada (TAB. 5 e 6, respectivamente).

FIGURA 23 – Média dos valores obtidos para as três réplicas das Membranas 13 irradiada e não-irradiada.

Como está demonstrado no gráfico da FIG. 23 observa-se um pico de liberação da papaína duas horas após o início do ensaio, tanto nas Membranas 13 irradiadas como nas não-irradiadas. A partir da coleta de quatro horas a liberação cai bruscamente e diminui continuamente até o término do experimento em ambos os casos.

O gráfico da FIG. 23 apresenta um perfil de liberação da papaína bastante semelhante nas membranas irradiadas e não-irradiadas.

A quantidade acumulada de papaína liberada das Membranas 13 irradiada e não-irradiada também foi calculada e está apresentada na TAB. 7 e no gráfico da FIG. 24 referente a essa tabela.

TABELA 7 – Concentração acumulada de papaína liberada a partir das Membranas 13 irradiada e não-irradiada nos intervalos de coleta da célula de Franz

USP/mL acumulada		
Tempo (h)	Membrana 13 não-irradiada	Membrana 13 irradiada
0	2,6430	0,4075
2	13,2319	11,4544
4	15,1791	13,4112
6	17,5185	15,1750
10	19,5856	16,8416
12	21,6849	18,7083
24	22,9367	19,7738
26	24,2337	20,6325
28	25,3211	21,3239
30	26,5454	22,1514
Desvio padrão	7,19	6,51

FIGURA 24 – Concentração acumulada de papaína liberada a partir das Membranas 13 irradiada e não-irradiada nos intervalos de coleta da célula de Franz.

Como pode ser observado no gráfico da FIG. 24, parece não haver diferença significativa entre a quantidade de papaína liberada acumulada das Membranas 13 irradiada e não-irradiada.

5.6 Análise do tamanho dos poros das membranas por Microscopia Eletrônica de Varredura

Após análise por MEV da estrutura da Membrana 13 irradiada, observa-se que a matriz polimérica formada é muito densa e seus retículos são muito pequenos (FIG. 25).

FIGURA 25 – Estrutura da matriz polimérica da Membrana 13 irradiada e seu respectivo controle analisados por MEV. A- Membrana-controle. B- Membrana intacta; observar vesículas contendo a papaína (setas). C- Membrana intacta; visualização de um aglomerado de papaína. D- Visualização da membrana após ter sido submetida ao ensaio de liberação; um poro formado após a liberação do fármaco é mostrado em destaque (seta). E e F- Visualização do poro em maior aumento e da estrutura da matriz em torno de sua abertura. G- Estrutura da matriz em torno do poro no maior aumento possível.

6 Discussão

Segundo Montenegro (2004), a cicatrização é um processo de reparo tecidual realizado por meio da proliferação do tecido conjuntivo fibroso, no qual o tecido preexistente é substituído por uma cicatriz fibrosa.

O debridamento é um importante mecanismo para o reparo de ferimentos realizado por enzimas proteolíticas e constitui uma etapa essencial no tratamento de escaras, por exemplo. Essas enzimas liquefazem o tecido necrótico, o que facilita sua separação do tecido sadio e favorece o processo de cicatrização (Mc Grath, 1988).

Existem muitas substâncias que podem ser empregadas para acelerar o processo de cicatrização, mas uma ainda muito utilizada nesses casos é a papaína, uma enzima que age reduzindo a inflamação e favorece a cicatrização, atuando apenas no tecido lesado (Flindt, 1978). Segundo Monetta (1990, 1988, 1987), a papaína facilita a limpeza de feridas, tecidos necrosados e secreções, estimulando os processos regenerativos. Sua importância é ainda maior no tratamento de ferimentos de difícil recuperação (Mc Grath, 1988; Monetta, 1987; Monetta, 1988).

Apesar de sua ampla utilização como agente debridante e cicatrizante, é difícil comercializar a papaína em uma forma farmacêutica estabelecida devido à sua baixa estabilidade. De maneira geral, segundo Sim e colaboradores (2000), a maioria das enzimas perdem sua atividade biológica à temperatura ambiente em um mês ou mais. Em razão disso, hospitais de São Paulo utilizavam a papaína na forma de solução aquosa preparada extemporaneamente (Velasco, 1993). Um gel de papaína 0,4% p/v, para aplicação diária em pacientes com ferimentos, abscessos, úlceras e úlceras de decúbito e com estabilidade aceitável durante até 60 dias, foi desenvolvido e padronizado por Velasco (1993). No entanto, essa forma farmacêutica não oferece proteção contra agentes externos e, como citado, a estabilidade da papaína permanece relativamente baixa.

Nesse contexto, existem algumas opções de sistemas que podem aumentar a estabilidade de enzimas e favorecer seu emprego como fármaco no desenvolvimento de medicamentos. A formação de complexos com ciclodextrinas e a imobilização com polímeros são alguns exemplos.

As ciclodextrinas são utilizadas como estabilizantes em formulações contendo proteínas de maneira geral. A hidroxipropil ciclodextrina, por exemplo, é utilizada para proteger hormônios de crescimento suínos da denaturação térmica (Sinha & Trehan, 2003).

A imobilização de enzimas é um processo muito utilizado para aumentar sua estabilidade. Verifica-se que após a imobilização as enzimas retêm consideravelmente sua atividade biológica e ao mesmo tempo exibem resistência à desnaturação por altas temperaturas e outros agentes (Rajalakshmi & Sundaram, 1995; Holme, 1993; Rialdi, 1996). De acordo com Kumakura & Kaetsu (1984), particularmente, proteases imobilizadas são freqüentemente mais estáveis devido à proteção da autólise.

Proteínas como a α -quimotripsina (Sundaram & Venkatesh, 1998), bromelina (Furuta et al., 2002), organofósforo-hidrolase (Lee et al., 2003), acetilcolina esterase e colina oxidase (Konno et al., 2004) já foram testadas para imobilização em polímeros.

A própria papaína tem sido utilizada há tempos em estudos de ligação de enzimas a matrizes poliméricas por meio de imobilização, com o objetivo de aumentar a estabilidade e atividade enzimáticas (Kumakura & Kaetsu, 1984; Jayakumari & Pillai, 1991; SIM et al., 2000; Miyamoto *et al.*, 2004a, 2004b).

Segundo Sinha & Trehan (2003), o sucesso comercial de proteínas terapêuticas depende grandemente do desenvolvimento de tecnologias para melhorar e controlar a liberação desses fármacos. No entanto, as complexidades bioquímicas e estruturais das proteínas, comparadas aos fármacos convencionais, torna o desenvolvimento de formulações para liberação de proteínas terapêuticas uma tarefa desafiadora e muito difícil.

Uma alternativa encontrada para tentar utilizar a papaína como agente cicatrizante em uma forma farmacêutica estabelecida e com estabilidade melhorada foi incorporá-la em uma matriz polimérica, de modo a obter um sistema tópico de liberação controlada.

Para isso, polímeros de aplicação médica foram selecionados para servirem de matriz. O látex de borracha natural foi selecionado por ser hipoalergênico e porque pode ser vulcanizado por radiação γ ou feixe de elétrons, apresentando após esse processo boas propriedades elásticas e mecânicas, sendo ainda de fácil obtenção. O adesivo acrílico é uma dispersão aquosa

hipoalergênica que forma filmes adesivos sensíveis à pressão, indicado para a produção de curativos. As duas dispersões de silicone são de grau médico e permitem a formação de um filme transparente, flexível e elástico.

Esses materiais foram utilizados no preparo de membranas, que foram submetidas ao teste de citotoxicidade pelo método da incorporação do vermelho neutro. O teste permite analisar a citotoxicidade ou reatividade biológica induzida pelo material testado em culturas celulares, tomando como parâmetro a viabilidade celular. Segundo Eisenbrand e colaboradores (2002), métodos que avaliam a citotoxicidade basal detectam a capacidade de um material em causar morte celular como consequência de danos na função básica da célula e apresentam boa correlação com a toxicidade aguda em animais e no homem.

De acordo com a Organização Internacional de Padronização — International Standard Organization, ISO 10993 — o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Após a comprovação da não-toxicidade do material os estudos de biocompatibilidade podem ser continuados utilizando-se animais de laboratório (Rogero et al., 2003).

Como era esperado, a viabilidade celular da cultura empregada no teste de citotoxicidade foi superior ao IC₅₀ para as duas dispersões de silicone de grau médico (polímeros SM e SB), o que indica que essas não apresentam efeito citotóxico (FIG. 10). Isso significa que esses materiais são biologicamente seguros, cumprindo um dos requisitos de segurança exigidos para biomateriais. No entanto, o LBNB e o adesivo acrílico demonstraram ser citotóxicos (FIG. 11) de acordo com o método empregado. Apesar desse resultado, pode-se considerar que o LBNB e o polímero AA possam ser utilizados como biomateriais, uma vez que deve-se fazer a correlação do IC₅₀ com o DL₅₀, pois nem sempre o material considerado citotóxico apresenta realmente risco de morte para o ser humano (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, 2001). No entanto, para este trabalho, decidiu-se considerar o resultado obtido e não utilizar esses materiais nos ensaios subseqüentes.

Uma vez aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, o material em análise pode ser submetido ao ensaio de irritação cutânea primária para avaliar sua capacidade de causar reações cutâneas em animais padronizados. O

resultado deste ensaio indica a capacidade irritante do material para a pele humana.

Os polímeros SM e SB, considerados não-citotóxicos, foram também classificados como não irritantes após o ensaio *in vivo* em animais. Como pode ser observado na FIG. 12, a área onde foi mantida a amostra em contato com a pele do animal apresentou-se livre de edema e eritema como a área mantida como controle. Isso significa que podem ser utilizados no preparo de dispositivos biomédicos para seres humanos.

Paralelamente aos testes de citotoxicidade e de irritação cutânea primária foram preparadas as membranas, com os mesmos polímeros, contendo papaína. Nas Membranas 1 e 2, preparadas com o polímero AA (TAB. 3), verificou-se uma espécie de incompatibilidade do polímero com a papaína, devido à formação de pequenos grumos (FIG. 15). No preparo das Membranas 3 a 8 observou-se a formação de um coágulo no momento da adição da papaína sobre o LBNB (FIG. 16). A coagulação observada pode ser devida à alteração da concentração de sólidos na emulsão do látex ou à uma alteração no equilíbrio ácido-base. Na Membrana 9 observou-se a formação de um filme sem resistência mecânica (FIG. 17), provavelmente por causa da baixa reticulação do polímero na presença da água. A Membrana 10 não chegou a formar um filme, devido à formação de uma espécie de emulsão, que impediu a reticulação do polímero. A incompatibilidade observada deve-se provavelmente à presença de água, mesmo que esta tenha sido adicionada em pequena quantidade. A Membrana 11 foi submetida à reticulação por tratamento térmico, de acordo com o processo indicado pelo fabricante. No entanto, a papaína se mostrou sensível à temperatura utilizada. Na tentativa de induzir a reticulação da Membrana 11 de maneira alternativa, empregou-se a radiação γ nas doses de 5, 10 e 25 kGy. Porém, este processo também não foi eficiente para reticular o polímero de maneira a obter um filme (FIG. 18). As Membranas 12 e 13 se mostraram adequadas para serem submetidas ao ensaio de liberação, uma vez que formaram um filme homogêneo, elástico e com resistência mecânica adequada, assim como a própria membrana-controle preparada com o mesmo polímero (FIG. 13 e 14).

De acordo com Chien (1987b), a cinética de liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação controlada pode ser avaliada utilizando uma célula

de difusão. As Membranas 13 irradiada e não-irradiada foram submetidas ao ensaio de liberação com células de Franz para que o perfil de liberação da papaína a partir da matriz polimérica fosse identificado. Os ensaios tiveram duração de 30 horas, uma vez que desenvolver um dispositivo biomédico com atividade cicatrizante que possa ser substituído a cada 24 horas, para conforto do paciente, é um dos objetivos do projeto.

A partir da curva analítica apresentada na FIG. 19, os valores de unidades de fluorescência/minuto foram convertidos em USP/mL, concentração da substância nos poços da microplaca. A grandeza USP foi utilizada para todos os cálculos, uma vez que exprime a quantidade de papaína que está realmente ativa e que é passível de ser quantificada.

Como era esperado, a análise das amostras coletadas das membranas-controle não apresentou leitura significativa (TAB. 4 e FIG. 20), o que indica que a matriz polimérica não interfere nos resultados.

O fator de recuperação da papaína nos experimentos com as Membranas 13 não-irradiadas foi de 74,86% e de 82,86% para as Membranas 13 irradiadas. Esses valores estão dentro do intervalo aceitável, o que garante que não houve interferência da matriz polimérica nos resultados obtidos, corroborando os dados das células com as membranas-controle.

O gráfico da FIG. 21 (vide dados na TAB. 5) mostra que o perfil de liberação da papaína a partir da Membrana 13 não-irradiada é muito semelhante nas três réplicas, o que indica uma homogeneidade nos dados. O mesmo padrão se repete para as três réplicas da Membrana 13 irradiada (vide gráfico da FIG. 22, TAB. 6).

Observando o gráfico da FIG. 23 verifica-se que há um *burst effect*, ou seja, um pico de liberação da papaína a partir das membranas irradiadas e não-irradiadas até duas horas após o início do ensaio. A partir de quatro horas após o início do experimento a quantidade de fármaco liberado cai bruscamente e diminui continuamente até o término do ensaio nos dois tipos de membrana.

No gráfico da FIG. 23 está demonstrado que o perfil de liberação da papaína a partir das membranas irradiadas e não-irradiadas é bastante semelhante, o que indica que a irradiação das membranas com raios γ na dose de 25 kGy não afeta significativamente o perfil de liberação do fármaco.

De acordo com o gráfico da FIG. 24, parece não haver diferença significativa entre a quantidade de papaína liberada acumulada das Membranas 13 irradiada e não-irradiada. Isso sugere que o uso da radiação γ para esterilizar o dispositivo não interfere significativamente no perfil de liberação do fármaco. Ainda, deve-se destacar que a papaína é resistente à radiação γ , pelo menos nas condições testadas. Além disso, observa-se que existe uma liberação constante do fármaco a partir da membrana durante as 12 horas iniciais do experimento. Clinicamente, o uso deste dispositivo representaria duas aplicações diárias sobre a lesão, com uma troca a cada 12 horas.

Considerando que a concentração de uso da papaína como agente cicatrizante em uma forma farmacêutica é de 0,2% (Velasco, 1993), que a potência da papaína Merck utilizada é de 30.000 USP/mg e que as Membranas 13 têm massa igual a 80 mg, são necessários 4.800 USP de papaína em cada membrana para que o dispositivo possa ser utilizado como cicatrizante. Foi incorporado em cada membrana 48.000 USP de papaína, uma dose 10 vezes maior que a necessária, considerando uma liberação total do fármaco a partir do dispositivo. Apesar disso, observando os dados da TAB. 7 e do gráfico da FIG. 24 verifica-se que foram liberados no total, em média, 24 USP/mL de papaína em cada membrana. Considerando o volume médio das células de difusão como sendo 12 mL, tem-se uma liberação acumulada média de 288 USP de papaína para ambas as membranas, o que equivale a 9,6 μ g do fármaco liberado. Estudos *in vivo* são necessários para verificar se a quantidade de papaína liberada a partir do dispositivo desenvolvido apresenta clinicamente atividade cicatrizante ou não.

A análise, por MEV, da estrutura da Membrana 13 irradiada, revelou que a matriz polimérica formada é bastante densa (FIG. 25-A, B e D) e que, portanto, seus retículos são muito pequenos (FIG. 25-F e G). Observa-se na FIG. 25-C que a papaína encontra-se na forma de aglomerados, devido à sua baixa solubilidade na membrana. Comparando-se as FIG. 25-B e D, observa-se que ocorre uma suavização do relevo da membrana após a liberação do fármaco a partir de sua superfície, com a resultante formação de poros (FIG. 25-E). Considerando o tamanho dos retículos formados na membrana e o perfil de liberação da papaína observado no gráfico da FIG. 24, conclui-se que ocorre liberação controlada da papaína a partir das membranas avaliadas nas primeiras

12 horas dos ensaios, que o *burst effect* que ocorre até duas horas após o início dos experimentos deve-se a uma maior quantidade do fármaco que está na superfície do dispositivo e que o restante da papaína liberada foi deslocado do interior da matriz polimérica.

Considerando a eficiência e a importância do uso da MEV para a determinação da topografia de polímeros, pode-se considerar a análise de membranas por essa técnica como uma das primeiras etapas na seleção de polímeros no preparo de sistemas de liberação controlada de fármacos.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As membranas de silicone se mostraram adequadas para incorporação da papaína;
- As mesmas não são citotóxicas e tampouco apresentam capacidade de causar irritação cutânea primária;
- O dispositivo não apresenta perfil de liberação controlada da papaína, não sendo adequado para ser utilizado como medicamento promotor de cicatrização.

GLOSSÁRIO

Barreira — região ou regiões que oferecem resistência à passagem do difusante, sendo a barreira total a soma das resistências individuais das membranas entre os compartimentos doador e receptor.

Gradiente de concentração — mudança na concentração de uma solução em função da distância.

Permeabilidade — capacidade da pele de permitir que uma substância flua através de suas camadas.

Permeação e absorção transcutânea ou percutânea — transporte de uma substância através da pele. Ocorre com produtos transdérmicos.

Produto de ação transdérmica — produto aplicado sobre a pele capaz de exercer efeito sistêmico. Deve apresentar baixa retenção do fármaco na pele e grande fluxo através dela.

Produto dermatológico — produto aplicado sobre a pele destinado a agir somente sobre ela. Deve apresentar alta retenção do fármaco na pele e pequeno fluxo através dela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABBASI, F.; MIRZADEH, H. Adhesion between modified and unmodified poly(dimethylsiloxane) layers for a biomedical application. ***International Journal of Adhesion & Adhesives***, v. 24, p. 247-257, 2004.
- 2 ARTEL, B.W.H. Efeitos da radiação em polímeros. **Plástico Moderno**, São Paulo, ago. 2000. Disponível em: <<http://www.plastico.com.br/revista/pm312/radiacao2.htm>>. Acesso em: 4 dez. 2003.
- 3 BANGA, A.K.; CHIEN, Y.W. Dermal absorption of peptides and proteins. In: AUDUS, K.L.; RAUB, T.J. ***Biological Barriers to Protein Delivery – Pharmaceutical Biotechnology***, v. 4. New York: Plenum, 1993. cap. 8, p. 179-195.
- 4 BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON, M.E. ***Delineamento de formas farmacêuticas***. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2005. cap. 33, p. 504-536.
- 5 BARRY, B.W. Structure, function, diseases and topical treatment of human skin. In: BARRY, B.W. ***Dermatological formulations: percutaneous absorption***. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 1-48.
- 6 BAUMANN, L.; WEISBERG, E. ***Cosmetic dermatology: principles and practice***. New York: McGraw-Hill, 2002, 226 p.
- 7 BENTLEY, M.V.L.B. ***Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia in vitro***. 1994. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 8 BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v. 57, p. 19-34, 2004.
- 9 BERNARD, D.; MÉHUL, B.; THOMAS-COLLIGNON, A.; SIMONETTI, L.; REMY, V.; BERNARD, M.A.; SCHMIDT, R. Analysis of proteins with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called “stratum corneum thiol protease” as cathepsin L2. ***Journal of Investigative Dermatology***, v. 120, n. 4, p. 592-600, 2003.
- 10 BOGNER, R.H.; LIU, J.C.; CHIEN, Y.W. Kinetics of curing and physicommechanical behavior of silicone membrane. ***Journal of Controlled Release***, v. 14, p. 11-19, 1990.

- 11 BONINA, P.; PETROVA, T.; MANOLOVA, N. pH-sensitive hydrogels composed of chitosan and polyacrylamide – Preparation and properties. ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers***, v. 19, p. 101-116, 2004.
- 12 BOS, J.D.; MEINARDI, M.M.H.M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. ***Experimental Dermatology***, v. 9, n. 3, p. 165-169, 2000.
- 13 BRADEN, M.; LATHAM, D.; PATEL, M.P. Observations on the swelling of cross-linked poly(dimethylsiloxane) networks by solvents. ***European Polymer Journal***, v. 41, p. 3069-3071, 2005.
- 14 BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução Nº 899, 2003.
- 15 BROOKS, G.; SCHOLTZ, D.B.; PARISH, D.; BENNETT, S. Envelhecimento e o futuro das enzimas em cosméticos. ***Cosmetics & Toiletries***, ed. Português, São Paulo, v. 11, p. 62-69, 1999.
- 16 CHIEN, Y.W. Advances in transdermal systemic medication. In: CHIEN, Y.W. ***Transdermal controlled systemic medications***. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 1-22. (a)
- 17 CHIEN, Y.W. Developmental concepts and practice in transdermal therapeutic systems. In: CHIEN, Y.W. ***Transdermal controlled systemic medications***. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 25-81. (b)
- 18 COOPER, E.R. Alterations in skin permeability. In: CHIEN, Y.W. ***Transdermal controlled systemic medications***. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 83-91.
- 19 COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ***Robbins – Patologia estrutural e funcional***. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 20 CRUZ, A.S. ***Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos***. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 21 DE POLO, K.F. ***A short textbook of cosmetology***. Augsburg (Germany): Verlag, 1998, p. 31-33.
- 22 DRAIZE, J.H. Dermal toxicity: appraisal of the safety chemicals in foods, drugs and cosmetics. ***Association of Food and Drug Officials of the United States***, p. 46-59, 1959.
- 23 DRAIZE, J.H., WOODARD, G., CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. ***Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***, v. 83, p. 377-390, 1944.
- 24 EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J-C.;

- PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.
- 25 FLINDT, M. Health and safety aspects of working with enzymes. **Process Biochemistry**, v. 13, n. 8, p. 3-7, 1978.
- 26 FREEMAN, W.J. Characterization of polymers. In: MARK, H.F.; BIKALES, N.M.; OVERBERGER, C.G.; MENGES, G. **Encyclopedia of polymer science and engineering**, v. 3. New York: John Wiley & Sons, 1985, p. 290-327.
- 27 FURUTA, M.; OKA, M.; HAYASHI, T. Radiation sterilization of enzyme hybrids with biodegradable polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 63, p. 323-325, 2002.
- 28 GOLOMB, G.; FISHER, P.; RAHAMIM, E. The relationship between drug release rate, particle size and swelling of silicone matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 12, p. 121-132, 1990.
- 29 GUIMARÃES, M. **Avaliação da liberação e permeação em membrana sintética do cetoconazol em cremes O/A**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 30 HARDING, C.R.; WATKINSON, A.; RAWLINGS, A.V.; SCOTT, I.R. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p. 21-52, 2000.
- 31 HOLME, D.J.; PECK, H. **Analytical Biochemistry**. 2^a ed. New York: Longman, p. 308-11, 1993.
- 32 INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity**. Aug. 2001. (NIH publication Nº 01-4500).
- 33 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Sterilization of health care products – radiation sterilization – substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches**, 1996 (ISO 13409).
- 34 JAYAKUMARI, V.G.; PILLAI, V.N.R. Immobilization of papain on crosslinked polymer supports: role of the macromolecular matrix on enzymic activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 42, p. 583-590, 1991.
- 35 KAMPHUIS, I.G.; KALK, K.H.; SWARTE, M.B.A.; DRENT, J. Structure of papain refined at 1.65 angstrom resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 179, p. 233-256, 1984.
- 36 KONNO, T.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Conjugation of enzymes on polymer nanoparticles covered with phosphorylcholine groups. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 342-347, 2004.

- 37 KUMAKURA, M.; KAETSU, I. Behavior of enzyme activity in immobilized proteases. ***International Journal of Biochemistry***, v. 16, n. 11, p. 1159-1161, 1984.
- 38 KURISAWA, M.; YUI, N. Dual-stimuli-responsive drug release from interpenetrating polymer network-structured hydrogels of gelatin and dextran. ***Journal of Controlled Release***, v. 54, p. 191-200, 1998.
- 39 LAWRENCE, E.L.; TURNER, I.G. Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. ***Medical Engineering & Physics***, v. 27, p. 443-453, 2005.
- 40 LEE, Y.; STANISH, I.; RASTOGI, V.; CHENG, T.; SINGH, A. Sustained enzyme activity of organophosphorus hydrolase in polymer encased multilayer assemblies. ***Langmuir***, v. 19, p. 1330-1336, 2003.
- 41 LOPES, P.S. ***Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos***. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 42 LOPES, P.S. ***Influência da papaína e do óleo de Pequi na penetração percutânea do diclofenaco de sódio***. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 43 MAHKAM, M. Controlled release of biomolecules from pH-sensitive hydrogels prepared by radiation polymerization. ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers***, v. 19, p. 209-220, 2004.
- 44 MAILLARD-SALIN, D.G.; BÉCOURT, P.; COUARRAZE, G. A study of the adhesive-skin interface: correlation between adhesion and passage of a drug. ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 200, p. 121-126, 2000. (a)
- 45 MAILLARD-SALIN, D.G.; BÉCOURT, P.; COUARRAZE, G. Physical evaluation of a new patch made of a progestomimetic in a silicone matrix. ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 199, p. 29-38, 2000. (b)
- 46 MARK, H.F.; BIKALES, N.M.; OVERBERGER, C.G.; MENGES, G.; KROSCWITZ, J.I. ***Encyclopedia of polymer science and engineering***. 2nd ed., v. 15. New York: John Wiley, 1989.
- 47 MARTIN, A.N. ***Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences***. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 324-355.
- 48 MC GRATH, C. Papaya dressing for skin ulcer debridement. ***Canadian Journal of Hospital Pharmacy***, v. 41, n. 3, p. 159-160, 1988.

- 49 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Ensaio de irritação cutânea primária. 2002.
- 50 MIYAMOTO, D.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Effect of water-soluble phospholipids polymers conjugated with papain on the enzymatic stability. **Biomaterials**, v. 25, p. 71-76, 2004. (a)
- 51 MIYAMOTO, D.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Highly stabilized papain conjugated with water-soluble phospholipid polymer chain having a reacting terminal group. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, p. 827-832, 2004. (b)
- 52 MONETTA, L. A importância da atuação científica do enfermeiro na execução dos curativos feitos com papaína. **Revista Paulista de Enfermagem**, v. 9, n.3, p. 83-87, 1990.
- 53 MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Enfoque**, v. 16, n. 3, p. 64-68, 1988.
- 54 MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 40, n. 1, p. 66-73, 1987.
- 55 MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: processo gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- 56 NAHRUP, J.S.; GAO, Z.M.; MARK, J.E.; SAKR, A. Poly(dimethylsiloxane) coatings for controlled drug release—polymer modifications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, p. 199-208, 2004.
- 57 O'NEIL, M.J. (Ed.) **The Merck index**. 13^a. ed. Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, 2001, p. 7089.
- 58 PHILLIPS, G.O. (Coord. Ed.). **Multi-media distance learning package on tissue banking**. Singapore: National University of Singapore, IAEA/NUS Regional Training Centre (RCA), IAEA/NUS Interregional Training Centre 5, 1997.
- 59 PIEPER, B.; CALIRI, M.H.L. Nontraditional wound care: a review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. **Journal of WOCN**, v. 30, p. 175-183, 2003.
- 60 PINTO, C.A.S.O. **Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas contendo papaína livre e modificada**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 61 PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000.

- 62 RAJALAKSHMI, N.; SUNDARAM, P. V. Stability of native and covalently modified papain, ***Protein Engineering***, v. 8, n. 10, p. 1039-1047, 1995.
- 63 REICHMANIS, E.; O'DONNELL, J.H. ***The effects of radiation on high-technology polymers***. Washington DC: American Chemical Society, 1989.
- 64 RIALDI, G.; BATTISTEL, E. Unfolding mechanism and stability of immobilized papain, ***Journal of Thermal Analysis***, v. 47, p. 17-25, 1996.
- 65 RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. ***Química Nova***, v. 27, n. 0, p. 1-10, 2004.
- 66 ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. ***Materials Research***, v. 6, n. 3, p. 1-4, 2003.
- 67 ROH, C.; LYLE, S. Cutaneous stem cells and wound healing. ***Pediatric Research***, v. 59, n. 4, part 2, p. 100R-103R, 2006.
- 68 SANTOS, E. P. Enzimas em cosmetologia. ***Cosmetics & Toiletries***, ed. Português, São Paulo, v. 13, p. 66-71, 2001.
- 69 SASMITO, T.; DEMEESTER, J.; BRACKE, M. Review on the production, properties and uses of papain. ***Pharmaceutisch Tijdschrift voor België***, v. 59, n. 2, p. 149-158, 1982.
- 70 SIM, Y.C.; LEE, S.G.; LEE, D.C.; KANG, B.Y.; PARK, K.M.; LEE, J.Y.; KIM, M.S.; CHANG, I.S.; RHEE, J.S. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products, ***Biotechnology Letters***, v. 22, p. 137-140, 2000.
- 71 SINHA, V.R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. ***Journal of Controlled Release***, v. 90, p. 261-280, 2003.
- 72 SPINKS, J.W.T.; WOODS, R.J. ***An introduction to radiation chemistry***. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1990.
- 73 STARLEY, I.F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S.W. The treatment of paediatric burns using topical papaya. ***Burns***, v. 25, p. 636-639, 1999.
- 74 SUNDARAM, P.V.; VENKATESH, R. Retardation of thermal and urea induced inactivation of α -chymotrypsin by modification with carbohydrate polymers. ***Protein Engineering***, v. 11, n. 8, p. 699-705, 1998.
- 75 SUTINEN, R.; KOVANEN, A.; URTTI, A.; PARONEN, P. Diffusion kinetics of alkyl p-aminobenzoates in silicone polymers and their release from silicone reservoir devices. ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 57, p. 149-154, 1989.

- 76 SWEETMAN, S.C. (Ed.) **Martindale: the complete drug reference**. 33. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2002, p. 1647, 1648.
- 77 TODDYWALA, R.; CHIEN, Y.W. Evaluation of silicone-based pressure-sensitive adhesives for transdermal drug delivery. I. Effect of penetrant hydrophilicity. **Journal of Controlled Release**, v. 14, p. 29-41, 1990.
- 78 TODDYWALA, R.D.; ULMAN, K.; WALTERS, P.; CHIEN, Y.W. Effect of physicochemical properties of adhesive on the release, skin permeation and adhesiveness of adhesive-type transdermal drug delivery systems (a-TDD) containing silicone-based pressure-sensitive adhesives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 76, p. 77-89, 1991.
- 79 VALENTA, C.; AUNER, B.G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 279-289, 2004.
- 80 VELASCO, M.V.R. **Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico**. 1993. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 81 XU, W.; XIAO, Z.; ZHANG, T. Mechanical properties of silicone elastomer on temperature in biomaterial application. **Materials Letters**, v. 59, p. 2153-2155, 2005.
- 82 YE, W.P.; CHIEN, Y.W. Dual-controlled drug delivery across biodegradable copolymer. II. Delivery kinetics of levonorgestrel and estradiol from (matrix/matrix) laminate drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 41, p. 259-269, 1996.
- 83 ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D.A. Denaturation studies of active-site labeled papain using electron paramagnetic resonance and fluorescence spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 60, p. 623-28, 1991.