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

Liberação e permeação dérmica "in vitro" de hidrogel de cafeína em comparação ao uso de papaína como promotora de permeação

TIAGO CÉSAR DOS SANTOS MAIA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo
2018

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

Liberação e permeação dérmica "in vitro" de hidrogel de cafeína em comparação ao uso de papaína como promotora de permeação

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

TIAGO CÉSAR DOS SANTOS MAIA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo
2018

Fonte de Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

MAIA, T. C. S. ***Liberação e permeação dérmica "in vitro" de hidrogel de cafeína em comparação ao uso de papaína como promotora de permeação***. 2018. 57 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Maia, Tiago Cesar Santos Liberação e permeação dérmica "in vitro" de hidrogel de cafeína em comparação ao uso de papaína como promotora de permeação / Tiago Cesar Santos Maia; orientador Ademar Benévolo Lugão. -- São Paulo, 2018.
57 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018.

1. Hidrogel. 2. Cafeína. 3. Papaína. 4. Permeação. I. Lugão, Ademar Benévolo, orient. II. Doutor.

À Deus por essa oportunidade de realizar mais um sonho e me dar forças quando pensei em desistir.

À minha família por sempre me apoiar mesmo tão distante.

À minha mãe, por ter movido céus e terras para que hoje eu pudesse ser quem sou. Mãe, nada nesse mundo é capaz de pagar o que você fez e faz por mim.

Ao meu amor, Rodrigo de Abreu por estar sempre presente, ajudando-me, incentivando e abdicando de momentos em prol desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e sempre irei agradecer primeiramente a Deus, por todo discernimento e ajuda espiritual, obrigado por me iluminar, atender meus pedidos quando mais precisei. Obrigado Senhor!

Ao meu orientador, Prof. Dr Ademar Benévolo Lugão, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela orientação.

À Prof. Dra Maria José Alves de Oliveira pela incansável disposição em me ajudar. Se hoje consegui, certamente, você fez, faz e fará parte desse sonho. Obrigado pelos ensinamentos, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Costa Varca, pela disposição em me ajudar sempre que precisava.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida.

À família que adquiri no CQMA: Mara Mêllo, Mara Alcântara, Jéssica Leal, Giovanni Morselli, Mariana Santos, Tamiris Ribeiro, Luiza Mello, Vinicius Juvino, Camila Bassetti, Henrique Ferreira, Justine Oliveira, Gabriela Fazolin, Jorge Gabriel, pelo carinho, amizade e ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amigos Thiago Cruz, Charlene Araújo, Polianna Ramos, Michael Teixeira, Luara Fagundes, Martha Cerqueira, Túlio Raposo, Roberta Azoubel, Edmara Caires, Thainan Alves pelo ombro amigo, pelas palavras de incentivo quando mais precisei.

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade”.

(Walt Disney)

RESUMO

MAIA, Tiago C. S. **Liberação e permeação dérmica "in vitro" de hidrogel de cafeína em comparação ao uso de papaína como promotora de permeação.** 2018. 57 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP. São Paulo.

Muitas estratégias são indicadas a fim de suplantar a baixa permeabilidade de fármacos através da epiderme, umas delas, a de incluir promotores de penetração em formulações farmacêuticas e/ou cosméticas, formulados em sistemas terapêuticos transdérmicos (TTS). Estas substâncias são passíveis de modificar os domínios proteicos da epiderme e removerem provisoriamente a resistência da barreira do estrato córneo, permitindo o acesso dos fármacos aos tecidos viáveis através da circulação sistêmica. A natureza do veículo tópico é conhecida por desempenhar um papel importante na promoção da absorção dentro e através da pele. Os veículos tópicos convencionais, como pomadas, cremes ou géis, exercem predominantemente seus efeitos ao liberar o medicamento na superfície, e as moléculas dos fármacos, então, se difundem através de suas camadas. Os hidrogéis foram obtidos a partir de material polimérico reticulado por processo de radiação ionizante. A cafeína foi escolhida como substância modelo de permeação dérmica, por ser hidrofílica. Entretanto, para que a molécula penetre na barreira cutânea, deve ser associada a promotores de absorção cutânea. A papaína tem sido aplicada na pele íntegra como agente promotor de penetração e absorção cutânea. As enzimas interferem na absorção percutânea de fármacos por duas formas: como um potencializador de penetração e retardador de absorção. Neste trabalho, foram sintetizadas membranas de hidrogéis com poli (N-2- vinil - pirolidona) (PVP), poli (etilenoglicol) (PEG), poli (etilenoglicol diacrilato) (PEG-DA), cafeína e gel de papaína formado de polímero sintético pré-neutralizado para estudo da cinética de permeação cutânea, utilizando ecdise de cobra (*Boa Constrictor*) como membrana modelo de permeação. As membranas de hidrogel preparadas, foram caracterizadas por análise de termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), intumescimento, fração gel, microscopia eletrônica de varredura (MEV), e realizados ensaios de permeação dérmica em células de Franz e tomografia de coerência óptica (OCT). O teste de permeação "*in vitro*" desses hidrogéis na ecdise foram satisfatórios, comprovando a eficácia da papaína como promotora de permeação dérmica e contribuindo, assim, para futuros trabalhos que possam explorar ainda mais essa área de entrega de fármacos.

Palavras-Chave: hidrogel, cafeína, papaína, permeação.

ABSTRACT

MAIA, Tiago C. S. **In vitro dermal release and permeation of caffeine hydrogel in comparison to the use of papain as a permeation promoter**. 2018. 57 p. Dissertation (Masters in Nuclear Technology) - Institute of Energy and Nuclear Research - IPEN-CNEN / SP. São Paulo.

Many strategies are indicated for supplanting the low permeability of pharmaceuticals through the epidermis, one of them to include developers of access in cosmetics formulations, produced in Transdermal Drug Systems. Those substances are capable of modifying the protein dominates of the epidermis and temporarily remove the resistant barrier of the stratum cornea, allowing this way, the access to the pharmaceutical to the viable fabric through the systemic circulation. The nature of the topic vehicle is known for developing an important role of the absorption inside and through the skin. The conventional ways, as ointments, creams or gels, predominated theirs effects by liberating the medication in the superficies, so the pharmaceutical molecules defund beyond their layers. The hydrogels were got from the polymeric reticulate material for ionizing radiation process. The caffeine was chosen as a substance model of the dermis permeation, due to be hydrophilic. Moreover, for the molecule access, it is necessary to the developers of dermal absorption. The papain has been applied in the integra skin as agent promoter of access and dermal absorption. The enzymes interfere in the dermal absorption of the pharmaceutical in two forms: as optimizing, as well as, retarding absorption. This essay we could synthesized hydrogel membranes as Poly (N -2 - vinyl-pirolidon) (PVP), Poly(ethylene glycol) (PEG), Poly (ethylene glycol) diacrylate (PEG-DA), caffeine and papain gel formed by polymeric synthetic pre-neutralized for the studies of kinetic of dermal access for using ecdysis of a snake (*Boa constrictor*) as a membrane model of access. The membranes of hydrogel prepared for this essay were characterized by thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), swelling, gel fraction, scanning electron microscopy (SEM), and rehearsal of dermal access in Franz cells and optical coherence tomography (OCT). The test of permeation *"in vitro"* was satisfactory evidencing the efficacies of papain as a developer of dermal permeation, as well as, contributing for the future work that can explore even more this area of pharmaceutical delivery.

Key words: hydrogel, caffeine, papain, permeation.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO 14

1.1 OBJETIVO 16

2. REVISÃO BIBIOGRÁFICA 17

2.1 Estrutura da pele 17

2.2 Estrato córneo 18

2.3 Epiderme 19

2.4 Derme 20

2.5 Biomateriais 20

2.6 Hidrogéis 21

2.7 Radiação ionizante 21

2.8 Poli (etilenogicol diacrilato) (PEGDA) 23

2.9 Poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) 24

2.10 Cafeína 25

2.11 Papaína 27

2.12 Modelos de permeação 29

3 MATERIAIS E MÉTODOS 31

3.1 Materiais 31

3.2 Métodos 32

3.2.1 Obtenção das membranas de hidrogele gel de papaína. 32

3.3 Caracterização 33

3.3.1 Intumescimento 33

3.3.2 Fração Gel 33

3.3.3 Termogravimetria (TG) 34

3.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 34

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG) 34

3.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 35

3.3.7 Curva de calibração 35

3.3.8 Ensaios de permeação dérmica em célula de Franz 37

3.3.10 Tomografia de coerência óptica – OCT 37

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4.1 DSC 40
4.2 TGA 41
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 43
4.4 Intumescimento 44
4.5 Fração gel 45
4.7 Ensaio de permeação dérmica em célula de difusão do tipo Franz 47
4.9 Tomografia de coerência óptica – OCT 49
5. CONCLUSÃO 50
6 REFERÊNCIAS 52

LISTA DE ABREVIAÇÕES

^{137}CS	Césio-137
^{60}CO	Cobalto-60
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
CC	Camada Córnea
CCTM	Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EC	Estrato Córneo
FG	Fração gel
g/mol	Gramas por mol
IC50%	Índice de Citotoxicidade
kGy	Unidade de dose de radiação
m/v	Unidade de concentração
OCT	Tomografia de coerência óptica
PBS	Solução Tampão
PEG	Poli (Polietilenoglicol)
PVP	Poli (N-vinil-2-pirrolidona)
SCCE	Estratum Corneum Chymotryptic Enzyme
SCTE	Stratum Corneum Tryptic Enzyme
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
TGA	Termogravimetria
TTS	Sistemas Terapêuticos Transdérmicos
UV	Luz Ultravioleta
λ	Comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da pele. Fonte: http://3.bp.blogspot.com/-qL 17
Figura 2- Esquema do estrato córneo. Fonte: Adaptado (Van Smeden et al., 2014). 19
Figura 3- Monômero Poli (N-vinil-2-pirrolidona (PVP) 24
Figura 4- Cafeína. Fonte: Adaptado (De Maria e Moreira, 2007) 26
Figura 5- Ecdise de cobra da espécie Boa Constrictor. Fonte: Arquivo Pessoal..... 31
Figura 6- Curva de calibração da papaína. 36
Figura 7- Curva de calibração da cafeína. 36
Figura 8- Esquema da célula de difusão do tipo Franz. Fonte: Adaptado (Kelly De Oliveira Neves et al., 2018). 37
Figura 9- Hidrogel de cafeína com PEGDA (A), hidrogel sem cafeína com PEGDA (B) e hidrogel sem PEGDA (C) após irradiação a 25kGy. 39
Figura 10- DSC de hidrogel de cafeína, hidrogel com PEGDA sem cafeína, band gel irradiados à 25kGy. 40
Figura 11- DSC do pó de cafeína, não irradiado e irradiado à 25kGy. 41
Figura 12- Curvas de TGA de hidrogel de cafeína, hidrogel PEGDA sem cafeína e band gel liofilizados. 42
Figura 13- Curvas de TGA do pó de cafeína irradiado e não irradiados a 25 kGy. 42
Figura 14- Micrografias da superfície de fratura do hidrogel liofilizado. Sendo: A- hidrogel sem cafeína (100 µm); B- hidrogel sem cafeína (10 µm): C- hidrogel com cafeína (100 µm) e D- hidrogel com cafeína (10 µm). 43
Figura 15- Intumescimento das formulações estudadas: F1 (band gel); F2 (PEGDA sem cafeína) e F3 (hidrogel de cafeína), após 48 horas de intumescimento. 45
Figura 16- Cromatograma da amostra controle não irradiada (acima) e amostra irradiada a 32 kGy (abaixo). 46
Figura 17- Cinética de permeação em função do tempo. Concentração (µg/L) de cafeína liberada e concentração de papaína liberadas em células de Franz. 48
Figura 18- Imagens de OCT de cobra. Onde: A (pele pura, sem tratamento); B (pele tratada com cafeína); C (pele tratada com papaína) e D (pele tratada com cafeína e papaína). Fonte: Arquivo pessoal. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulação para preparação dos hidrogéis. 32
Tabela 2- Formulação para preparação de gel de papaína. 32
Tabela 3- Análise de variância dos resultados de intumescimento das formulações. 44
Tabela 4- Resultados do ensaio de fração gel das formulações estudadas. F1 (band gel); F2 (PEGDA sem cafeína) e F3 (hidrogel de cafeína). 45
Tabela 5- Análise de variância para ensaio de permeação em célula de difusão de Franz. 48

1- INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem sido mostrada como uma via de administração adequada de medicamentos e/ou cosméticos, visando promover alternativas à administração oral e parenteral. Ela age como uma barreira protetora com funções sensoriais e imunológicas e tem atraído grande interesse devido às vantagens de veiculação de fármacos, evitando o metabolismo gastrointestinal e hepático de fármacos, além de ser mais eficaz e resultar na entrega controlada por longos períodos sem dosagem frequente (Sim *et al.*, 2003).

Embora a pele seja um dos principais sítios de entrega não invasiva de agentes terapêuticos no corpo, esta tarefa pode ser relativamente desafiadora devido à impermeabilidade intrínseca da pele. A penetração de pequenos compostos dentro ou através da pele tem sido amplamente investigada e os fatores que desempenham um papel na absorção dessas moléculas através da pele são bem compreendidos (Foldvari, 2000).

Muitas estratégias foram indicadas a fim de suplantar a baixa permeabilidade de fármacos através da epiderme, umas delas, a de incluir promotores de penetração em formulações farmacêuticas e/ou cosméticas, formulados em sistemas terapêuticos transdérmicos (TTS). Estas substâncias são passíveis de modificar os domínios proteicos da epiderme e removerem provisoriamente a resistência da barreira do estrato córneo, permitindo o acesso dos fármacos aos tecidos viáveis através da circulação sistêmica (Barry, 2001).

A natureza do veículo tópico é conhecida por desempenhar um papel importante na promoção da absorção dentro e através da pele. Os veículos tópicos convencionais, como pomadas, cremes ou géis, exercem predominantemente seus efeitos ao liberar o medicamento na superfície, e as moléculas dos fármacos então se difundem através de suas camadas. A extensão e a duração da difusão dependem das propriedades físico-químicas do próprio fármaco que deseja permear. Em geral, a modificação da cinética de absorção de drogas por esses veículos é o resultado de sua capacidade de proporcionar hidratação aumentada por oclusão ou algum outro mecanismo. Se o tamanho e as propriedades de solubilidade do fármaco não forem acessíveis, apenas uma absorção limitada através da epiderme acontecerá (Foldvari, 2000).

As características de liberação de um fármaco, a partir de um veículo dermatológico, podem ser avaliadas, determinando o coeficiente de partição óleo/água. Entretanto, estudos de liberação "*in vitro"* e "*in vivo"* proporcionam dados mais significativos. Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos é adequado empregar procedimentos de liberação "*in vitro"* para lecionar excipientes para as formulações que possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que os estudos de liberação medicamentosa proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos (Sato *et al.*, 2007). Estes testes, devido às suas peculiaridades, permitem entender alguns fenômenos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito medido farmacologicamente, de maneira prática, rápida e sem a interferência de fatores biológicos.

1.1 OBJETIVO

Sintetizar, caracterizar e estudar a cinética de liberação e permeação de hidrogel de cafeína, comparativamente à presença de papaína como promotora de permeação dérmica.

2. REVISÃO BIBIOGRÁFICA

2.1 Estrutura da pele

A pele humana tem em média 0,5 mm de espessura (variando de 0,05 mm a 2 mm) e é composta por quatro camadas principais: o estrato córneo (EC), epiderme viável, derme e tela subcutânea. Representa cerca de 15% do peso corporal total de um adulto e tem um área superficial de aproximadamente $2m^2$ (Alexander *et al.*, 2012). Uma seção transversal apresentada na Fig. 1, apresenta as diferentes camadas identificadas com seu papel na influência da permeabilidade através de várias vias.

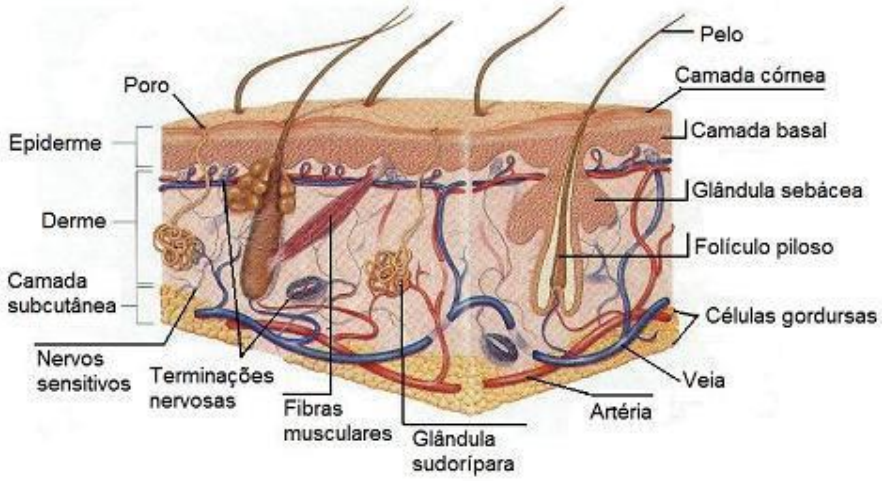

Figura 1- Estrutura da pele. Fonte: http://3.bp.blogspot.com/-qL

As células presentes na epiderme apresentam habilidade para absorver certas substâncias e recusar outras, determinadas por estados físico-químicos naturais como: viscosidade, ampla ligação do colágeno e seus apêndices, faixa etária ou comorbidades existentes. A ação efetiva ou não, dos fármacos liberados, dependem da anatomia, aspecto hídrico, presença de lipídios na sua estrutura, do aparecimento de patologias, do metabolismo e estado de saúde do paciente/cliente (Leonardi *et al.*, 2018).

2.2 Estrato córneo

Uma camada superficial grossa (10-20 µm), o EC, é altamente hidrofóbico e contém 10-15 camadas de corneócitos interdigitados, que são constantemente renovados. Sua organização pode ser descrita pelo modelo "tijolo e argamassa", no qual os lipídios extracelulares representam ~ 10% do peso seco desta camada e 90% são proteínas intracelulares (queratina). Estas membranas enriquecidas com lipídios possuem uma estrutura única e contêm aproximadamente 50% de ceramidas, 25% de colesterol e 15% de ácidos graxos livres com muito pouco fosfolipídios que estão dispostos em um formato de bicamada e formam os chamados "canais lipídicos" (Schürer *et al.*, 1991; Feingold e Elias, 2014).

A função de barreira da pele é criada por grânulos lamelares, que são sintetizados na camada granular e depois organizados no domínio da bicamada lipídica intercelular do EC. Os lipídios de barreira são bem controlados e a qualquer comprometimento da pele resultam em processos de síntese ativa para restaurá-los (Elias e Feingold, 1988).

O EC mantém a água no organismo mesmo em condições mutáveis, bem como limita a absorção de substâncias tóxicas do meio externo. Devido a essas características inerentes, o estrato córneo apresenta excelentes propriedades de barreira para a penetração de fármacos na epiderme, limitando a liberação de um vasto número de substâncias por esta via. A maioria dos fármacos liberados pelos sistemas transdérmicos convencionais são moléculas pequenas, potentes e relativamente lipofílicas. A administração percutânea de fármacos polares e que apresentam carga é particularmente difícil, devido à lipofilicidade própria do estrato córneo (Kanebako *et al.*, 2003).

Em virtude de sua estrutura ser altamente organizada, o EC é considerado o fator limitante de taxa na penetração de agentes terapêuticos. A capacidade de vários agentes para interagir com o lipídio intercelular, portanto, determina o grau em que a absorção é melhorada. Os medicamentos administrados via epiderme devem passar o estrato córneo, restrigindo eficientemente o transporte molecular entre o ambiente externo para o interior (Sim *et al.*, 2003).

O EC apresenta três etapas potenciais até o tecido viável, como esquematizado na Fig.2. Por meio do folículo piloso com as glândulas sebáceas

associadas, pelos ductos sudoríparos ou também pelo estrato córneo contínuo, sendo a última, a escolha da maioria dos compostos com a capacidade de permeação pelos corneócitos, pois contém queratina e são embebidos numa matriz intercelular enriquecidos de lipídios com características hidrofílicas (Lopes, P. *et al.*, 2008).

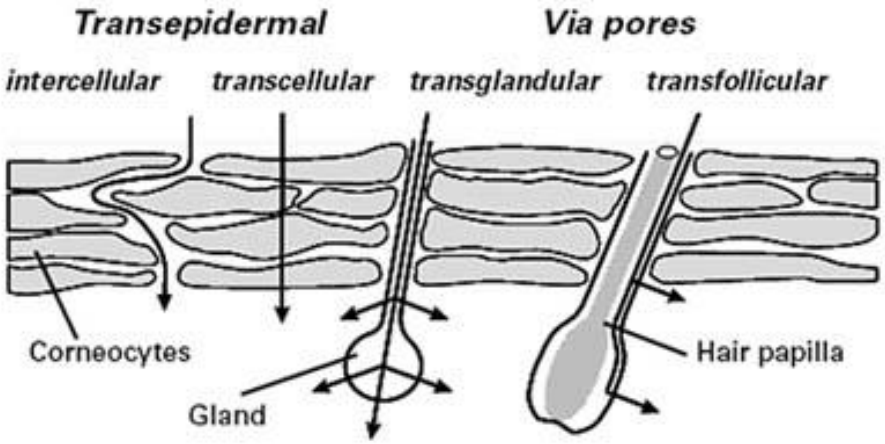

Figura 2- Esquema do estrato córneo. Fonte: Adaptado (Van Smeden et al., 2014).

2.3 Epiderme

A epiderme é constituída de várias camadas de queratinócitos, cerca de 95% das células, estes sofrem um processo de queratinização, em que há mitose, sucedendo em movimento na direção superficial a partir da camada basal, através da camada espinhosa e da camada granulosa, para a camada mais externa, a camada córnea (CC). Ao atingirem a camada córnea, as células transformam-se em anucleadas e achatadas, passando a chamar de corneócitos que serão, em seguida, extintas no processo de descamação da pele. A CC constitui, assim, a epiderme não viável. Intercaladas entre os queratinócitos na epiderme viável, encontram-se células com funções especializadas, tais como melanócitos, células de Merkel e funções imunológicas (Langerhans e outras células). Além disto, existem ainda anexos da pele, como folículos pilosos, glândulas sebáceas associadas e glândulas sudoríparas (Wickett e Visscher, 2006; Prow *et al.*, 2011).

2.4 Derme

A derme é a camada mais espessa (1 a 4 mm), e é constituída por uma ampla diversidade de células, ramos nervosos, vasos sanguíneos e linfáticos agregados numa vasta rede de tecido conjuntivo denso, sendo os seus principais componentes as fibras de colágeno, elastina e por uma matriz extracelular. As fibras de colágeno podem chegar a corresponder até 70% do peso seco da derme. Localizada abaixo da epiderme e acima da hipoderme. Assim, é a camada intermediária e mais consistente da pele. A sua principal função é garantir a elasticidade e resistência da pele. Por ser uma região ricamente vascularizada, é responsável ainda pela nutrição e oxigenação da epiderme (Alexander *et al.*, 2012).

2.5 Biomateriais

Diante do avanço tecnológico e do conjunto de ações no campo multidisciplinar, os biomateriais tornaram-se elementos indispensáveis na fabricação de dispositivos cardiovasculares, oftalmológicos, cardiorrespiratórios, odontológicos, assim como na área da estética (Bahamonde-Norambuena *et al.*, 2015).

São materiais ou combinação de substâncias naturais e/ou sintéticos, que não sejam drogas ou fármacos, usadas em aplicações biomédicas em contato com sistemas biológicos cuja finalidade é tratar, reparar ou substituir tecidos, órgãos ou funções do organismo, com o objetivo de manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente ou cliente (Rosiak e Yoshii, 1999).

A alternativa de um biomaterial passa pela apreciação de um conjunto de condições: o efeito do ambiente orgânico (corrosão, degradação) e o efeito do material no organismo. Tais fenômenos devem ser analisados, pois a eles está associada a biocompatibilidade. A interação do organismo vivo com o biomaterial resulta numa resposta e constitui o ponto crucial no desenvolvimento de biomateriais (Pereira *et al.*, 1999). Estes materiais devem ainda possuir uma função imediata após a implantação e ter a habilidade de remodelação e integração com os sistemas (Vunjak-Novakovic e Kaplan, 2006).

Entre os biomateriais, destacam-se os hidrogéis que podem apresentar várias formas: esponjas porosas, géis, películas entre outras. A adequação dos

hidrogéis e o seu desempenho para uma aplicação individual dependem da sua composição e esta pode ser alterada em sua formulação dependendo do tipo de aplicação em que será utilizado (Ratner, Hoffman, 1976).

2.6 Hidrogéis

Hidrogéis são redes de cadeias de polímeros naturais ou sintéticos que estruturalmente consistem de redes poliméricas tridimensionais, cuja estrutura hidrofílica surge de grupos funcionais ligados ao esqueleto polimérico o que os torna capazes de absorver e reter quantidades significativas de água que os intumescem sem a dissolução da rede polimérica devido as ligações cruzadas entre as cadeias, em consequências dessa propriedade, possuem um grau de flexibilidade o que torna muito semelhante ao tecido natural (Ahmed, 2015).

Diante do avanço tecnológico, os hidrogéis naturais estão sendo gradualmente substituídos por hidrogéis sintéticos por apresentarem maior vida útil, alta capacidade de absorção hídrica e alta resistência. De maneira positiva, os polímeros sintéticos geralmente possuem estruturas bem definidas que podem ser modificadas para produzir degradabilidade e funcionalidade adequadas à sua utilização. Os hidrogéis têm uma série de aplicações biomédicas, tais como no tratamento de feridas, materiais odontológicos, oftalmológicos , sistemas de administração de fármacos , implantes , engenharia de tecidos, agricultura entre outras (Benamer *et al.*, 2006).

2.7 Radiação ionizante

Consiste em ondas eletromagnéticas com energia suficiente para fazer com que os elétrons se desprendam de átomos e moléculas, alterando sua estrutura, num processo conhecido como ionização. Os raios gama são formados com a auto desintegração de Cobalto-60 (^{60}Co) ou Césio-137 (^{137}Cs). É uma esterilização de alta penetração e de método comum. Geralmente é usado para a esterilização de materiais gasosos, líquidos, sólidos, homogêneos e sistemas heterogêneos, medicamentos, materiaismédicos descartavéis, seringas, agulhas, cânulas como também cosméticos (Silindir Gunay e Ozer, 2009).

O uso de radiações de alta energia, como raios gama e feixes de elétrons, tem sido utilizada como iniciador para síntese de hidrogéis. A irradiação em solução de polímero aquoso resulta na formação de radicais nas cadeias de polímero. Além disso, a radiólise de moléculas de água resulta na formação de radicais hidroxílicos, que também atacam as cadeias de polímero, resultando na formação de macroradicais. A recombinação dos macroradicais em cadeias diferentes resulta na formação de ligações covalentes, de modo que, finalmente, é formada uma estrutura reticulada. A maior vantagem da iniciação da radiação ao longo da iniciação química é a produção de hidrogéis estéreis e relativamente isentos de iniciadores químicos (Ahmed, 2015).

O processo de polimerização via radical livre induzido por radiação ionizante envolve as etapas de iniciação, equações 2 a 4, propagação equações 5 a 7 e terminação equações 8 e 9, segundo o esquema apresentado (Chapiro,1990).

1) Iniciação

$M \rightarrow w \quad R^*$ (2)

$S(H20)\ w \rightarrow OH^*, {}^*H_2O_2, H^*, H_2O_2, H2O^+, e^-_{aq}$ (3)

$S^* + M \rightarrow R^*$ (4)

2) Propagação

$R^* + M \rightarrow RM^*$ (5)

$RM^* + m \rightarrow RM2^*$ (6)

$RMn\text{-}1^* + M \rightarrow RMn^*$ (7)

2) Terminação

RM*n + R* → RMnR (8)

RMnR* + T → RM n RM + T* (9)

Onde:

R• = radical livre de iniciação

M = Monômero

RM• = cadeia intermediária propagando-se

n = equivale a números de repetição dos monômeros

T = inibidor (ou terminador)

T• = radical não propagador

S = Solvente aquoso

2.8 Poli (etilenogicol diacrilato) (PEGDA)

É um reticulador de polímero > 95% acrilato à temperatura ambiente ou na presença de um fotoiniciador e luz UV. Eles são hidrofílicos, elásticos e podem ser personalizados para incluir uma variedade de moléculas biológicas. São ferramentas poderosas para descobrir a biologia celular básica porque são considerados biologicamente inertes e suas propriedades mecânicas podem variar em uma ampla gama de padrões. O PEGDA tem atraído grande interesse da engenharia de tecidos e medicina regenerativa, pois a polimerização pode ocorrer rapidamente e requer baixo consumo de energia (Cuchiara *et al.*, 2010; Efe *et al.*, 2013).

2.9 Poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP)

Poli (N-vinil-2-pirrolidona) popularmente conhecido por polivinilpirrolidona PVP, é um homopolímero sintético que foi obtido por Reppe e colaboradores. Após a metade do século XX, o poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) foi usado como plasma sanguíneo em vítimas da segunda guerra mundial. Devido à sua alta biocompatibilidade e não toxicidade, os hidrogéis de PVP possuem inúmeras aplicações na área médica sendo compatíveis ao sangue, lentes de contato, cosmética e outros (Oliveira, 2013).

O PVP é solúvel em água e outros solventes polares e é capaz de interações intermoleculares, mesmo em soluções aquosas diluídas a diferentes temperaturas. Também forma ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Quando seco é um pó levemente em forma de floco, o qual absorve até 18% de seu peso em umidade do ar. Em solução, ele apresenta excelentes propriedades de umidificação e facilmente forma filmes (películas) (Wanchoo e Sharma, 2003).

Estas características são indispensáveis em um hidrogel. A Fig.3 apresenta o monômero de PVP.

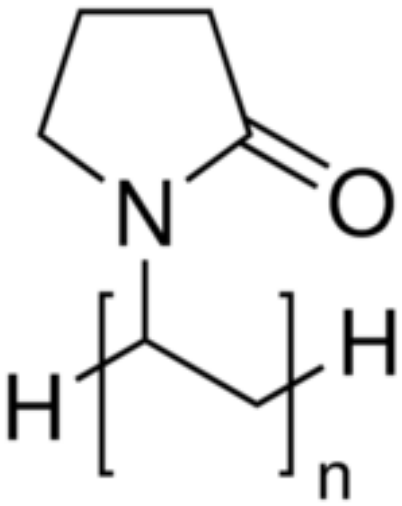

Figura 3- Monômero Poli (N-vinil-2-pirrolidona (PVP)

2.10 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona), Fig.4, é um alcaloide pertencente à família das metilxantina, é um composto relativamente polar com baixa solubilidade na água ou em óleo com massa molar de 194 g/mol. Este alcaloide é encontrado em grande quantidade em sementes de café, nas folhas de chá em geral. Embora grande parte da população ingira a cafeína de outras formas, como exemplo: bebidas energéticas, suplementos alimentares e remédios antigripais (De Maria e Moreira, 2007).

A cafeína proporciona ação farmacológica heterógena e sistêmica, como, alterações no sistema nervoso central, sistema cardiovascular (aumento da pressão arterial), e homeostase de cálcio, como também efeitos descritos no desempenho e comportamento humano, redução da fadiga, aumento da vigília, melhora na performance de atividade físicas, tendo essa última a necessidade de ser monitorada continuamente (Castellanos e Rapoport, 2002). Porém, a sua ingestão pode influenciar negativamente o controle motor e o sono, bem como causar desconforto em indivíduos com quadro de ansiedade (Smith, 2002).

Ainda, é empregada como uma substância modelo para teste toxicológico da epiderme, por ser hidrofílica. A absorção dérmica da cafeína é utilizada para avaliar o risco a exposição de substância nocivas no ser humano. A principal via para que os ativos penetrem através da pele é através do conteúdo lipídico da camada mais externa, o EC. Porém, a cafeína não possui os atributos de um penetrante de epiderme ideal, pois é um material hidrofílico com um Log P de -0,07 (Luo e Lane, 2015).

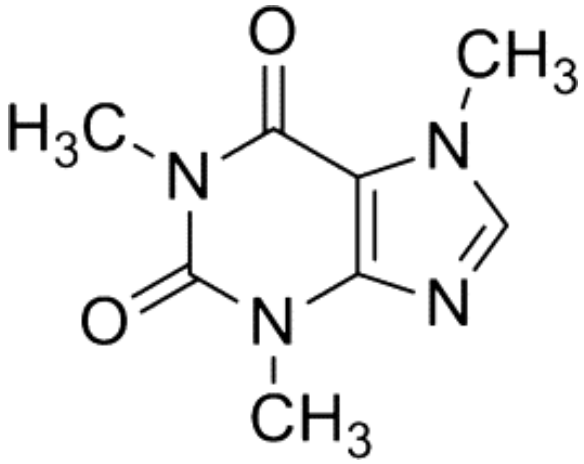

Figura 4- Cafeína. Fonte: Adaptado (De Maria e Moreira, 2007)

Como princípio ativo dermatológico exerce ação no tecido adiposo subcutâneo, através da inibição da fosfodiesterase, ocasionando lipólise do adipócito. Entretanto, para que a molécula penetre na barreira cutânea esta, deve ser associada a promotores de absorção cutânea. A capacidade dos compostos ativos de cosméticos ou produtos farmacêuticos, que influenciam o metabolismo celular e outros processos que ocorrem na pele, é imensamente dependente da capacidade de penetração através da barreira da epiderme. A cafeína é frequentemente utilizada como substância modelo em experimentos de penetração na pele (Herman e Herman, 2013), em estudos anteriores descobriu-se que a penetração da cafeína na barreira cutânea não foi alterada pela oclusão e pela espessura da pele (Treffel *et al.*, 1992; Van De Sandt *et al.*, 2004; Wilkinson *et al.*, 2006).

Por tratar-se de um alcaloide que penetra na epiderme humana, apresenta uma boa tolerância geral e localizada, pois difunde muito pouco com o sangue. Além disso, inibe a fosfodiesterase, que degrada a adenosina monofosfatocíclico (AMPc), como também o receptor de adenosina, bloqueando seu efeito antilipolítico (Wisher, 2012).

Bronaugh Rl Fau - Franz e Franz (1986), avaliaram a permeação da cafeína em derivados do petróleo, géis contendo etilenoglicol e géis aquosos simples na epiderme, em testes "*in vitro" e "in vivo"*. A permeação máxima foi observada para os veículos derivados do petróleo, seguidos pelos géis de etilenoglicol e com menor permeação do gel aquoso. Essa tendência foi consistente com o grau de saturação

da cafeína nos respectivos veículos. Os resultados para a absorção "*in vivo"* foram, em geral, de acordo com os estudos "*in vitro"*.

Apesar da cafeína ser hidrofílica, sua solubilidade em água é muito limitada. Portanto, as fórmulas que possuem concentração elevadas necessitam de maior parcela de surfactante ou álcool, podendo causar irritabilidade na epiderme (Byun *et al.*, 2015).

As formulações tópicas comercialmente disponíveis de cafeína normalmente contêm de 1 a 3% (Byun*;* Hamishehkar *et al.*, 2015).

2.11 Papaína

A papaína é uma poderosa enzima proteolítica, pertencente à família da cisteína protease e provem do látex das folhas do mamão verde adulto, *Carica Papaya* é uma das enzimas mais utilizadas em escala industrial e farmacêutica. Sua ação catalítica está fortemente ligada ao seu esqueleto tridimensional, que é composta por dois diferentes domínios estruturais com uma fenda entre eles. Ela contém o sítio catalítico, denominado "tríade catalítica", que é composto dos aminoácidos cisteína-25, histidina-159 e aspartato-158 (Borella *et al.*, 2016).

A grande limitação ao uso de enzimas é a sua instabilidade química em circunstâncias operacionais, que envolvem a exposição a temperaturas extremas, pressão, pH, desnaturantes e solventes orgânicos. O arcabouço nativo de qualquer proteína é estável apenas na periferia e sempre flutuará em estados não-nativos, cuja taxa aumenta em condições ambientais extremas. Um dos principais meios de inativação enzimática é a desnaturação térmica (Sathish *et al.*, 2007). A papaína é menos dispendiosa do que outras enzimas e tem uma vasta gama de particularidades e boa estabilidade térmica entre outras proteases (Sangeetha e Abraham, 2006).

Seu uso em formulações terapêuticas é muito difundido como agente debridante e comumente usada no tratamento de lesões cutâneas (G Payne *et al.*, 2008). Porém, essa recomendação é condicionada às características em que se encontram a ferida e em qual fase da cicatrização. Feridas secas ou com tecido de

granulação, a indicação é o uso de soluções na concentração de 2 % m/v. Em presença de exsudato infeccioso, a concentração proposta é de 6% m/v. Em presença de tecido necrótico excessivo, recomenda-se o uso de papaína na concentração de 10 % m/v (Brito Junior e Ferreira, 2015).

Na cosmetologia, o uso de enzimas foi amplamente divulgado nos últimos anos, sobretudo, a papaína e a bromelaínae estas têm sido aplicadas na pele íntegra como agente promotor da penetração e absorção cutânea, formulações depilatórias, *peeling* químico e como agente depilatório (Pinto *et al.*, 2011). As enzimas interferem na absorção percutânea de fármacos por duas formas: como um potencializador de penetração e retardador de absorção. O estrato córneo contém várias proteases que podem desempenhar um papel central no processo de descamação (Traversa *et al.*, 2007; Lopes, P. S.; Ruas, G. W.*, et al.*, 2008). A papaína é uma enzima proteolítica tiol, recentemente, e foi usada como potenciador de absorção, modificando o material peptídeo/proteína no domínio da bicamada (Fein *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2007).

O EC possui diversas proteases que exercem ação central no processo de descamação. A primeira enzima descoberta foi a *Estratum Corneum Chymotryptic Enzyme* (SCCE), seguida da *Stratum Corneum Tryptic Enzyme* (SCTE) (Caubet *et al.*, 2004; Brattsand *et al.*, 2005).

Watkinson (1999) descreveu a presença de uma protease tiol, possivelmente identificada como uma pró-enzima, nas camadas inferiores da pele, sendo ativada por um mecanismo ainda desconhecido nas camadas superiores ao longo da diferenciação dos queratinócitos. Portanto, a papaína considerada uma protease tiol, é seguramente uma agente intensificadora de penetração. Nesse sentido, as enzimas proteolíticas são menos irritantes em comparação com outros potenciadores de permeação de baixo peso molecular (Sim *et al.*, 2003).

Bernard e colaboradores (2003) identificaram no EC humano uma protease pertencente à família da papaína, nomeada SCCL (Stratum Corneum Cathepsin-L-like Protease). Os pesquisadores averiguaram que a protease degrada as corneodesmosinas, um componente presente no corneodesmossomos, auxiliando no processo de descamação epidérmica.

2.12 Modelos de permeação

Para utilização ampla e potente da via tópica, é importante otimizar a entrega da substância ativa através da pele. O tipo de veículo pode melhorar o resultado desejado da terapia, logo, a otimização das formulações da pele é frequentemente incluída nos estágios iniciais do desenvolvimento do produto (Lam e Gambari, 2014). A membrana é outro fator decisivo no direcionamento dos ensaios de permeação "*in vitro*". As membranas sintéticas não possuem as características anatômicas e fisiológicas da epiderme, assim, o ideal é realizar estes estudos com membranas naturais, humana ou animal (Sato *et al.*, 2007).

A epiderme humana ainda é considerada como melhor veículo como modelo de estudo, no entanto, existem algumas limitações quanto à sua utilização, referindo-se à disponibilidade, diferentes perfis de permeação e principalmente aos aspectos éticos. A escolha da membrana deve propiciar uma superfície de base inerte para a formulação em teste, e não um obstáculo. Deve permitir que a substância ativa se difunda prontamente no meio receptor à medida em que seja distribuída na forma de dosagem.

A maior parte da otimização atual depende da utilização adequada de modelos animais e/ou artificiais. No entanto, as restrições crescentes em uso e manipulação de animais e pele humana estimularam a busca de modelos artificiais adequados. A escolha do modelo mais aplicável para o propósito específico deve basear-se na interação entre a disponibilidade, facilidade de uso, custo e as respectivas limitações (Semlin *et al.*, 2011).

A entrega de fármacos direcionada à epiderme humana como via alternativa de tratamento é um evento desafiador, mesmo possuindo uma área superficial prontamente acessível para potencial absorção de drogas. Uma abordagem racional para arquitetar e potencializar a formulação destinada a ação de fármacos tópicos ou sistêmicos requer modelos bem definidos e eficientes na identificação e avaliação das propriedades inerentes da formulação (Flaten *et al.*, 2015).

Existe, atualmente, interesse no uso da ecdise de cobra como modelo substituto da pele humana e pesquisadores têm avaliado sua aplicabilidade em estudos de penetração/permeação com resposta favorável. Esta é composta de estrato córneo puro desprovido da epiderme viável e de folículos pilosos (Rigg e Barry, 1990).

A muda de pele de cobra possuem similaridades com o EC humano, como: espessura do tecido (EC humano – 13 a 15 µm; muda de pele de cobra – 10 a 20 µm); estrutura proteica (queratina do tipo α e β); composição lipídica (EC humano – 2,0 a 6,5%; muda de pele de cobra – aproximadamente 6,0%, envolvendo a presença de colesterol, ácidos graxos livres, glicoceramidas e fosfolipídios, entre outros) (Widler *et al.*, 2002).

Ainda, em sua composição, a pele de cobra apresenta uma camada de beta-queratina externamente, uma camada de alfa-queratina intracelular e uma camada lipídica intercelular, formando uma camada intermediária. Existe, também, uma terceira e última camada de alfa-queratina mais interna. A camada intermediária é subdividida em três subcamadas de estrutura multilamelar com células cornificadas (alfa-queratina), ao redor dos lipídeos intercelulares, representando, assim, o principal depósito de lipídeos, sendo considerada a maior barreira para a penetração da água (Pongjanyakul *et al.*, 2000).

Outro fator decisivo na escolha da utilização deste modelo se dá pelo fato da facilidade na aquisição do material e as menores mudanças interindividuais, com probabilidade de avaliação de aspectos como a idade, tamanho, gênero dos animais que são fatores consideráveis na reprodutibilidade das avaliações realizadas, assim como a preservação do animal vivo (Nunes *et al.*, 2011).

As partes dorsal e ventral têm mostrado diferenças nas características de difusão através da avaliação de cada uma em específico, o que justifica a escolha pela parte dorsal da pele de cobra (Haigh *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2001).

Neste estudo, a espécie *Boa Constrictor* Fig.5, foi investigada devido à sua disponibilidade, sendo analisadas as características de permeabilidade da cafeína e papaína.

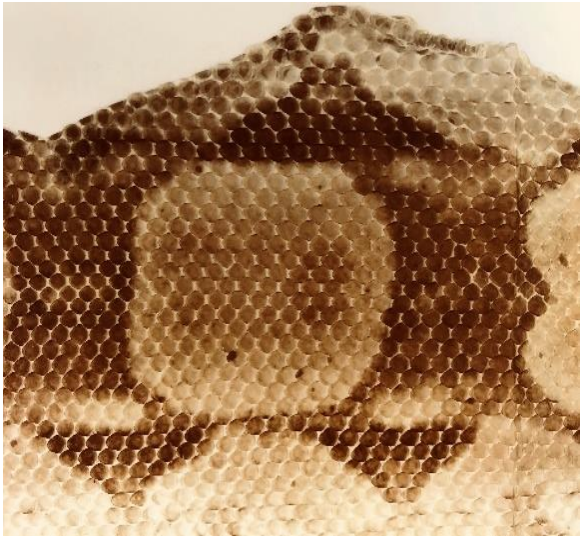

Figura 5- Ecdise de cobra da espécie *Boa Constrictor*. Fonte: Arquivo Pessoal

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as seguintes matérias primas e equipamentos:

- Poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) *Kollidon* 90 fornecido pela Êxodo;
- Poli (etilenoglicol) (PEG 400) fornecido pela Synth;
- Poli (etilenoglicol diacrilato) (PEGDA) fornecido pela *Sigma-Aldrich;*
- Ágar fornecido da Synth;
- Cafeína 1,3,7 trimethylxanthine fornecida pela *Sigma-Aldrich;*
- Papaína (30000 USP-U/mg) para fins bioquímicos - Merck®;
- Água miliq;
- Solução tampão-fosfato (pH= 7,4);
- Aristoflex® AVC (Copolímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona Neutralizado);
- Ecdise de cobra *Boa Constrictor* fornecidas pelo Zoológico Municipal de São Bernardo do Campo- SP;
- Célula de difusão do tipo Franz.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das membranas de hidrogele gel de papaína.

Para obtenção das membranas dos hidrogéis e do gel de papaína foram usadas as seguintes concentrações, conforme tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Formulação para preparação dos hidrogéis.

Material	**%**
PVP	8
AGAR	1
PEG	1,5
PEGDA	1,5
Cafeína	1
Água miliq	87

Para síntese do hidrogéis os materiais foram solubilizados em água miliq, utilizando autoclave durante 40 min. Posteriormente,foram dispostos em placas de 13 cm x 8 cm x 2 cm, selada a vacuo e enviada para o processo de reticulação e esterilização por radiação ionizante da fonte cobalto-60, em dose de 25 kGy. Foram sintetizados hidrogéis sem cafeína e sem PEGDA para controle dos dados.

Tabela 2- Formulação para preparação de gel de papaína.

Material	**%**
Papaía	2
Aristoflex® AVC	5
Água miliq	Qsp

Para síntese e formação do gel de papaína, solubilizou-se em água miliq, em seguida, foi acrescido o co-polímero do ácido sulfônico acriloildimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado, popularmente conhecido como Aristoflex® AVC para formação instantânea do gel.

3.3 Caracterização

3.3.1 Intumescimento

O grau de intumescimento pode ser descrito como a quantidade de água absorvida pelo hidrogel e esta propriedade está relacionada à rede formada, ou seja, à densidade de reticulação do polímero, que por sua vez influência a cinética, duração e taxa de liberação de drogas em sistemas de liberação controlada de drogas. As amostras foram imersas em água e retiradas posteriormente, em intervalos regulares, até atingir massa constante. O grau de intumescimento foi calculado conforme equação 1 de acordo com a norma (ASTM D 570).

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{(W2 - W1)}{W1} \times 100 \qquad \text{Equação 1}$$

Onde, W_1= massa inicial da amostra

W_2= massa da amostra intumescida

3.3.2 Fração Gel

A fração gel (FG) consiste no ensaio utilizado para determinar o grau de reticulação de polímeros. O método foi adaptado e realizado conforme Miranda (1999). Tal fração é determinada após remoção da fração solúvel e água fervente como solvente. Amostras com cerca de 1g foram secas em estufa à 60°C até peso constante, foram colocadas em redes (gaiolas) no erlenmeyer com o solvente e levado à autoclave a 100 ºC a 1 atm por duas horas. Após extração, as membranas foram secas novamente até peso constante e os resultados de fração gel foram quantificados utilizando a equação 2. A FG determina a parte insolúvel, atribuída a parte reticulada.

$$F_S\,(\%) = \frac{Wf}{W0} \qquad \text{Equação 2}$$

Onde: F_s = fração solúvel

W_0= massa inicial da amostra seca

W_f = massa final da amostra seca após extração

3.3.3 Termogravimetria (TG)

Os hidrogéis liofilizados foram submetidos a testes de caracterização térmica de análise termogravimétrica TGA / DTGA no aparelho Mettler-Toledo SDTA / 851 (taxa de aquecimento: 10 ºC min^{-1} de 25 a 600 ºC, sob fluxo de N_2 (10 $mL.min^{-1}$). Registros das variações de temperatura do início ao final da decomposição.

3.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização foi feita no aparelho modelo Mettler-Toledo DSC822^e foram alocadas nas panelas de alumínio padrão seladas. As amostras foram aquecidas de 25 °C a 265 °C com uma taxa de aquecimento de 20 °C / min. O aparelho foi aferido com índio de ponto de fusão 156 ºC 24,75 J g^{-1}, e os eventos entálpicos e as mudanças dos processos de reticulação foram verificados.

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG)

Para investigação morfológica das fraturas dos hidrogéis, foi utilizado apararelho modelo JSM-6701 marca Joel alocados no Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM) do IPEN-CNEN / SP. Para essa técnica os hidrogéis foram liofilizados por 24h e analisados a superfície de fratura.

3.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

É uma técnica utilizada na separação dos vários componentes de uma mistura de substâncias com o objetivo de identificação, quantificação ou purificação (Siqueira, 2003). Preparou-se uma solução aquosa de cafeína numa concentração de 0,45 mg L^{-1}, a solução foi agitada por 1 hora para total solubilização em aparelho de ultrassom. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 5 mL para tubos de vidro e depois de fechados foram irradiados a diferentes doses, 2, 4, 8, 16 e 32 kGy em fonte Cobalto-60. Para realização da análise foi utilizado o aparelho modelo Agilent 1100 + API 2000, acoplado a detector espectrometria de massas do tipo triploquadrupolo (MS/MS). Coluna: Restek Ultra Aqueos C18 (150 x 2.1 mm. 3 um). Fase Móvel: 65% H2O/35%ACN + 0.1% Ac. Fórmico. Transição MRM (Quantificação): 195>138. Transição MRM (Confirmação): 195>110. Faixa de Linearidade da Curva Analítica: 100 a 800 µg L-1, alocado no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada- CEMSA.

3.3.7 Curva de calibração

É um método utilizado na química analítica para determinar a concentração de uma solução de amostra desconhecida.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução concentrada de cafeína, a qual foi preparada, pesando-se 10 mg do padrão e solubilizada em balão volumétrico de 50mL, foram realizadas sucessivas diluições em água miliq com as seguintes concentrações: 0,8 µg; 1,0 µg; 1,2 µg; 1,4 µg; 1,6 µg; 1,8 µg; 2,0 µg. Calibrou-se o espectrofotômetro com um branco de água miliq e construiu-se a curva de calibração à 272 nm (λ max.cafeína), da absorbância em função da concentração dos padrões. Já a curva da papaína foi obtida a partir de uma solução concentrada do padrão contendo 10 mg, as concentrações foram semelhantes às realizadas com a cafeína. Calibrou-se o espectrofotômetro com um branco de água miliq e construiu-se a curva de calibração à 280 nm (λmax papaína). Foi calculada a concentração de cafeína e da papaína através da equação da reta. Na Fig.6 e Fig.7, apresentam a absorbância em função da concentração de cafeína e papaína.

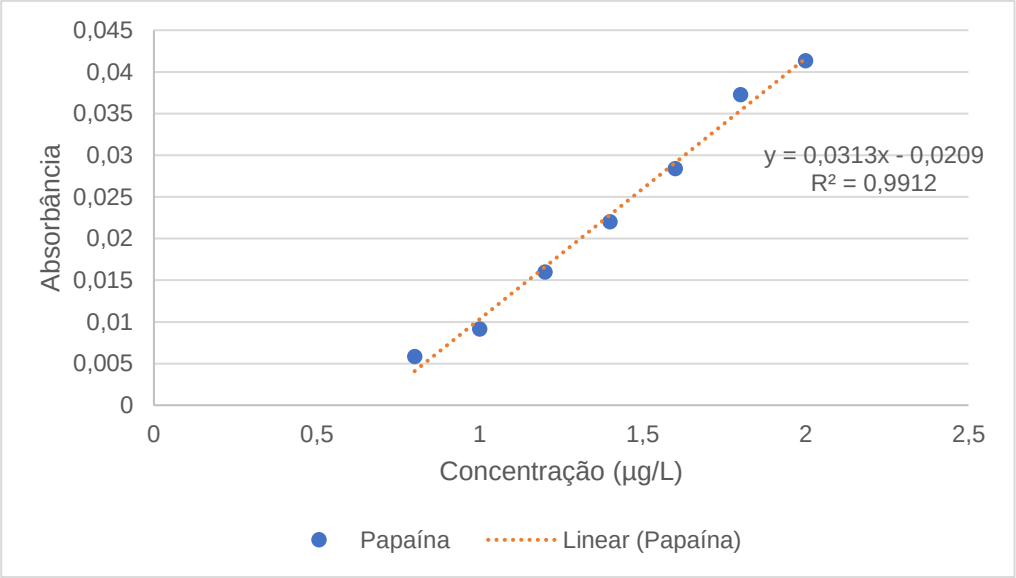

Figura 6- Curva de calibração da papaína.

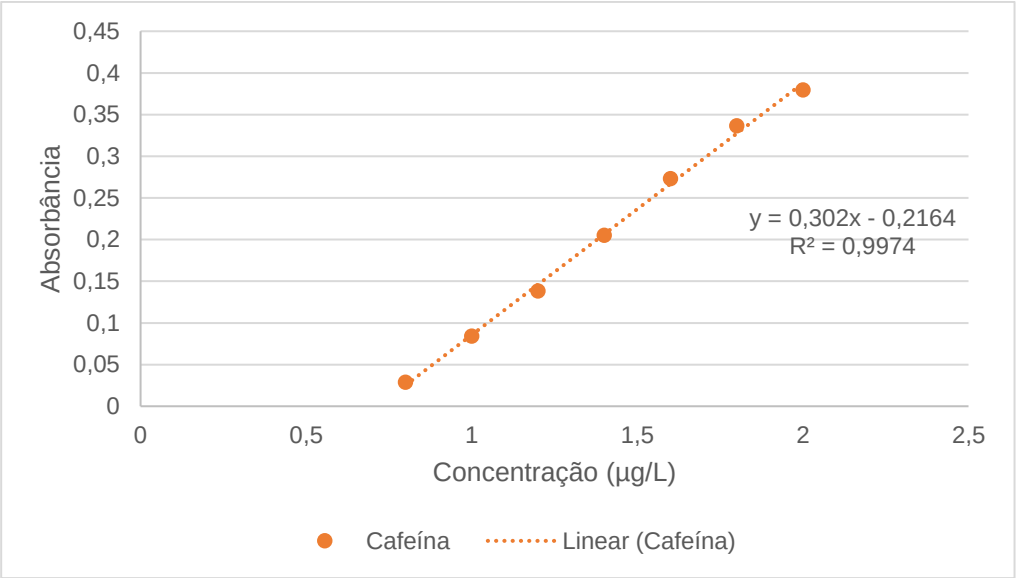

Figura 7- Curva de calibração da cafeína.

3.3.8 Ensaios de permeação dérmica em célula de Franz

O modelo de estudo de liberação "*in vitro"*, mais sugerido é o sistema de difusão proposto por Franz em 1975. Nesse sistema bicompartimentado, Fig.8, utiliza-se tanto membrana sintética como também tecido cutâneo (humano ou animal), separando o compartimento receptor do doador, para assim conhecer a cinética no que diz respeito à liberação e/ou permeação de determinado fármaco (Franz, 1975).

Figura 8- Esquema da célula de difusão do tipo Franz. Fonte: Adaptado (Kelly De Oliveira Neves et al., 2018).

3.3.10 Tomografia de coerência óptica – OCT

A tomografia de coerência óptica (OCT - O*ptical Coherence Tomography*) é método diagnóstico, que fornece imagens da morfologia dos tecidos biológicos "*in vivo"* em tempo real com baixa resolução. Essa tecnologia é fundamentada no princípio físico da interferometria que consiste em fenômenos ópticos de interferência e tem funcionamento comparável ao do ultrassom, porém, os pulsos de ultrassom são substituídos por fonte de luz de baixa coerência com comprimento de onda de 1300nm. Um sistema óptico aceita a obtenção de imagens, em preto e branco, em duas ou três dimensões, perpendiculares em relação à face cutânea, análogos à histologia (Welzel *et al.*, 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas de hidrogel com cafeína apresentaram-se frágeis sem consistência, com extravasamento hídrico na superfície e forte aderência para retirada da forma Fig.9 (A), enquanto os hidrogéis com PEGDA sem cafeína apresentaram-se consistentes, íntegras, transparentes, porém com pequena resistência na retirada da formaFig.9 (B). Entretanto, a membrana de hidrogel sem cafeína e sem PEGDA Fig.9 (C), mostrou-se satisfatória e íntegra, como visto em estudos que utilizaram o PVP e a irradiação gama no processo de reticulação para formações de hidrogéis, utilizados na engenharia de tecidos e em curativos (González-Torres *et al.*, 2018).

Estudos com efeitos biológicos mostraram a influência da cafeína no processo de irradiação, onde, foi observado um retardo na fase G2 do ciclo celular, que corresponde ao intervalo entre o fim da replicação do DNA e o começo da mitose de glioblastomas (tumores cerebrais), após, sofrerem incidência de radiação gama, uma vez que a cafeína age como inibidora de duas proteínas quinases, a ATM e ATR que estão diretamente ligadas no processo de replicação acelerada e descontrolada de células tumorais malignas (Godoy *et al.*, 2013).

Repolês (2005) investigou possíveis diferenças nas respostas à quebra de fitas duplas de DNA, causadas pela exposição à radiação ionizante de diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi*, tornando o tratamento prévio com cafeína capaz de atrasar em 25 horas a resposta ao dano do DNA mediada pelas proteínas ATR e ATM. Diante desses resultados e da literatura, demonstra-se que a cafeína interferiu reduzindo o processo de reticulação da membrana de hidrogel, as quais foram submetidas as doses de 15kGy, 20kGy e 25kGy.

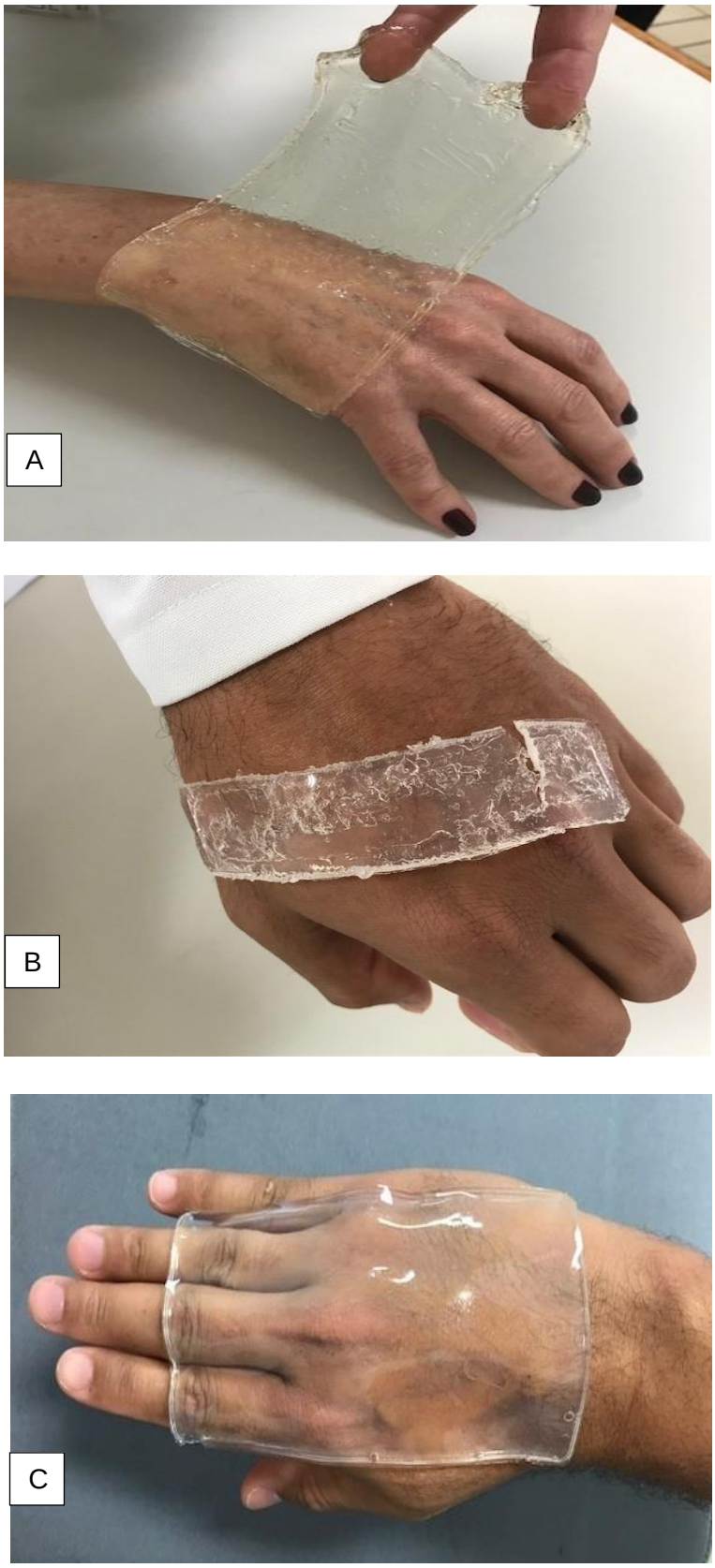

Figura 9- Hidrogel de cafeína com PEGDA (A), hidrogel sem cafeína com PEGDA (B) e hidrogel sem PEGDA (C) após irradiação a 25kGy.

4.1 DSC

Observa-se na Fig.10, um deslocamento do ponto de fusão da cafeína nas três amostras realizadas o que pode confirmar uma interação entre os outros componentes presentes na amostra, como o PVP,PEG e/ou PEGDA, uma vez que na literatura o pico de fusão da cafeína é descrito na faixa de 236 ºC (Bothe e Cammenga, 1979).

Na Fig.11 apresenta o DSC do pó da cafeína irradiado e não irradiado, não sendo observadas alterações no caráter das curvas após a irradiação que poderia testemunhar a presença de produtos de radiólise ou alterações nas propriedades físico-químicas do composto estudado, uma vez que o DSC para os fármacos de baixa estabilidade radioquímica demonstram picos de radiodegradação ou impurezas (Oliveira *et al.*, 2011).

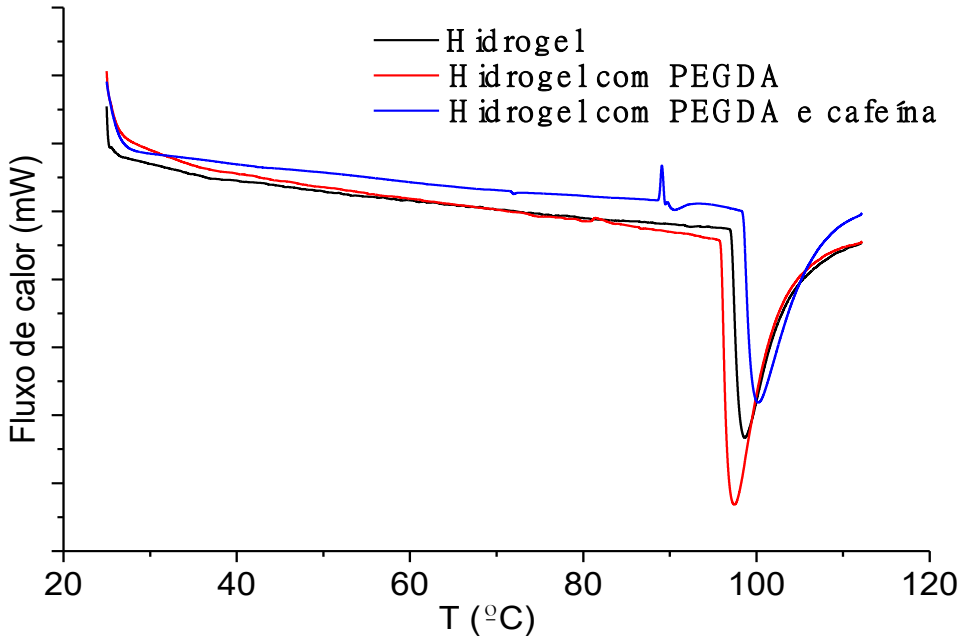

Figura 10- DSC de hidrogel de cafeína, hidrogel com PEGDA sem cafeína, band gel irradiados à 25kGy.

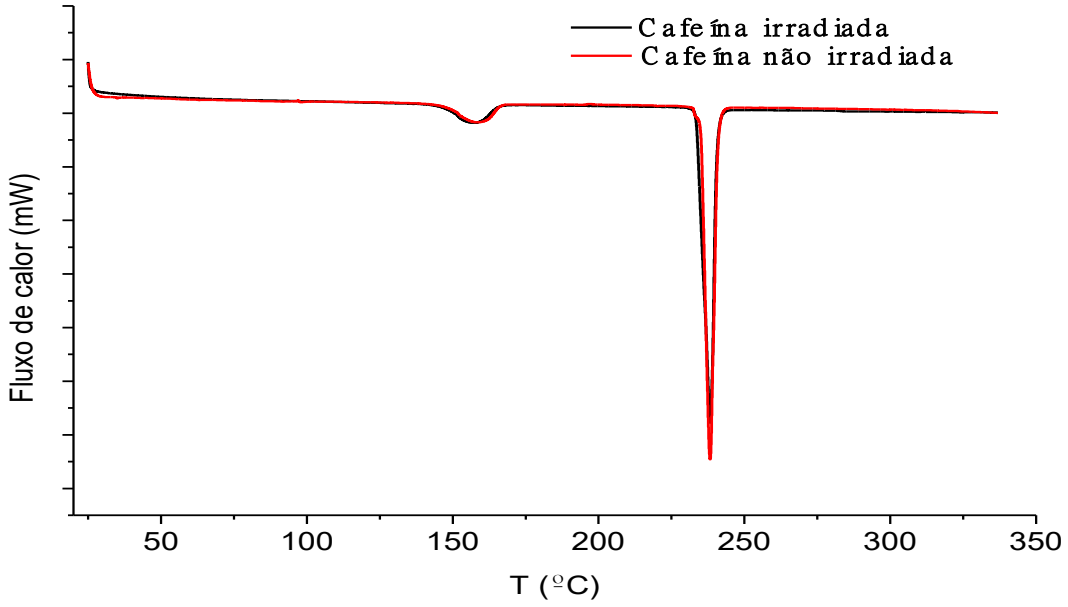

Figura 11- DSC do pó de cafeína, não irradiado e irradiado à 25kGy.

4.2 TGA

A TG é uma ferramenta usada para mensurar a perda de massa em função da temperatura em uma atmosfera. Para fins farmacêuticos, seu uso é proposto para determinação de pureza e de umidade, identificação de falsos polimorfismos, na avaliação da estabilidade de substâncias e da cinética de degradação(Oliveira *et al.*, 2011) .A curva relacionada aos hidrogéis band gel e PEGDA sem cafeína apresentam três eventos, o primeiro evento foi relacionado à perda de água por volta de 100ºC, o segundo evento 262 ºC foi relacionado à perda de massa dos polímeros PEGDA, PEG e AGAR e o terceiro evento 370ºC relacionado à decomposição do PVP. O hidrogel com cafeína apresentou três eventos: o primeiro associado à perda de água por volta de 100 ºC e o segundo por volta de 206 ºC associado à perda de massa da cafeína, junto ao PEGDA, PEG e Agar e o terceiro 370 ºC. Nota-se que o hidrogel com cafeína apresenta menor estabilidade térmica como mostra a Fig.12. Na Fig. 13. é evidenciada a perda de massa pertencente a cafeína por volta dos 207 ºC independente da ação da radiação ionizante.

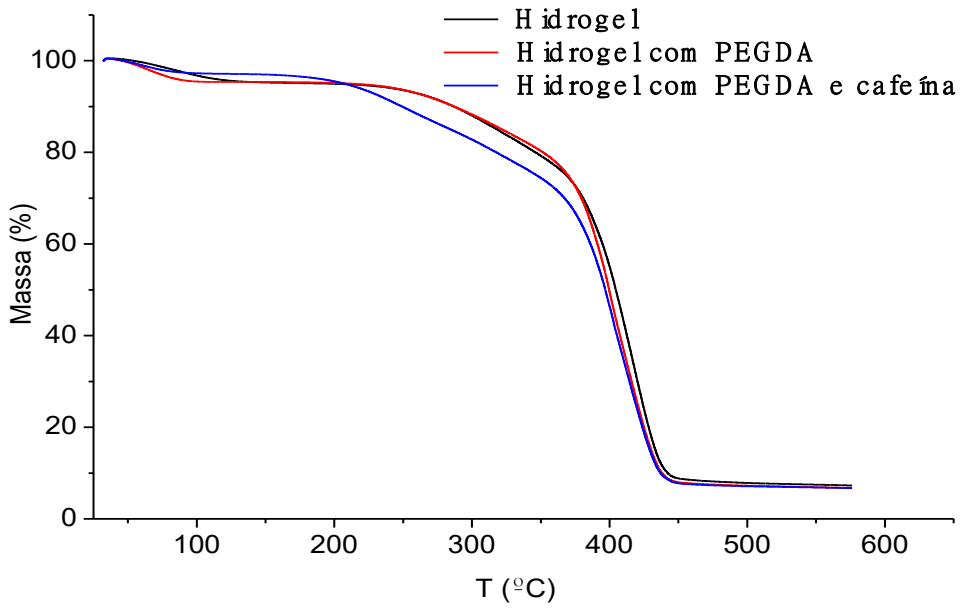

Figura 12- Curvas de TGA de hidrogel de cafeína, hidrogel PEGDA sem cafeína e band gel liofilizados.

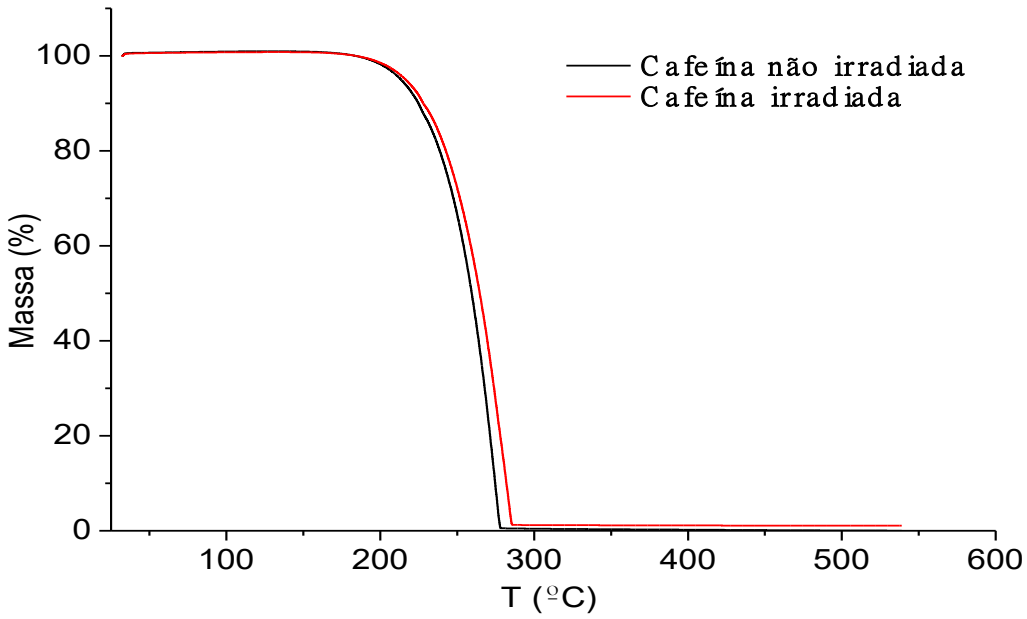

Figura 13- Curvas de TGA do pó de cafeína irradiado e não irradiados a 25 kGy.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias da superficies de fraturas do hidrogel sem cafeína liofilizados apresentam macroporos bem definidos e poros organizados,conforme Fig.14(a) e, ainda,exibem um aspecto mais sólido com presença de camadas como mostra a Fig.14 (b). Por outro lado, o hidrogel com cafeína exibe uma morfologia irregular com poros bem menores e presença de microporos organizados e regiões homogênas de cafeína Fig.14 (c), enquanto na Fig.14 (d) expõe cristais da cafeína, já que o polímero PVP é amorfo. Existe uma grande importância do controle do polimorfismo no desenvolvimento de compostos bioativos de utilidade terapêutica, pois está principalmente relacionada às suas propriedades físico-químicas, às quais afetam diretamente a velocidade de dissolução (que pode acarretar em desvios na biodisponibilidade) e, portanto, sua eficácia (Haleblian e Mccrone, 1969).

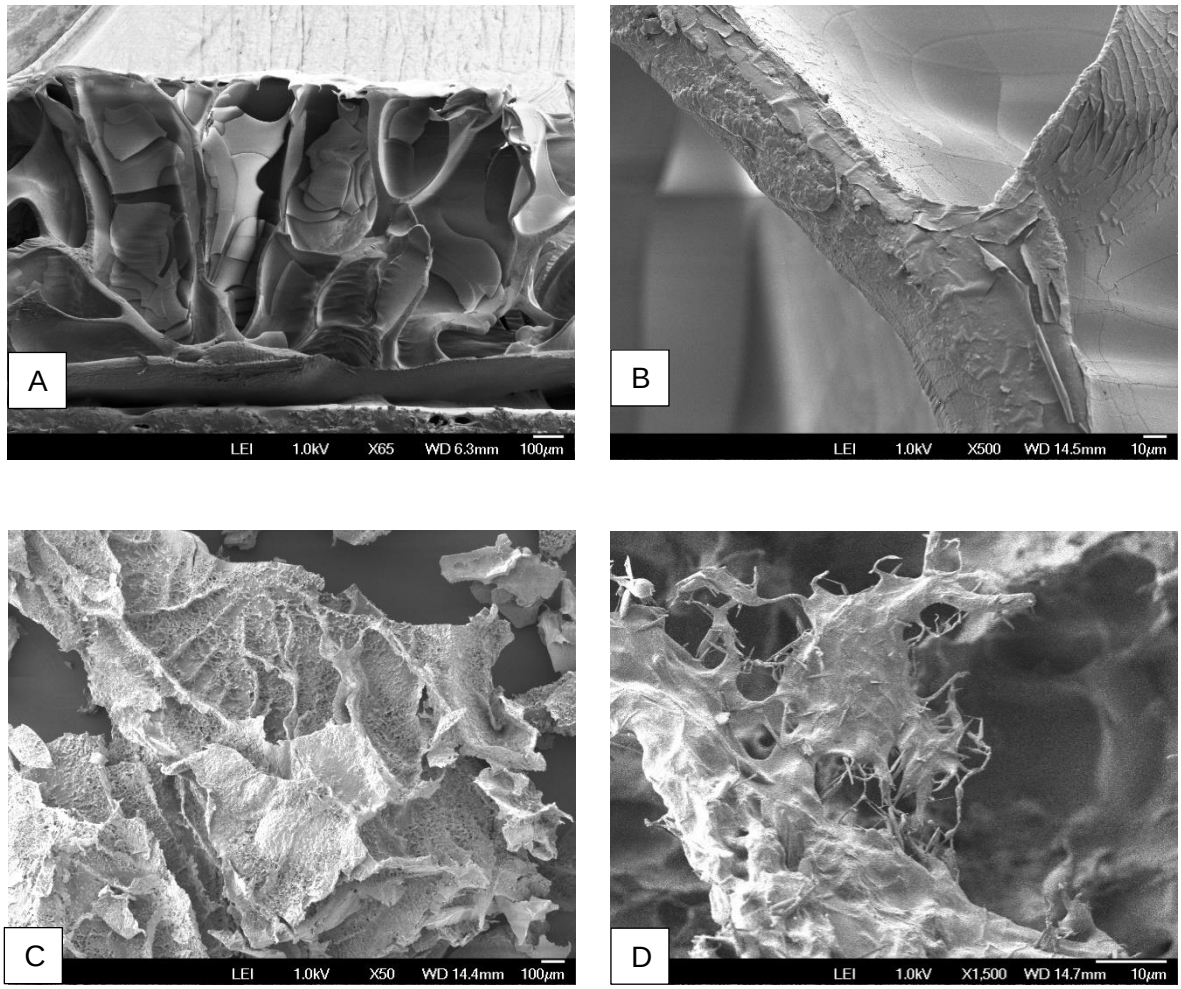

Figura 14- Micrografias da superfície de fratura do hidrogel liofilizado. Sendo: A- hidrogel sem cafeína (100 µm); B- hidrogel sem cafeína (10 µm): C- hidrogel com cafeína (100 µm) e D- hidrogel com cafeína (10 µm).

4.4 Intumescimento

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de intumescimento. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, tendo sido obtido uma diferença significativa (Δ) de 12,0596 com p>0,01que, aplicada às médias, geraram os coeficientes de diferenciação conforme notação apontada. De modo geral, segundo o teste de Tukey, o hidrogel contento cafeína diferiu significativamente entre os demais analisados, apresentando maior grau de intumescimento no decorrer do ensaio. As membranas de hidrogel com cafeína apresentaram uma curva de intumescimento crescente. Observou-se que em 48 horas o intumescimento foi de~182,012 %, como mostra a Fig.15. Esse fato se deve à dificuldade de reticulação via radiação ionizante induzida pela cafeína que reduziu a formação da rede polimérica, ocasionando maior absorção de água entre as cadeias de polímeros. As matrizes poliméricas de hidrogéis sem cafeína, por outro lado, apresentaram menor intumescimento e, portanto, maior reticulação na redução de absorção hídrica entre as cadeias poliméricas.

Tabela 3- Análise de variância dos resultados de intumescimento das formulações.

ANOVA				
Fonte da variação	*gl*	*MQ*	*F*	***valor-P***
Entre grupos	2	2,071458	12,0596	0,000117
Dentro dos grupos	33	0,171768		
Total	35			

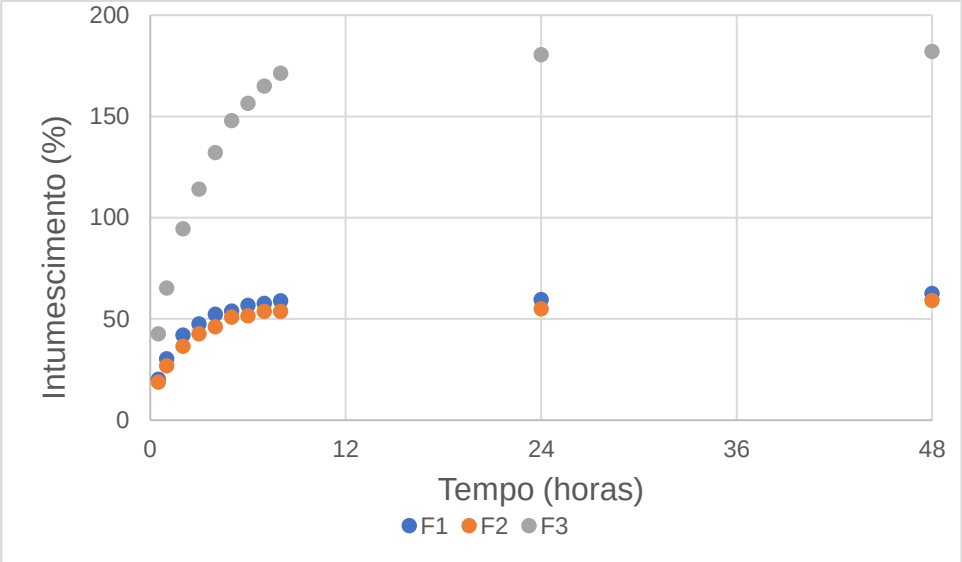

Figura 15- Intumescimento das formulações estudadas: F1 (band gel); F2 (PEGDA sem cafeína) e F3 (hidrogel de cafeína), após 48 horas de intumescimento.

4.5 Fração gel

No que se refere à fração gel, o hidrogel decafeína (F3) apresentou valores de fração gel em torno de 64%, confirmando a dificuldade de reticulação ocasinada pela cafeína via radiação ionizante. Já o band gel (F1) e o hidrogel de PEGDA sem cafeína (F2) apresentaram valores de fração gel por volta de 84,25% e 85,25%, respectivamente, indicando maior reticulação como previsto na literatura (Oliveira, 2013). Os valores médios e os devios padrões obtidos nos ensaios de fração gel estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4- Resultados do ensaio de fração gel das formulações estudadas. F1 (band gel); F2 (PEGDA sem cafeína) e F3 (hidrogel de cafeína).

Formulação	Mo (g)	Mf (g)	%Fração Gel	DP
F1	1,08	0,91	84,25	0,01
F2	1,09	0,95	85,25	0,01
F3	1,31	0,85	64,88	0,01

4.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A partir dos resultados obtidos pela análise por cromatografia, não se verificou a porcentagem de degradação da cafeína na dose de radiação aplicadas, quando comparada com a cafeína não irradiada. Nos cromatogramas abaixo, pode-se verificar que o tempo de retenção da cafeína irradiada a 32kGy e a não irradiada foi de aproximadamente 2,66 minutos, tendo pico de intensidade muito próximo. Essa análise poderia testemunhar subprodutos oriundos da radiólise da água, como observado na Fig.16.

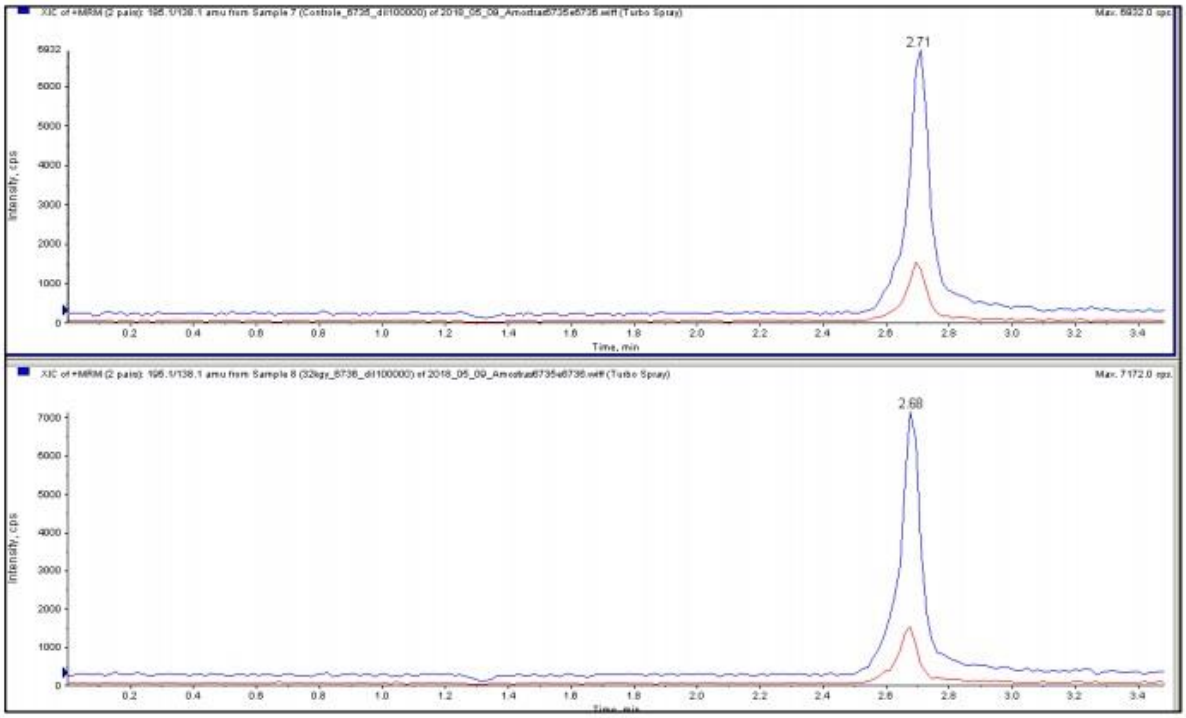

Figura 16- Cromatograma da amostra controle não irradiada (acima) e amostra irradiada a 32 kGy (abaixo).

4.7 Ensaio de permeação dérmica em célula de difusão do tipo Franz

A escolha do modelo de biomembrana utilizando a ecdise de *Boa Constrictor,* mostrou-se eficaz para reprodutibilidade de permeação dérmica "*in vitro*" com proposito de modelo de EC, visto que várias espécies de cobras são frequentemente utilizadas para esses fins, por mostrar similaridade na permeabilidade, baixa flutuação e boa reprodutibilidade dos resultados, como em outros estudos (Haigh *et al.*, 1998; Pongjanyakul *et al.*, 2000; Baby *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2011).

Os ensaios de permeação em célula de Franz Fig.19, foram realizados da seguinte forma: o primeiro consistiu em avaliar a permeação do hidrogel de cafeína sem a presença da papaína. O segundo, avaliou-se a permeação do hidrogel de cafeína após tratamento das ecdises com o gel de papaína e, por fim, analisou-se a cinética do gel de papaína sobre a ecdise. Esse tratamento consistiu em deixar o gel de papaína em contato com a pele por um período de 15 minutos, após esse período foi retirado o excesso da papaína e colocado o hidrogel de caféina sobre a pele previamente tratada e iniciado o experimento via célula de Franz. As massas iniciais do hidrogel de cafeína foram medidas antes de coloca-las nas células de difusão, com valor médio de 2,18g. O experimento foi realizado em triplicata e líquotas com 300 µl foram retiradas e recolocadas para as leituras posteriores de absorbância. Desse modo, foi possível observar o efeito do uso da papaína como promotora de permeação dérmica, como pode ser visto na Fig.16. em que se observa um aumento crescente dos valores das concetrações permeadas através da pele sem tratamento e após tratamento com gel de papáina com o passar do tempo. Estudos envolvendo permeação de diclofenaco de sódio também obtiveram êxito ao utilizar a papaína como promotora de permeação dérmica em pele humana (Lopes, P. S., Pinto, C. A. S. D. O.*, et al.*, 2008).

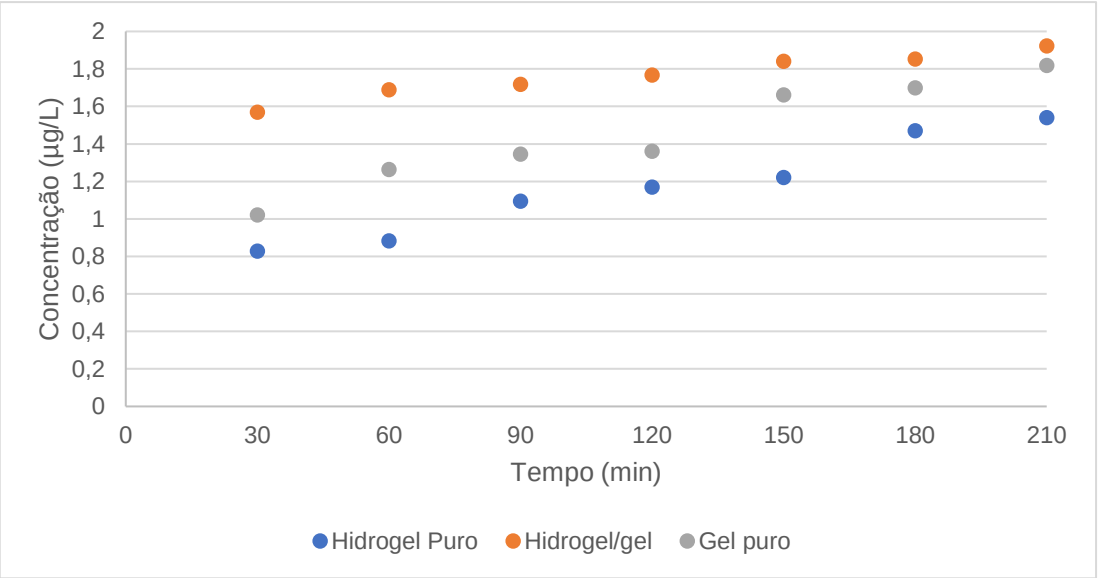

Figura 17- Cinética de permeação em função do tempo. Concentração (µg/L) de cafeína liberada e concentração de papaína liberadas em células de Franz.

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey tendo sido obtido uma diferença significativa (Δ) de 11,10215 com p>0,05, que aplicada às médias geraram os coeficientes de diferenciação conforme notação indicada, conforme tabela 4. De modo geral, segundo o teste de Tukey a cinética de permeação do hidrogel de cafeína após tratamento com gel de papaína apresentou resultados significantes em relação ao hidrogel de cafeína sem tratamento com gel de papaína.

Tabela 5- Análise de variância para ensaio de permeação em célula de difusão de Franz.

ANOVA				
Fonte da variação	gl	MQ	F	valor-P
Entre grupos	2	0,616063	11,10215	0,000723
Dentro dos grupos	18	0,05549		
Total	20			

4.9 Tomografia de coerência óptica – OCT

Com a técnica do OCT foi possível ver a ecdise em três dimensões, o que possibilitou a obtenção de cortes seccionais da estrutura da pele de cobra. As imagens foram obtidas em preto e branco e coloridas. Nas imagens é possível observar e comparar 3 situações, conforme Fig.18. A Fig.18 (a) demosntram a técnica utilzando a pele pura, sem tratamento, para controle posterior. Apesar da baixa resolução emitida pela técnica, é possível confirmar a permeação da cafeína Fig.18 (b) através da ecdise. A Fig.18 (c) evidencia também a permeação da papaína a membrana, e a Fig.18 (d) testemunha o aumento da permeação cafeína, associada à presença da papaína ao sistema, uma vez que o aparelho demonstra, em cores intensas, os locais de maior intensidade. Estudos apresentados na literatura avaliaram com a técnica de OCT a detecção de retinoblastomas maculares em crianças (Palazzi et al., 2015).

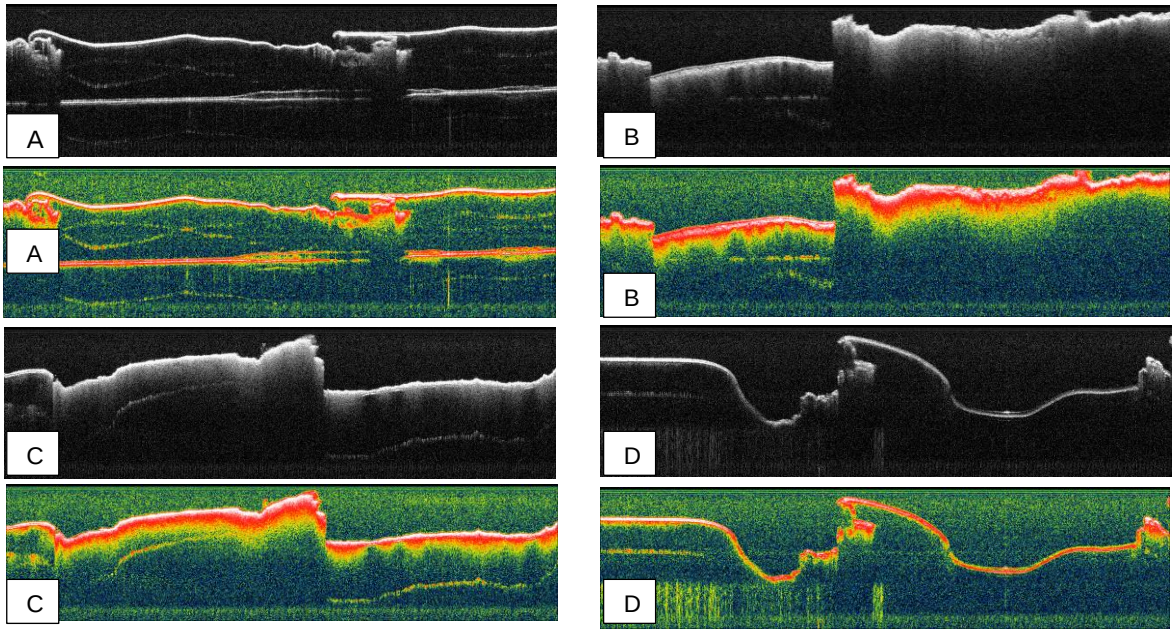

Figura 18- Imagens de OCT de cobra. Onde: A (pele pura, sem tratamento); B (pele tratada com cafeína); C (pele tratada com papaína) e D (pele tratada com cafeína e papaína). Fonte: Arquivo pessoal.

5. CONCLUSÃO

- De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar a influência da cafeína no processo de reticulação polimérica induzida por radiação ionizante de fonte Cobalto-60, dose de 25 kGy.
- Para técnica de DSC, evidenciou-se a interação entre os componentes da amostra com a alteração da disposição da curva em comparação com pó de cafeína o que confirmou o ponto de fusão em torno de 236ºC, corroborando com os achados na literatura.
- A TG possibilitou a confirmação da perda de massa da cafeína por volta dos 236ºC tanto para cafeína no hidrogel, quanto ela em pó, além de confirmar sua estabilidade.
- As microscopias da superficies de fraturas do hidrogel sem cafeína liofilizadas apresentam macroporos bem definidos e poros organizados. Ainda, exibiram um aspecto mais sólido com presença de camadas. Já o hidrogel com cafeína, exibiu uma morfologia irregular com poros bem menores e presença de microporos organizados e regiões homogênas de cafeína, expondo cristais da cafeína, uma vez que o polímero PVP é amorfo.
- Para técnica de intumescimento, o hidrogel contento cafeína diferiu significativamente $p>0,01$ entre os demais analisados apresentando maior grau de intumescimento no decorrer do ensaio. Cerca de ~182,012% de absorção de água em relação ao valor inicial, confirmando, com isso, a redução da rede polimérica formada no processo de irradiação. Enquanto a amostra, contendo PEGDA sem cafeína, apresentou menor porcentagem de intumescimente devido à presença do polietileno diacrilato que possui um alto poder reticulante.
- A análise da fração gel confirmou os resultados encontrados no intumescimento, tendo o hidrogel de caféina menor fração reticulada. Contudo, o band gel e hidrogel com PEGDA sem cafeína apresentaram valores previsto dentro da literatura.

- Nos resultados obtidos pela análise de cromatografia, observou-se que não ocorreu degradação da cafeína nas doses de irradiação aplicada, quando comparada com a cafeína não irradiada, o que poderia demonstrar subprodutos advindos do processo de radiólise da água.
- Na análise por OCT,confirmou-se a permeação da cafeína através da ecdise como também o aumento da permeação cafeína associada à presença da papaína ao sistema.
- A escolha do modelo de biomembrana utilizando a ecdise de *Boa Constrictor,* mostrou-se eficaz para reprodutibilidade de permeação dérmica "*in vitro*".
- Contudo, o trabalho atingiu seu objetivo ao demonstrar a influência significativa (Δ) de 11,10215 com $p>0,05$ da papaína como promotora de permeção dérmica. Tendo, segundo o teste de Tukey, a cinética de permeação do hidrogel de cafeína após tratamento com gel de papaína. Apresentou maiores resultados em relação as outras amostras estudadas, contribuindo ,portanto, para futuros trabalhos que possam explorar ainda mais essa área de entrega de fármacos.

6 REFERÊNCIAS

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Journal of Advanced Research, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015. ISSN 2090-1232. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969>. Acesso em: 01 jun. 2018.

ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. Journal of Controlled Release, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012. ISSN 0168-3659. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912007055>.

BABY, A. R. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas; v. 44, n. 2, 2008.

BAHAMONDE-NORAMBUENA, D. et al. Polymeric Nanoparticles in Dermocosmetic. International Journal of Morphology, v. 33, n. 4, p. 1563-1568, 2015. ISSN 0717-9502. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000371997400060 >.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001. ISSN 0928-0987. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701001671>.

BERNARD, D; MÉHUL, B; THOMAS-COLLIGNON, A; SIMONETTI,L; REMY, V; BERNARD, M.A; SCHMIDT, R. Analysis of proteins with caseinolytic acttivity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called "stratum corneum thiol protease" as cathepsin L2. Jornal of Investigative Dermatology, v 120, n.4, p. 592-600, 2003.

BENAMER, S. et al. Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone). Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, v. 248, n. 2, p. 284-290, 2006. ISSN 0168-583X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X06005465>.

BORELLA, J. et al. Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas. 2016. 179-184.

BOTHE, H.; CAMMENGA, H. K. Phase transitions and thermodynamic properties of anhydrous caffeine. Journal of thermal analysis, v. 16, n. 2, p. 267-275, 1979. ISSN 1572-8943. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01910688>.

BRATTSAND, M. et al. A Proteolytic Cascade of Kallikreins in the Stratum Corneum. Journal of Investigative Dermatology, v. 124, n. 1, p. 198-203, 2005. ISSN 0022-202X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15321175>.

BRITO JUNIOR, L. C. D.; FERREIRA, P. D. L. Cicatrização de feridas contaminadas tratadas com papaína*. Medicina (Ribeirao Preto. Online); v. 48, n. 2

(2015), 2015. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/99751>.

BRONAUGH RL FAU - FRANZ, T. J.; FRANZ, T. J. Vehicle effects on percutaneous absorption: in vivo and in vitro comparisons with human skin. n. 0007-0963 (Print),

BYUN, S. Y. et al. Efficacy of Slimming Cream Containing 3.5% Water-Soluble Caffeine and Xanthenes for the Treatment of Cellulite: Clinical Study and Literature Review. Annals of Dermatology, v. 27, n. 3, p. 243-249, Jun 2015. ISSN 1013-9087.

CASTELLANOS, F. X.; RAPOPORT, J. L. Effects of caffeine on development and behavior in infancy and childhood: a review of the published literature. Food and Chemical Toxicology, v. 40, n. 9, p. 1235-1242, 2002. ISSN 0278-6915. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691502000972>.

CAUBET, C. et al. Degradation of Corneodesmosome Proteins by Two Serine Proteases of the Kallikrein Family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. Journal of Investigative Dermatology, v. 122, n. 5, p. 1235-1244, 2004. ISSN 0022-202X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15308174>.

CHAPIRO, A. Future of radiation processing of polymers – Panel discussion, Radiat. Phys.Chem., v. 35, p. 15-17, 1990.

CUCHIARA, M. P. et al. Multilayer microfluidic PEGDA hydrogels. In: (Ed.). Biomaterials. Netherlands: 2010 Elsevier Ltd, v.31, 2010. p.5491-7. ISBN 1878-5905 (Eletrônico) 0142-9612 (vinculação).

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Analytical methods for caffeine. Quimica Nova, v. 30, n. 1, p. 99-105, Jan-Feb 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243879900021 >.

EFE, H. et al. Synthesis of 4-acryloylmorpholine-based hydrogels and investigation of their drug release behaviors. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 24, p. 814-820, 2013. ISSN 0103-5053.

ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Lipid-Related Barriers and Gradients in the Epidermis. Annals of the New York Academy of Sciences. 548: 4-13 p. 1988.

FEIN, H. et al. Topical protease therapy as a novel method of epidermal ablation: preliminary report. Dermatol Surg, v. 31, n. 2, p. 139-47; discussion 147-8, Feb 2005. ISSN 1076-0512 (Print)1076-0512 (Linking).

FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. In: (Ed.). Biochim Biophys Acta. Netherlands: Published by Elsevier B.V., v.1841, 2014. p.280-94. ISBN 0006-3002 (Print)0006-3002 (Linking).

FLATEN, G. E. et al. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 75, p. 10-24, Jul 2015. ISSN 0928-0987. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000356552500003 >.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: Challenges in delivery system design. Pharmaceutical Science and Technology Today, v. 3, n.

12, p. 417-425, 2000. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034406523&doi=10.1016%2fS1461-5347%2800%2900317-5&partnerID=40&md5=e023a942751a8ead38c1f0760b31cdae>.

FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. Journal of Investigative Dermatology, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975. ISSN 0022-202X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15444835>.

G PAYNE, W. et al. Enzymatic Debriding Agents Are Safe in Wounds With High Bacterial Bioburdens and Stimulate Healing. 2008.

GODOY, P. R. et al. Ionizing radiation-induced gene expression changes in TP53 proficient and deficient glioblastoma cell lines. In: (Ed.). Mutat Res. Netherlands: 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V, v.756, 2013. p.46-55. ISBN 0027-5107 (Print)0027-5107 (Linking).

GONZÁLEZ-TORRES, M. et al. Biological activity of radiation-induced collagen–polyvinylpyrrolidone–PEG hydrogels. Materials Letters, v. 214, p. 224-227, 2018. ISSN 0167-577X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X17317639>.

HAIGH, J. M. et al. In vitro permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. International Journal of Pharmaceutics, v. 170, n. 2, p. 151-156, 1998. ISSN 0378-5173. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517398000647>.

HALEBLIAN, J.; MCCRONE, W. Pharmaceutical Applications of Polymorphism. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 58, n. 8, p. 911-929, 1969. ISSN 0022-3549. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915369562>.

HAMISHEHKAR, H. et al. Histopathological evaluation of caffeine-loaded solid lipid nanoparticles in efficient treatment of cellulite. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 41, n. 10, p. 1640-1646, 2015. ISSN 0363-9045. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361334400007 >.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. In: (Ed.). Skin Pharmacol Physiol. Switzerland: Basel., v.26, 2013. p.8-14. ISBN 1660-5535 (Electronic)1660-5527 (Linking).

http://www.pharmaspecial.com.br/media/produtos/4_lit_aristoflex_avc.pdf (Acesso em 20/10/2017)

KANEBAKO, M.; INAGI, T.; TAKAYAMA, K. Evaluation of Skin Barrier Function Using Direct Current III: Effects of Electrode Distance, Boundary Length and Shape. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 26, n. 4, p. 518-522, 2003.

KELLY DE OLIVEIRA NEVES, J. et al. Microemulsions containing Copaifera multijuga Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β-caryophyllene delivery. 2018. 185.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. Journal

of Controlled Release, v. 178, n. 1, p. 25-45, 2014. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84893382314&doi=10.1016%2fj.jconrel.2013.12.028&partnerID=40&md5=52ad8f1eac12e1c55b1316e32b1a757a>.

LEONARDI, G.; PIERRO, D.; LUÍZA OZORES POLACOW, M. EFEITO DO ULTRA-SOM E DO D-PANTENOL NA REGENERAÇÃO TEGUMENTAR. 2018.

LOPES, P. et al. In vitro safety assessment of papain on human skin: A qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. 2008.

LOPES, P. S. et al. Evaluation of in vitro percutaneous enhancement effect of papain and pequi oil on diclofenac sodium permeation through human skin. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, p. 225-231, 2008. ISSN 1516-9332.

_____. In vitro safety assessment of papain on human skin: A qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, p. 151-156, 2008. ISSN 1516-9332.

LUO, L.; LANE, M. E. Topical and transdermal delivery of caffeine. International Journal of Pharmaceutics, v. 490, n. 1-2, p. 155-164, Jul 2015. ISSN 0378-5173.

NUNES, R. et al. Estudo de padronização da pele de cobra espécie -Boa constrictor -como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos. 2011.

OLIVEIRA, M. A. D.; YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. C. D. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. Química Nova, v. 34, p. 1224-1230, 2011. ISSN 0100-4042.

PALAZZI, M. A. et al. Tomografia de coerência óptica na avaliação do retinoblastoma macular. Revista Brasileira de Oftalmologia, v. 74, p. 275-278, 2015. ISSN 0034-7280.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. Polímeros, v. 9, p. 104-109, 1999. ISSN 0104-1428.

PINTO, C. et al. Determination of papain activity in topical dosage forms: Single laboratory validation assay. 2007. 771-775.

PINTO, C. A. S. D. O. et al. Comparative study of the stability of free and modified papain incorporated in topical formulations. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 47, p. 751-760, 2011. ISSN 1984-8250.

PONGJANYAKUL, T.; PRAKONGPAN, S.; PRIPREM, A. Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 26, n. 6, p. 635-642, 2000. ISSN 0363-9045. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087258500006 >.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. In: (Ed.). Adv Drug Deliv Rev. Netherlands: 2011 Elsevier B.V, v.63, 2011. p.470-91. ISBN 1872-8294 (Electronic)0169-409X (Linking).

RIGG, P. C.; BARRY, B. W. Shed Snake Skin and Hairless Mouse Skin as Model Membranes for Human Skin During Permeation Studies. Journal of Investigative

Dermatology, v. 94, n. 2, p. 235-240, 1990. ISSN 0022-202X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X9090206L>.

RIVIERE JE. Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology: Taylor & Francis; 2005.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research, v. 6, p. 317-320, 2003. ISSN 1516-1439.

ROSIAK, J. M.; YOSHII, F. Hydrogels and their medical applications. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, v. 151, n. 1, p. 56-64, 1999. ISSN 0168-583X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X99001184>.

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 38, n. 3, p. 171-177, 2006. ISSN 1381-1177. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117706000142>.

SATHISH, H. A.; KUMAR, P. R.; PRAKASH, V. Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain. International Journal of Biological Macromolecules, v. 41, n. 4, p. 383-390, 2007. ISSN 0141-8130. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813007001365>.

SATO, M. E. O. et al. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas; v. 43, n. 2 (2007), 2007. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/44197/47818>.

SCHÜRER, N. Y.; PLEWIG, G.; ELIAS, P. M. Stratum corneum Lipid Function. Dermatology, v. 183, n. 2, p. 77-94, 1991. ISSN 1018-8665. Disponível em: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000247644>.

SEMLIN, L. et al. In vitro models for human skin disease. Drug Discovery Today, v. 16, n. 3-4, p. 132-139, 2011. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79851515406&doi=10.1016%2fj.drudis.2010.12.001&partnerID=40&md5=3a95b9bb664cd1c2fb13ac2649b71624>.

SILINDIR GUNAY, M.; OZER, Y. Sterilization methods and the comparison of E-Beam sterilization with gamma radiation sterilization. 2009. 43-53.

SIM, Y. C. et al. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as an enzymatic transdermal drug penetration enhancer. Pharmazie, v. 58, n. 4, p. 252-256, Apr 2003. ISSN 0031-7144. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182380600007 >.

SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. Food and Chemical Toxicology, v. 40, n. 9, p. 1243-1255, 2002. ISSN 0278-6915. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691502000960>.

TAKAHASHI, K. et al. Influence of pH on the Permeability of p-Toluidine and Aminopyrine Through Shed Snake Skin as a Model Membrane. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 27, n. 2, p. 159-164, 2001. ISSN 0363-9045. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/DDC-100000482>.

TRAVERSA, E.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; VELASCO, M. V. R. Histological evaluation of hair follicle due to papain's depilatory effect. International Journal of

Pharmaceutics, v. 335, n. 1, p. 163-166, 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307000579>.

TREFFEL, P. et al. Effect of Occlusion on in vitro Percutaneous Absorption of Two Compounds with Different Physicochemical Properties. 1992. 108-13.

VAN DE SANDT, J. J. M. et al. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 39, n. 3, p. 271-281, 2004. ISSN 0273-2300. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230004000145>.

VAN SMEDEN, J. et al. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. In: (Ed.). Biochim Biophys Acta. Netherlands: 2013 Elsevier B.V, v.1841, 2014. p.295-313. ISBN 0006-3002 (Print)0006-3002 (Linking).

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D. L. Tissue engineering: the next generation. Tissue Eng, v. 12, n. 12, p. 3261-3, Dec 2006. ISSN 1076-3279 (Print)1076-3279 (Linking).

WANCHOO, R. K.; SHARMA, P. K. Viscometric study on the compatibility of some water-soluble polymer–polymer mixtures. European Polymer Journal, v. 39, n. 7, p. 1481-1490, 2003. ISSN 0014-3057. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305702003865>.

WATKINSON, A. Stratum corneum thiol protease (SCTP): a novel cysteine protease of late epidermal differentiation. Archives of Dermatological Research, v. 291, n. 5, p. 260-268, 1999. ISSN 1432-069X. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004030050406>.

WELZEL, J. et al. Optical coherence tomography of the human skin. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 37, n. 6, p. 958-963, 1997. ISSN 0190-9622. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962297700720>.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. American Journal of Infection Control, v. 34, n. 10, Supplement, p. S98-S110, 2006. ISSN 0196-6553. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655306009503>.

WIDLER, N.; SIGRIST, A.; GAFNER, F. M. Lipid analysis and transepidermal water loss in snakes. 2002. 24-29.

WILKINSON, S. C. et al. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. Int Arch Occup Environ Health, v. 79, n. 5, p. 405-13, May 2006. ISSN 0340-0131 (Print)0340-0131.

WISHER, D. Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed. Journal of the Medical Library Association : JMLA, 65 East Wacker Place, Suite 1900, Chicago, IL 60601-7246, v. 100, n. 1, p. 75-76, 2012. ISSN 1536-50501558-9439. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257481/>.

SIQUEIRA, AZEVEDO; SIQUEIRA, BJERK. Introdução à cromatografia com ênfase em material Biológico. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.