AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MEMBRANA NANOESTRUTURADA À BASE DE
POLIACRILAMIDA PARA VEICULAÇÃO DE PROTEÍNAS**

CAROLINE CRISTINA FERRAZ

**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

2013

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MEMBRANA NANOESTRUTURADA À BASE DE
POLIACRILAMIDA PARA VEICULAÇÃO DE PROTEÍNAS**

CAROLINE CRISTINA FERRAZ

**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

2013

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlos e Walkiria, com toda minha admiração pelo exemplo de luta, perseverança e caráter, que desde cedo me ensinaram que o conhecimento é o único bem que nunca nos será tirado.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ser acima de qualquer circunstância, meu Salvador, a minha base, o meu sustento, por ter me dado o dom da vida e principalmente saúde, disposição e coragem para percorrer este caminho.

Aos meus pais, José Carlos e Walkiria, com toda minha admiração pelo maravilhoso exemplo de caráter cristão que possuem. Por sempre apostarem na minha capacidade e se empenharem de corpo e alma para mostrar as oportunidades de caminhar em busca dos meus sonhos, e por vibrarem com cada uma de minhas conquistas como se fossem suas. Tudo o que sou devo a vocês!

Meu sentimento de gratidão por vocês é e será eterno!

Ao meu orientador Dr. Ademar Benévolo Lugão, por ter me dado esta e tantas outras oportunidades e, acima de tudo, por sempre ter acreditado e confiado em meu trabalho. Meus sinceros agradecimentos pelos caminhos que muitas vezes me mostrou quando eu não os enxergava.

À Prof. Dra. Patrícia Santos Lopes, por ter plantado em mim a sementinha de amor à pesquisa, sobretudo pela confiança que depositou ao acreditar em meu trabalho desde a Iniciação Científica. Por ser muito mais que uma excelente profissional, mas uma amiga, que sempre esteve presente com palavras sábias de carinho e incentivo. Sua ajuda foi essencial e preciosa.

À Dra. Monica Beatriz Mathor, por ter aberto as portas do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN para colaboração desta pesquisa. Acima de tudo, meus sinceros agradecimentos por toda sua amizade, seu profissionalismo, seu apoio, sua ajuda, pelas queridas palavras e por todas as sugestões ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Classius Ferreira da Silva, da UNIFESP, por todas suas contribuições e sugestões ao meu trabalho e pela preciosa atenção que me dedicou.

Ao grande amigo Gustavo Henrique Costa Varca, meus sinceros agradecimentos por toda contribuição dedicada a este trabalho. Por todas as discussões e sugestões, mas, acima de tudo, pela sua amizade. Sua sabedoria, ajuda, dedicação, cooperação e paciência fizeram toda a diferença na realização deste trabalho. Obrigada por tudo!

Ao Dr. Emilio Bucio e a Dra. Guilhermina Burillo, da Universidad Nacional Autonoma de Mexico (UNAM), por terem me acolhido em seu país no meu período de intercâmbio, sobretudo ao Dr. Emilio Bucio, meus sinceros agradecimentos pela amizade, pela disposição em me ajudar e me ensinar sempre e também pela experiência e conhecimentos transmitidos.

À Prof. Dra. Vladi Olga Consiglieri e ao Prof. Dr. Michele Vitolo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e pelo privilégio em ter sido monitora no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Obrigada por me receberem tão bem em suas disciplinas e pelos preciosos ensinamentos que puderam me passar.

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN, obrigada pela irradiação das amostras e também por toda a disponibilidade e paciência que tiveram em me ajudar sempre.

Ao Johny e ao José Maria do Centro de Biotecnologia (CB) do IPEN, obrigada por toda atenção no uso do liofilizador.

Aos alunos de Iniciação Científica, Gabriela Garrido Perossi, Bruna Melo Diniz e Vinícius da Silva Carvalho, meus agradecimentos por todo apoio e ajuda na parte experimental deste trabalho. Vocês são ótimos e tenho certeza que o futuro lhes será brilhante.

À tão querida amiga Stefany Plumerin Santin, pelo incrível companheirismo e incentivo em todos os momentos, principalmente nas horas mais difíceis; obrigada pela companhia nas disciplinas e no meu seminário de área.

À tão querida amiga Maria Cely Freitas Dias, obrigada por suavizar os momentos difíceis com palavras de incentivo, obrigada pela companhia nas disciplinas e no meu seminário de área.

À companheira de laboratório Andréia Navarro, pelas ótimas conversas, pelos bons conselhos, pela ajuda e companhia ao longo desta caminhada.

Aos tão queridos amigos que fizeram toda a diferença nesta caminhada e que faziam dos almoços no “bandejão” OS MELHORES: Rodrigo Crespo Mosca, Bianca Sufi, Henrique Peres, Clécia Souza, Luíza Stecher. E também as amigas do CTR, Bianca Genesi, Natália Esteves, Dayane Piffer.

A todos do Laboratório de Biomateriais e também de outros laboratórios do CQMA, em especial ao Jorge Batista, Henrique Peres, Luíza Mello, Heloísa Zen e Maria Oliveira, obrigada pelo apoio técnico e por toda ajuda.

A todos do Laboratorio de Quimica de Radiaciones en Macromoleculas do Instituto de Ciencias Nucleares da UNAM (México), especialmente ao Alejandro, Tania, Franklin, Lorena, Mayele e Giovani, obrigada por terem sido tão solícitos comigo. Foi um prazer dividir minhas experiências de pesquisas com vocês.

Às minhas queridas amigas do coração, Maria Wolf, Tatiana Oliveira, Patrícia Jacob, Lilliam Harada, Mayra Carvalho e aos amigos Everton Jampietri e Fábio Moraes, que souberam entender minha ausência e que sempre me incentivaram a ir em busca dos meus sonhos. Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos!

A toda minha família que sempre me apoiou, aos meus irmãos Renato Ferraz e Marcelo Ferraz e principalmente à minha tão querida sobrinha Isabela Oliveira Ferraz, que só de ver o seu sorriso já faz meu mundo ficar mais alegre.

À Universidade de São Paulo e ao Banco Santander pelo Programa de Bolsa Mobilidade Internacional, pela oportunidade de realizar uma parte deste trabalho fora do país.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado e ao IPEN por toda infraestrutura e serviços oferecidos.

DESENVOLVIMENTO DE UMA MEMBRANA NANOESTRUTURADA À BASE DE POLIACRILAMIDA PARA VEICULAÇÃO DE PROTEÍNAS

Caroline Cristina Ferraz

RESUMO

Hidrogéis são membranas formadas pela reticulação de cadeias poliméricas, empregados na área farmacêutica como produtos biomédicos. Dentre os principais polímeros selecionados para a síntese de hidrogéis, destaca-se a poliacrilamida (PAAM) devido às suas propriedades como hidrofiliabilidade e alto grau de intumescimento. Proteínas terapêuticas e enzimas são veiculadas em hidrogéis como carreadores de fármaco ou como dispositivos para tratamento de feridas e escaras na pele. Este trabalho teve como objetivo a síntese de uma membrana à base de PAAM favorável para veiculação de proteínas. As proteínas empregadas foram papaína e albumina de soro bovino (BSA) e as etapas do processo englobaram síntese da membrana, adição das proteínas no sistema, irradiação em condições específicas e caracterização da membrana. Ao utilizar temperaturas criogênicas na síntese e na irradiação das amostras, houve predomínio de reticulação da cadeia polimérica, fato que não ocorria em temperatura ambiente. As membranas foram obtidas com incorporação dos ativos na concentração de 0,2 a 1% (p/p), obtendo-se concentração de PAAM entre 4% a 10% (p/p), as quais receberam irradiação com raios gama provenientes de uma fonte ^{60}Co , na dose de 25 kGy. Nas condições realizadas, as membranas não apresentaram citotoxicidade nem adesão celular, o perfil de liberação das proteínas foi adequado, a papaína manteve sua bioatividade preservada apesar do decaimento biológico e, segundo estudos de carga das moléculas, a membrana possui maior afinidade com a papaína, liberando-a mais lentamente. Desta forma, o método proposto e as membranas obtidas foram apropriados para a obtenção de um biomaterial.

RADIO-SYNTHESIZED POLYACRYLAMIDE NANOSTRUCTURED HYDROGELS FOR PROTEINS RELEASE

Caroline Cristina Ferraz

ABSTRACT

The use of hydrogels for biomedical purposes has been extensively investigated. Polyacrylamide (PAAM) is widely used due to properties such as hydrophilicity and swelling degree. Pharmaceutical proteins correspond to highly active substances which may be applied for distinct purposes. This work concerns the development of radio-synthesized hydrogel for protein release using papain and bovine serum albumin (BSA) as model proteins. The polymer was solubilized (1% w/v) in water and lyophilized. The proteins were incorporated into the lyophilized polymer and the hydrogels were produced by simultaneous crosslinking and sterilization using gamma radiation at 25 kGy under frozen conditions. The produced systems were characterized in terms of swelling degree, gel fraction, crosslinking density, fluid handling capacity, determination pH at point of polymer zero charge and evaluated according to protein release, bioactivity, cytotoxicity and cell adhesion. The hydrogels developed presented different properties as a function of polymer concentration and the optimized results were found for the samples containing 4-10% polyacrylamide. Protein release was controlled by the electrostatic affinity of acrylic moieties of polymer and proteins. This selection was based on the release of the proteins during the experiment period (up to 50 hours), maintenance of enzyme activity and the nanostructure developed. The system was suitable for protein loading and release and according to the cytotoxic assay and cell adhesion it was also adequate for biomedical purposes and this method was able to generate a matrix to protein release.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2.OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Proteínas	22
3.1.1 Papaína	24
3.1.2 Albumina de soro bovino (BSA)	27
3.2 Polímeros	29
3.2.1 Poliacrilamida (PAAM)	30
3.3 Hidrogéis	33
3.3.1 Polímeros utilizados em hidrogéis	33
3.3.2 Reticulação de hidrogéis	34
3.3.3 Nanoestruturação de hidrogéis	36
3.4 Radiação Ionizante	37
3.4.1 Uso da radiação ionizante para síntese de hidrogéis	38
3.4.2 Radiólise da água	39
3.5 Sistemas de liberação de fármacos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Materiais	44
4.2 Equipamentos	45
4.3 Síntese da membrana de PAAM	45
4.4 Preparo da solução de papaína e da solução de BSA	47
4.5 Incorporação das proteínas na membrana	47

4.6	Processo de irradiação das amostras	47
4.7	Caracterização da membrana de PAAM	49
4.7.1	Ensaio de Intumescimento.....	49
4.7.2	Ensaio de Fração gel.....	49
4.7.3	Análise de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	51
4.7.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
4.7.5	Determinação da densidade de reticulação	52
4.7.6	Determinação do Ponto de carga zero (pH_{zpc}).....	53
4.7.7	Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMC) - <i>Fluid Handling Capacity (FHC)</i>	54
4.8	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> das proteínas.....	56
4.8.1	Conteúdo protéico.....	57
4.8.2	Análise da atividade enzimática	57
4.9	Ensaio de Citotoxicidade.....	59
4.10	Ensaio de Adesão Celular	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	Seleção do método de preparo da membrana de PAAM	62
5.1.1	Uso de temperatura criogênica para síntese da membrana	65
5.2	Caracterização da membrana de PAAM	66
5.2.1	Ensaio de Intumescimento.....	66
5.2.2	Determinação da densidade de reticulação	70
5.2.3	Ensaio de Fração Gel	71
5.2.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	73
5.2.5	Determinação do Ponto de carga zero (pH_{zpc}).....	76
5.2.6	Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMC) - <i>Fluid Handling Capacity (FHC)</i>	77
5.3	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> das proteínas	79

5.3.1 Atividade enzimática	82
5.4 Ensaio de Citotoxicidade.....	83
5.5 Ensaio de adesão celular	88
6. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

Lista de Figuras

Figura 1. Imagem representativa das estruturas de uma proteína. A figura (a) representa sua estrutura primária, (b) estrutura secundária, (c) estrutura terciária e (d) estrutura quaternária. (Fonte: LEHNINGER, 1995)	22
Figura 2. Imagem das folhas e do fruto verde do mamão adulto, onde se origina a papaína. (Fonte: http://pharmaceuticals.indiabizclub.com/catalog/256680~papain~bhubaneswar)	25
Figura 3. Estrutura representativa da molécula de papaína indicando seu sítio ativo e seus domínios L e R. (Adaptado de http://delphi.phys.univ-tours.fr/.../Images/pap.jpeg)	26
Figura 4. Modelo de preenchimento de espaço de molécula de BSA com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e os neutros em amarelo. (a) Vista frontal, (b) vista traseira, (c) do lado esquerdo e (d) lado direito (CARTER & HO, 1994).	28
Figura 5. Representação esquemática da classificação de um polímero quanto à natureza de suas ligações e sua estrutura (LUCAS <i>et al.</i> , 2001).....	30
Figura 6. Estrutura química da molécula de poliacrilamida (Fonte: MARCONATO & FRANCHETTI, 2002).....	31
Figura 7. Exemplo de uma rede polimérica formada em um hidrogel (Fonte: Adaptado de BRADLEY, 1984).....	34
Figura 8. Representação dos efeitos diretos e indiretos do uso da radiação ionizante no processo de reticulação polimérica.....	40
Figura 9. Sistema de liberação controlada através de intumescimento (Fonte: LANGER & PEPPAS, 1981).....	42
Figura 10. As figuras (a) e (b) representam a solubilização do polímero em água em homogeneizador mecânico a 379 rpm.....	46
Figura 11. A figura (a) representa o irradiador de Cobalto-60 <i>Gammacell</i> 220 do Centro de Tecnologia das Radiações CTR do IPEN. A figura (b) representa, em aumento, a câmara de irradiação onde as amostras são acondicionadas (SUFI, 2013).....	48
Figura 12. Extrator <i>Soxhlet</i> utilizado em uma das técnicas de Fração Gel.	50

Figura 13. Imagem representativa do ensaio de pH_{zpc} . A figura (a) representa as amostras contendo diferentes valores de pH em incubadora; a figura (b) representa os valores de pH sendo mensurados através de um pHmêtro.	53
Figura 14. Aparato utilizado para determinar a Capacidade de Movimentação de Fluidos: (a) copo de Paddington; (b) sistema de PVC - copo de Paddington modificado; (c) detalhe do sistema de PVC desmontado e (d) base do sistema de PVC com anel de vedação.....	55
Figura 15. Representação da montagem do teste utilizando microplacas de 96 poços para doseamento da atividade enzimática da papaína.	58
Figura 16. Esquema da disposição das células na placa de 96 poços. Legenda: b = branco (poços referentes ao controle do MTS ou NR); VC = controle de células; C1-C8 = poços referente às diluições da amostra em ordem crescente de concentração (Fonte: NIH Publication, 2001).....	60
Figura 17. Micrografia de superfície da película de PAAM proveniente da secagem da solução de PAAM em atmosfera de O_2	62
Figura 18. Micrografia de superfície da amostra de PAAM proveniente do processo de liofilização.	63
Figura 19. Membranas de PAAM a 5 e a 6%, respectivamente, obtidas por meio do uso de radiação ionizante à dose de 25 kGy.	64
Figura 20. A imagem (a) corresponde à amostra de membrana antes do ensaio de intumescimento, a imagem (b) corresponde à amostra intumescida, ao final do ensaio de intumescimento.	67
Figura 21. Efeito da dose de irradiação no intumescimento da membrana à 6% de PAAM.	69
Figura 22. Curva de DSC das amostras PAAM a 5% (controle), PAAM contendo papaína e PAAM contendo BSA.	75
Figura 23. Gráfico representativo da permeabilidade das membranas no Teste de Capacidade de movimentação de Fluidos. Coluna vermelha = Membrana controle; Coluna verde = Membrana contendo BSA; Coluna Azul = Membrana contendo papaína.	78
Figura 24. Cinética de liberação da papaína pelas membranas de PAAM.	80
Figura 25. Cinética de liberação de BSA pelas membranas de PAAM.	80

Figura 26. Atividade enzimática relativa da papaína medida em USP.mg ⁻¹ para membranas em diferentes concentrações de PAAM (4-10%), onde a=4% PAAM, b=5% PAAM, c=6% PAAM e d=10% PAAM.	83
Figura 27. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 4% (controle).	84
Figura 28. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 5% (controle).	85
Figura 29. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 4% contendo papaína	85
Figura 30. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 5% contendo BSA.....	86
Figura 31. Ensaio de Citotoxicidade de papaína e BSA (controle das proteínas)	87
Figura 32. Micrografia das membranas 5% PAAM controle após 4 horas de contato com as células BALB/c 3T3 (a) e 24 horas de contato (b) para o teste de adesão celular. Microscopia eletrônica de varredura, aumento x 1500 (a) e x 4000 (b).....	89
Figura 33. Micrografia das membranas 5% PAAM contendo BSA após 4 horas de contato com as células BALB/c 3T3 (a) e 24 horas de contato (b) para o teste de adesão celular. Microscopia eletrônica de varredura, aumento x 4000 (a) e x 4000 (b).....	89
Figura 34. Micrografia das membranas 5% PAAM contendo papaína após 4 horas de contato com as células BALB/c 3T3 (a) e 24 horas de contato (b) para o teste de adesão celular. Microscopia eletrônica de varredura, aumento x 2000 (a) e x 4000 (b).....	90
Figura 35. Imagem obtida através de Microscopia Óptica referente ao controle das células BALB/c 3T3, aumento 1000x.	91

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação entre a concentração de acrilamida e a faixa de separação das proteínas em KDa.	32
Tabela 2. Efeitos da radiação: reticulação ou cisão das cadeias poliméricas.	36
Tabela 3. Hidrogéis sensíveis ao ambiente, utilizados para liberação de fármacos	43
Tabela 4. Valores de intumescimento obtidos pelas membranas analisadas.....	68
Tabela 5. Valores de densidade de reticulação para as membranas de PAAM. ..	70
Tabela 6. Dados de Fração gel obtidos das membranas de hidrogel controle, com a presença de papaína e com a presença de BSA utilizando solvente em altas temperaturas.	72
Tabela 7. Dados de Fração gel obtidos das membranas de hidrogel controle, com a presença de papaína e com a presença de BSA utilizando solvente a temperatura ambiente.	73
Tabela 8. Valores de pH_{zpc} obtidos para as membranas de PAAM e a relação entre carga total das moléculas de proteínas conforme o valor de pH_{zpc}	76
Tabela 9. Resultado do Teste de Capacidade de movimentação de fluidos, correspondendo à capacidade de permeabilidade das membranas.	78

Lista de Abreviaturas

AAM - Acrilamida

BAPA - Cloridrato de benzoil DL-arginina ρ -nitroanilida

BSA - *Bovine Serum Albumine* – Albumina de Soro Bovino

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Etilenodiaminotetracetato de sódio

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

PAAM - Poliacrilamida

pH_{ZPC} - Ponto de Carga Zero do Adsorvente

PI - Ponto isoelétrico

Lista de Unidades

kDa – quilo Dalton

MeV – micro elétron volt

rpm – rotações por minuto

p/p – peso/peso

p/v – peso/volume

1. INTRODUÇÃO

Hidrogéis poliméricos são materiais formados por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos capazes de absorver água em níveis superiores a 50% do peso total e caracterizados pela forte afinidade com a água devido à presença de grupos hidrofílicos, como: -OH, -COOH, -CONH₂ (PEPPAS, 1987; PEPPAS, 1993). Tais propriedades permitem a aplicação destes materiais em diversas áreas, sendo empregados como veículos biodegradáveis em diferentes setores, sobretudo o farmacêutico (PEPPAS *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2006) e biomédico (LEE *et al.*, 2005).

Dentre as matérias-primas mais comumente utilizadas na produção de hidrogéis, destacam-se os polímeros derivados de vinilpirrolidona, acrilamidas, acrilatos e álcool vinílico, os quais em geral, devido à sua natureza química, apresentam biocompatibilidade adequada e toxicidade reduzida, constituindo uma opção farmacêutica para liberação de uma gama de ativos (ROSIK & ULANSKI, 1999).

Sistemas poliméricos são utilizados para liberação de ativos por permitirem uma liberação lenta, gradual e direcionada ao local desejado, além de serem de fácil aplicação e não oclusivos. Esses materiais permitem também a veiculação de proteínas, aprisionadas ou encapsuladas na matriz polimérica, o que oferece vantagens frente às formas farmacêuticas convencionais, como melhora na eficácia, redução da toxicidade e liberação controlada destas moléculas (NEMEN *et al.*, 2007).

Proteínas terapêuticas e enzimas com propriedades proteolíticas são veiculadas em hidrogéis, como dispositivos para tratamento de feridas e escaras, dentre outros (TELGENHOFF *et al.*, 2007). Embora tais produtos apresentem eficácia comprovada para tal aplicação (FALABELLA, 2006), problemas atribuídos à estabilidade de princípios ativos como a papaína na forma farmacêutica, restringem sua utilização como produto.

As complexidades bioquímicas e estruturais das proteínas destinadas para fins terapêuticos tornam o desenvolvimento de formulações para veiculação e liberação de proteínas uma tarefa muito desafiadora. Estudos anteriores relatam o desenvolvimento de matrizes poliméricas para liberação de enzimas proteolíticas como a papaína (ZULLI *et al.*, 2010; ESTEVAM *et al.*, 2012; SINGH & SINGH, 2012) e, atualmente, há estudos desenvolvendo a papaína complexada com ciclodextrinas (VARCA *et al.*, 2010), na tentativa de se obter uma forma mais estável da enzima.

O desenvolvimento de sistemas poliméricos capazes de conferir um melhor desempenho, minimizando custo e tempo operacional, considerando o limitado número de formulações disponíveis, possibilitaria uma ampliação na terapêutica disponível, bem como seu uso no setor biomédico.

Este estudo teve por finalidade o desenvolvimento de uma membrana de hidrogel à base de poliacrilamida (PAAM) para veiculação e liberação de proteínas, utilizando papaína como modelo de proteína vegetal e albumina de soro bovino (BSA) como modelo de proteína animal

A papaína, devido às suas propriedades proteolíticas, é reconhecida como proteína modelo para diversos estudos, além de possuir método de doseamento bem definido e específico, e albumina de soro bovino (BSA) é empregada em diversas finalidades, sendo, inclusive, usada como padrão para técnicas bioquímicas e como carreadora de fármacos em membranas poliméricas.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma membrana nanoestruturada de hidrogel à base de poliacrilamida, promovendo sua reticulação pelo uso de radiação ionizante, e caracterizar os parâmetros de rede e as propriedades biológicas, com o intuito de obter sistemas adequados para veiculação e liberação de proteínas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar membrana à base de poliacrilamida;
- Avaliar a eficiência do método de reticulação proposto na formação da membrana;
- Avaliar a influência dos parâmetros de rede e da densidade de reticulação na incorporação e na liberação de substâncias pela matriz polimérica, utilizando, para tanto, proteínas como papaína e BSA (Albumina de soro bovino);
- Avaliar a citotoxicidade e a adesão celular da membrana sintetizada.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Proteínas

Proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes e importantes presentes nas células. Constituídas a partir de um conjunto básico de vinte aminoácidos arranjados em diferentes sequências (LEHNINGER, 1995), cada uma exerce uma função biológica específica. São moléculas com estruturas complexas que podem ser organizadas didaticamente em quatro níveis crescentes em complexidade (Figura 1):

Figura 1. Estruturas de uma proteína. A figura (a) representa a estrutura primária, (b) estrutura secundária, (c) estrutura terciária e (d) estrutura quaternária. (Fonte: LEHNINGER, 1995)

- Estrutura Primária

Dada pela sequência de aminoácidos e ligações peptídicas da molécula, é o nível estrutural mais simples e mais importante e dele deriva todo o arranjo espacial molecular. Essa estrutura consiste em uma longa cadeia de aminoácidos com uma extremidade amino terminal e uma extremidade carboxi terminal. A estrutura pode ser rompida por hidrólise química ou enzimática das ligações peptídicas, com liberação de peptídeos menores e aminoácidos livres.

- Estrutura Secundária

É dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína. É o último nível de organização das proteínas fibrosas e ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos dos aminoácidos e seus grupamentos amina e carboxila. O arranjo secundário de um polipeptídeo pode ocorrer de forma regular. Esse fato ocorre quando os ângulos das ligações entre carbonos e seus ligantes são iguais e se repetem ao longo da molécula.

- Estrutura Terciária

Dada pelo arranjo espacial de aminoácidos distantes entre si na sequência polipeptídica, onde sua estrutura adquire uma forma tridimensional. Ocorre nas proteínas globulares, as quais apresentam uma estrutura mais complexa. As cadeias polipeptídicas muito longas se organizam em domínios e regiões com estruturas terciárias semi-independentes ligadas entre si por segmentos lineares da cadeia polipeptídica.

- Estrutura Quaternária

Está presente nas proteínas oligoméricas, dada sua distribuição espacial de mais de uma cadeia polipeptídica no espaço. Estas subunidades se mantêm unidas por ligações covalentes, como pontes dissulfeto, e ligações não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. As subunidades atuam de forma independente ou cooperativamente no desempenho da função bioquímica da proteína (LEHNINGER, 1995).

A aplicação das proteínas como moléculas terapêuticas é de grande importância para o tratamento de várias doenças, devido à alta especificidade que tais substâncias apresentam em concentrações relativamente pequenas, quando comparadas aos fármacos convencionais. No âmbito biomédico, o uso das proteínas destaca-se no desenvolvimento de hidrogéis para serem aplicados na pele, visando sua função na cicatrização de feridas e escaras, como é o caso da papaína (ZULLI *et al.*, 2010; ESTEVAM *et al.*, 2012; SINGH & SINGH, 2012).

3.1.1 Papaína

A papaína é uma enzima proteolítica isolada do látex contido nas folhas e frutos verdes do mamão adulto (Figura 2), *Carica papaya* Linné (O'NEIL *et al.*, 2001), apresentando massa molar de 23 kDa, pH ótimo variando de 4 - 6 e ponto isoelétrico de 9.5, cujo valor indica o pH no qual a molécula se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa (SANGEETHA & ABRAHAM, 2006).

Figura 2. Folhas e frutos verdes do mamão adulto, onde se origina a papaína.
(Fonte: <http://pharmaceuticals.indiabizclub.com/catalog/256680~papain~bhubaneswar>)

É constituída por uma cadeia polipeptídica composta de 212 resíduos de aminoácidos que se dobra para formar dois domínios, L e R. Entre os domínios forma-se um profundo vale, onde está localizado o sítio ativo da enzima (Figura 3). Os resíduos cisteína (Cys-25), histidina (His-159) e ácido aspártico (Asp-158) constituem o sítio ativo. O resíduo Cys-25 possui o grupo sulfidríla essencial, que permanece livre na enzima ativa, enquanto outros seis resíduos de cisteína formam, entre si, pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura terciária da proteína (KAMPHUIS *et al.*, 1984).

A enzima requer o grupo sulfidríla livre para desempenhar ação catalítica. Sua conformação estrutural é estabilizada por ligações dissulfeto que, uma vez destruídas, levam à redução e consequente perda da atividade biológica catalítica da enzima (ZHUANG & BUTTERFIELD, 1991).

Figura 3. Estrutura representativa da molécula de papaína indicando seu sítio ativo e seus domínios L e R. (Adaptado de <http://delphi.phys.univ-tours.fr/.../Images/pap.jpeg>)

A papaína purificada se apresenta sob a forma de um pó higroscópico, de coloração variando desde o branco até o amarelo. Apresenta-se geralmente diluída com lactose ou outros diluentes. Solúvel em água, a enzima encontra-se incolor ou com coloração amarelada, pouco opalescente. É praticamente insolúvel em álcool, clorofórmio e éter (O'NEIL *et al.*, 2001; USP XXIX, 2006).

Por conta de sua propriedade proteolítica, a enzima tem aplicação em diversas áreas, como de alimentos, odontologia e cosmética. O foco deste trabalho, entretanto, foi na área farmacêutica, sobretudo como agente debridante de feridas e escaras na pele. A maior parte das aplicações clínicas da papaína de uso tópico objetiva o debridamento de feridas e queimaduras, acelerando, assim, o processo de cicatrização e regeneração tecidual (STARLEY *et al.*, 1999; ZULLI *et al.*, 2010; ESTEVAM *et al.*, 2012; SINGH & SINGH, 2012).

Pieper e Caliri (2003) estudaram sobre as formas de uso da papaína e do mamão em ferimentos em diversos países, sobretudo no Brasil, e 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% de papaína em tecidos necrosados e de 1 a 4% para favorecer a regeneração tecidual. Starley e colaboradores (1999) relataram o uso tópico de uma pasta

preparada com a polpa do mamão em pacientes com queimaduras na pele. Os ferimentos tratados durante algumas semanas tornaram-se adequados e preparados para receber um enxerto.

Recentemente, a FDA (*Food and Drug Administration*) divulgou nota com restrições aos produtos contendo papaína devido a reações de origem alérgica reportadas por pacientes submetidos a tratamentos com a enzima nos EUA, requerendo registro destes produtos e, desse modo, limitando os medicamentos disponíveis para o tratamento de tais condições (FDA, 2009). Contudo, estudo realizado por Lopes (2003) avaliou a eficácia e segurança *in vitro* utilizando-se cultura celular de queratinócitos humanos e os resultados mostraram que a papaína pode ser utilizada de forma segura e eficaz.

3.1.2 Albumina de soro bovino (BSA)

A albumina extraída de soro bovino - em inglês, *Bovine Serum Albumine* (BSA) - é amplamente utilizada como proteína modelo em sistemas de liberação de ativos farmacêuticos em membranas de hidrogel na área farmacêutica (SINANI *et al.*, 1988; KHOURY *et al.*, 2003; NADDAF *et al.*, 2010). É a proteína mais abundante no sangue bovino, apresentando estrutura similar à da Albumina de soro humano (HSA) - em inglês, *Human Serum Albumine* - apresentando 76% de sequências idênticas de aminoácidos.

Sua massa molar é de 67 kDa e seu ponto isoelétrico é igual a 4,8, cujo valor indica o pH no qual a molécula se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa (Figura 4) (EMERSON, 1989). A proteína é carregada negativamente no pH 7,0 e apresenta mudanças conformacionais no intervalo de pH 4 a 8. A proteína apresenta baixo número de triptofano e metionina, alto número de cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina (HIRAYAMA, 1990).

BSA é formada por uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e composta por três domínios. Em seu estado nativo, apresenta elevada solubilidade na faixa de pH 1,5 - 8,0 e sua estrutura secundária é formada de 60% α -hélice, 40% de estruturas β (folhas e giros β) com três domínios

específicos para ligação de íons metálicos, de lipídios e de nucleotídeos, respectivamente (EMERSON, 1989).

Figura 4. Modelo de preenchimento de espaço de molécula de BSA com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e os neutros em amarelo. (a) Vista frontal, (b) vista traseira, (c) do lado esquerdo e (d) lado direito (CARTER & HO, 1994).

Trata-se de uma proteína estável e seu coeficiente de difusão em solução é de $5,9 \cdot 10^{-11}$ a $6,4 \cdot 10^{-11}$ m²/segundo. Em hidrogéis de PAAM, cujo limite de exclusão de massa molar é até 70 kDa, a difusão de BSA está prevista para ser reduzida devido ao impedimento estérico dentro das cadeias reticuladas do polímero (PIAI *et al.*, 2008).

Geralmente a cinética de liberação de BSA em sistemas como o proposto no presente trabalho, apresenta dois tipos de comportamento: uma fase inicial de liberação rápida e uma segunda fase mais lenta, em que o tamanho da substância se torna o fator principal e as interações entre a proteína e o hidrogel tendem a dominar a taxa de liberação da substância pelo sistema (KHOURY *et al.*, 2003).

3.2 Polímeros

Polímeros são macromoléculas naturais ou sintéticas de elevada massa molar que resultam da repetição de monômeros. O reconhecimento da natureza química dos polímeros ocorreu em 1920, com estudos sobre borracha natural, amido e celulose. Descobriu-se que tais compostos consistiam de cadeias enormes de átomos de carbono, as quais eram unidas por ligações covalentes. Tais ligações são fundamentais para a estabilidade do polímero, já que quanto maior sua estabilidade, maior será a energia de ligação necessária para quebrá-la (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1994, SINKO, 2008).

Os átomos de carbono podem ligar-se uns aos outros por meio de cadeias longas unidas covalentemente, formando os polímeros lineares. Quando um monômero é polimerizado, forma-se um polímero.

As ligações químicas entre as cadeias do polímero é que classificam o polímero em linear, ramificado (tipo A, B e C) e reticulado, conforme pode ser observado na Figura 5.

Arquitetura da molécula	Designação do polímero	Definição
	Linear	Formado pelas ligações dos monômeros em um comprimento contínuo.
	Ramificado tipo A	Arquitetura tipo pente, com ramificações longas.
	Ramificado tipo B	Arquitetura tipo pente, com ramificações curtas.
	Ramificado tipo C	Estrutura dendrítica, na qual as ramificações também apresentam ramificações.
	Reticulado	Estruturas nas quais as cadeias poliméricas estão ligadas entre si, formando uma rede ou retículo.

Figura 5. Representação esquemática da classificação de um polímero quanto à natureza de suas ligações e sua estrutura (LUCAS *et al.*, 2001).

3.2.1 Poliacrilamida (PAAM)

A poliacrilamida (poli-2-propenamida) é formada por unidades de acrilamida (Figura 6), as quais a constituem em um polímero termosensível amplamente utilizado para síntese de hidrogéis (BURILLO & OGAWA, 1986; GUILHERME *et al.*, 2003; SANCHEZ-DÍAZ *et al.*, 2006; BARDAJEE *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010, CLOUTIER *et al.*, 2013). Sua massa molar é de $2,5 \cdot 10^7$ g/mol e propriedades como alto intumescimento característico e propriedades mecânicas bem definidas (WOFFORD & KOSKI, 1990) tornam interessante sua utilização como biomaterial.

Figura 6. Estrutura química da molécula de poliacrilamida (Fonte: MARCONATO & FRANCHETTI, 2002).

Por se tratar de um polímero altamente versátil, suas aplicações não se restringem somente a fins biomédicos. O polímero é utilizado para veiculação de agrotóxicos e outros compostos na indústria agrícola, em solos para agricultura como retenção de água em base arenosa, floculante para o tratamento de água potável, barreira contra infiltração de água subterrânea e também para fins petrolíferos (AZEVEDO *et al.*, 2002; AOUADA *et al.*, 2008; 2009).

Em relação às suas aplicações biomédicas e farmacêuticas, devido à alta viscosidade e elevado grau higroscópico, o polímero é utilizado em fraldas descartáveis e absorventes íntimos (MARCONATO & FRANCHETTI, 2002), além da utilização para fins bioquímicos, como os géis para eletroforese (WALKER & RAPLEY, 1999).

Os hidrogéis à base de poliacrilamida são encontrados amplamente na área de imobilização de enzimas e fármacos (SANCHEZ-DÍAZ *et al.*, 2006). Em veiculação de proteínas, suas características fundamentam-se não somente em suas propriedades não iônicas, que favorecem estabilidade dos valores de pH na matriz polimérica, mas também por permitirem que os produtos e substratos não se acumulem nem se percam na matriz, além de apresentarem biocompatibilidade, justificando seu potencial na obtenção de sistemas para a veiculação de enzimas e proteínas em membranas como a proposta neste trabalho (WOODWARD, 1985).

É importante ressaltar que o polímero em questão está suscetível a sofrer diversos processos degradativos, dependendo de sua natureza e sua rota de síntese. Essas reações degradativas estão relacionadas com impurezas presentes e condições que o polímero é exposto e, na maioria das vezes, as reações são

irreversíveis, trazendo como consequência a alteração das propriedades físico-químicas do polímero, o que pode gerar subprodutos tóxicos ao organismo, como alguns monômeros residuais (CAULFIELD *et al.*, 2002).

3.2.1.1 Interação da poliacrilamida com proteínas

Para fins bioquímicos, o uso de PAAM na forma de gel é bastante conhecido na identificação de proteínas utilizando a técnica de eletroforese, cujo fundamento se baseia no uso das cargas elétricas das biomoléculas (proteínas, DNA e RNA) para separar e analisar suas propriedades físico-químicas através do movimento de moléculas carregadas em um campo elétrico (WALKER & RAPLEY, 1999).

O gel de poliacrilamida é utilizado nessa técnica com o intuito de separar as proteínas, de acordo com a concentração do gel e a massa molar das proteínas em questão. A Tabela 1 traz a relação entre a concentração de acrilamida e o tamanho das proteínas que é capaz de separar.

Tabela 1. Relação entre a concentração de acrilamida e a faixa de separação das proteínas em kDa.

Concentração de acrilamida (%)	Faixa de separação – tamanho das proteínas (kDa)
5	57 - 212
7,5	36 - 94
10	16 - 68
15	12 - 43

(Fonte: WALKER & RAPLEY, 1999).

Nesse gel, acrilamida e bisacrilamida são polimerizadas na presença de radicais livres para gerarem géis de variados e controlados tamanhos de poros. A polimerização é catalisada por persulfato de amônio, originando radicais livres. A formação de radicais livres é catalisada por N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina (TEMED). Isto permite ao meio eletroforético ter um efeito direto na separação

eletroforética. Se o tamanho dos poros for aproximadamente igual ao das moléculas, moléculas pequenas se moverão livremente em um campo elétrico e moléculas maiores ficarão restritas na migração delas (ROBYT & WHITE, 1990).

3.3 Hidrogéis

Os hidrogéis são materiais formados por polímeros, caracterizados pela hidrofiliabilidade e insolubilidade em água. Em água, tais materiais intumescem até atingir o equilíbrio, preservando sua forma (PEPPAS, 1987). A hidrofiliabilidade ocorre devido à presença de grupos hidrofílicos como: -OH, -COOH, -CONH₂ (PEPPAS, 1993). Os hidrogéis depois de intumescidos dependem de alguns fatores para se degradarem e iniciarem a liberação do princípio ativo, tais como: pH, temperatura, pressão e campos elétricos (ALVAREZ-LORENZO & CONCHEIRO, 2002).

De acordo com Peppas (1987), os hidrogéis apresentam vantagens que os tornam muito interessantes em veículos para liberação de substâncias farmacêuticas, como: baixa toxicidade e capacidade de intumescer em água e fluidos biológicos; consistência elastomérica, o que minimiza o atrito entre tecidos e o hidrogel; alta permeabilidade, permitindo o fluxo de moléculas pelo hidrogel devido à alta porosidade; facilidade de obtenção em diferentes formas e, finalmente, incorporação e liberação controlada de fármacos de diferentes naturezas e características moleculares. Por todas essas funcionalidades, o uso de hidrogéis pode ser explorado em diversos aspectos na área científica, sobretudo na área da saúde.

3.3.1 Polímeros utilizados em hidrogéis

Os hidrogéis podem ser adaptados de acordo com a característica do polímero que o constitui. Além da PAAM, existem outros polímeros que são utilizados em hidrogéis.

No caso de monômeros destacam-se os que possuem carga neutra (hidroxialquilmetacrilatos, derivados da acrilamida, N-vinil pirrolidona, acrílicos

hidrofóbicos); os aniônicos (derivados do ácido acrílico) e os catiônicos (vinil piridina, derivados aminoetilmetacrilatos).

Em relação aos hidrogéis de origem sintética, destacam-se os derivados acrílicos, como a poliacrilamida (PAAM) (BURILLO & OGAWA, 1986; FERNANDEZ *et al.*, 2010; SANCHEZ-DÍAZ *et al.*, 2006), poli-n-isopoliacrilamida (PINPAAm) (MOURA *et al.*, 2009), o ácido metacrílico (MAA) (CHEN *et al.*, 2009) e o etilenoglicoldimetacrilato (EGDMA) (PEPPAS *et al.*, 2000).

3.3.2 Reticulação de hidrogéis

A reticulação dos polímeros para a formação de hidrogéis pode ser realizada de diferentes formas, as quais refletem em diferentes características e propriedades para o produto final e sua consequente aplicação. Uma delas consiste em envolver o polímero em um processo químico, através da reticulação química das cadeias poliméricas, conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Exemplo de uma rede polimérica formada em um hidrogel (Fonte: Adaptado de BRADLEY, 1984).

Como exemplo de substâncias químicas utilizadas como agente reticulante, pode-se citar a classe dos aldeídos, como formaldeído, acetaldeído e glutaraldeído. O emprego do glutaraldeído em específico e de outros de natureza similar, é inclusive alvo de patentes (BRYHAN *et al.*, 1998; MANDAL & PISANOVA, 2008); entretanto, apesar de conferir uma velocidade de reação extremamente alta, pode deixar resíduos tóxicos, caso não adequadamente removido, comprometendo a aplicação final do produto obtido.

Há também reticulações obtidas de interações físicas como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, formando os chamados hidrogéis físicos, que ao sofrerem um estímulo externo, como mudança de pH ou de temperatura, podem facilmente ter suas redes dissolvidas e perder a forma gelificada (SPERLING, 2001).

Outra técnica de reticulação envolve o emprego da radiação ionizante, a qual consiste em uma técnica que promove reticulação e esterilização simultâneas, apresentando a vantagem de ser realizada na embalagem final do produto. A reticulação das cadeias do polímero propicia a obtenção de materiais com melhores propriedades mecânicas e pode ser realizada utilizando agentes multifuncionais, que condensam as cadeias (ROSIK & OLEJNICZAK, 1993). Rosiak e colaboradores (1989) desenvolveram e patentearam o emprego e o conceito de reticulação e esterilização simultâneas de polímeros utilizando radiação ionizante, assegurando a segurança do produto final para aplicações biomédicas.

De acordo com Bradley (1984), no processo de reticulação, as cadeias poliméricas localizadas ao longo da molécula são modificadas quando expostas à radiação ionizante, causando reações químicas cujo efeito está diretamente ligado à alteração das características morfológicas do polímero.

Neste sentido, durante a irradiação do polímero, há a ocorrência de dois efeitos simultâneos: reticulação e cisão das cadeias poliméricas. A reticulação, desejável na formação do hidrogel, caracteriza-se pela formação de uma rede tridimensional insolúvel. Por outro lado, como consequência da modificação estrutural do polímero irradiado, observa-se uma alteração de suas características morfológicas, como perda da cristalinidade e alteração da cor, caracterizando a cisão das cadeias (BRADLEY, 1984).

Dependendo das condições de irradiação e da estrutura química do polímero, pode haver a tendência de reticulação ou de cisão das cadeias (sobretudo de sua cadeia principal). Na Tabela 2 é apresentada a classificação de alguns polímeros quanto à tendência de sofrer reticulação ou cisão. É importante ressaltar que os produtos resultantes de uma reação degradativa são dois: reticulação e cisão.

Portanto, o polímero, quando em contato com a radiação ionizante, sempre estará sofrendo reações degradativas. O que se espera, contudo, é que a degradação seja prevalecida na forma de reticulação das cadeias poliméricas. Conforme pode ser observado na Tabela 2, se a unidade monomérica possui mais que um grupo substituído, há predomínio do fenômeno de cisão das cadeias (BRADLEY, 1984).

Tabela 2. Efeitos da radiação: reticulação ou cisão das cadeias poliméricas.

Fenômeno de reticulação	Fenômeno de cisão
Poliétileno	Poliisobutileno e co-polímeros
Poliestireno	Polimetilestireno
Poliacrilatos	Polimetilacrilatos
Poliacrilamida	Polimetilacrilamida
Polivinilcloridrato	Polivinildieno cloridrato
Poliamidas	Politetrafluoretileno
Poliéster	Politrifluorcloroetileno
Polisiloxanos	Polipropileno
Polivinil álcool	Polibuteno

(Fonte: Adaptado de BRADLEY, 1984).

3.3.3 Nanoestruturação de hidrogéis

O controle de fatores como densidade de reticulação, quantidade de agente de reticulação e balanço hidrofílico-hidrofóbico possibilita adequar propriedades mecânicas e estruturais, o que permite uma veiculação adequada de substâncias nas membranas poliméricas (WOODWARD, 1985; PACIOS *et al.*, 2006), de acordo com a especificidade e a particularidade de cada composto, ou a aplicabilidade desejada, assegurando uma melhora na estabilidade do produto final.

A caracterização estrutural de hidrogéis pode ser realizada por meio de análise da densidade de reticulação, cujo resultado traz informações sobre a estrutura física do material. Tal análise é frequentemente realizada a partir de ensaios de propriedades mecânicas e térmicas (CAYKARA *et al.*, 2006) e de

intumescimento (FLORY, 1953), o que fornece dados específicos importantes sobre a rede polimérica formada, bem como o tamanho de poros da membrana, o que permite analisar possível capacidade de liberação de substâncias incorporadas na matriz polimérica (ZHAO *et al.*, 2010).

3.4 Radiação Ionizante

A escolha de uma fonte de radiação depende da natureza, do tipo e da estrutura do material a ser irradiado. Materiais como polímeros que na maioria das vezes se apresentam em estado sólido, geralmente necessitam de uma radiação mais penetrante, como a radiação gama ou o feixe de elétrons. As radiações menos penetrantes, porém, como alfa (α), beta (β) ou elétrons de baixa energia, podem ser usadas com a finalidade de irradiar uma camada superficial da amostra (HARVEY, 1976; KRANE, 1987).

As fontes de radiação ionizante mais utilizadas correspondem a fonte de ^{60}Co , que utiliza radiação gama e os aceleradores de elétrons, que por sua vez, utilizam feixes de elétrons acelerados (SPINKS & WOODS, 1990).

A radiação gama é uma onda eletromagnética de alta energia (fótons de alta energia) de origem nuclear, sem carga e sem massa. Seus comprimentos de onda encontram-se na região entre $3 \cdot 10^{-9}$ cm a $3 \cdot 10^{-11}$ cm (REICHMANIS & O'DONNELL, 1989).

Os raios gama são emitidos dos núcleos radioativos com energias bem definidas, correspondentes à diferença entre os níveis de energia de transição do núcleo. A transição pode ocorrer entre dois níveis excitados ou entre um nível excitado e o nível fundamental (estado de mínima energia). Desse modo, pode haver emissão de um ou mais raios gama em cada desintegração. A energia dos raios gama emitidos pelos diferentes nuclídeos está na faixa de aproximadamente 0,03 a 3 MeV. O ^{60}Co , por exemplo, fornece fótons de energia igual a 1,173 e 1,332 MeV (SPINKS & WOODS, 1990).

Os raios gama, diferentemente dos raios alfa (α) e beta (β), tendem a perder a maior parte de energia dos seus fótons por meio de interações únicas. Isso significa que, enquanto as partículas alfa e os elétrons são barrados por absorvedores finos, uma fração dos fótons gama, em uma mesma situação, são completamente absorvidos, mas o restante é transmitido com sua energia inicial total (SPINKS & WOODS, 1990).

3.4.1 Uso da radiação ionizante para síntese de hidrogéis

A aplicação da técnica da radiação ionizante para induzir reticulação e modificar as propriedades dos polímeros é uma ferramenta de fundamental importância, uma vez que contribui para criação de novas tecnologias.

A radiação é conhecida no processamento de polímeros por promover a reticulação de polímeros e elastômeros em larga escala, bem como promover a cisão molecular para modificar as características reológicas, e a reciclagem e/ou recuperação de valores (ROSIK & ULANSKI, 1999; LUGÃO *et al.*, 2007).

Dentre suas principais vantagens, destaca-se a reticulação radio-induzida, tendo em vista propriedades como processamento sem necessidade de iniciadores ou coagentes e a possibilidade de realização do processo independentemente da temperatura. Tais características constituem uma ferramenta capaz de modificar e controlar a estrutura molecular sem a utilização de reagentes tóxicos e, portanto, de grande relevância para o setor biomédico, farmacêutico, cosmético e biotecnológico.

A radiação de alta energia sobre o polímero induz a ionização e excitação da molécula do polímero devido à absorção de parte da energia irradiada. 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 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 das ligações e dos grupos químicos sensíveis às reações induzidas por radiação são: C=C, -COOH, C-C, C-H, C-O, C-N, -SO₂⁻, NH₂. Os grupos aromáticos, ao contrário, são pouco sensíveis (REICHMANIS & O'DONNELL, 1989).

3.4.2 Radiólise da água

Em polímeros solúveis em água, como PAAM, o uso da radiação ionizante como agente reticulante origina espécies reativas intermediárias que são responsáveis pela reticulação das macromoléculas e formação dos hidrogéis. Este fato pode ser resultado direto da ação da radiação na cadeia polimérica. Porém, existe também o efeito indireto da radiação causado pela ação do radical hidróxido, OH[•], gerado pela radiólise da água (BRADLEY, 1984).

A água é considerada a substância com maior probabilidade de interagir com a radiação ionizante. A interação da radiação com as moléculas de água produz os chamados produtos primários da radiólise da água cujos componentes são extremamente reativos: as espécies reativas primárias (OH[•], H⁺ elétron aquoso) e os produtos moleculares (H₂ e H₂O₂), representados pela EQ. 1.

A Figura 8 representa a interação dos produtos primários da radiólise da água com as cadeias poliméricas.

Figura 8. Representação dos efeitos diretos e indiretos do uso da radiação ionizante no processo de reticulação polimérica.

3.5 Sistemas de liberação de fármacos

Diversos princípios ativos vêm sendo estudados visando a pele como via de escolha para sua administração, como é o caso das proteínas utilizadas neste trabalho. De acordo com Sinko (2008), há diversos sistemas de liberação de ativos na epiderme que maximizam o tempo de permanência na pele e minimizam a absorção transdérmica, apresentando um importante papel no sucesso da terapia tópica local.

As características de um sistema de liberação prolongada devem estar relacionadas à ausência de toxicidade para a pele e à fácil manipulação de substâncias para uso tópico. Em geral, também devem possuir propriedade de proteger ativos sensíveis da oxidação e interação com outros componentes da fórmula (ROSEN, 2005).

A fim de propiciar uma liberação controlada de determinada substância, a matriz polimérica precisa ter condições físicas e químicas para efetivamente controlar sua liberação para o meio. A forma como a substância será liberada para o meio depende de processos de difusão, intumescimento e degradação desta matriz. Assim, o conhecimento desses parâmetros é fundamental para uma aplicação adequada do produto final.

Basicamente, há quatro principais mecanismos de liberação de fármacos ou ativos a partir de um sistema de liberação: difusão, intumescimento seguido de difusão, degradação e efluxo ativo. Qualquer um desses mecanismos pode ocorrer em um dado sistema de liberação (SINKO, 2008).

A difusão se caracteriza por dispositivos monolíticos ou controlados por membrana e ocorre quando o fármaco ou agente ativo passa através desse dispositivo. Pode ocorrer em escala macroscópica através dos poros de uma matriz de liberação, ou em nível molecular, através da passagem entre as moléculas da matriz. Um polímero e um ativo podem ser misturados para formar um sistema homogêneo, também chamado de sistema matricial. À medida que a liberação ocorre, sua velocidade diminui, pois o ativo passa a ter uma distância cada vez maior a percorrer, requerendo, assim, um tempo de difusão maior para ser liberado (SINKO, 2008).

Um exemplo claro deste tipo de sistema é o ativo ou o fármaco circundado por uma matriz polimérica. Nesse caso, a membrana é uma estrutura que limita, dificulta ou facilita a liberação do fármaco do reservatório (SINKO, 2008).

Já os sistemas de liberação controlada por intumescimento, quando entram em contato com algum fluido, absorvem água ou outros fluidos orgânicos e intumescem (Figura 9).

Figura 9. Sistema de liberação controlada através de intumescimento (Fonte: LANGER & PEPPAS, 1981).

O intumescimento aumenta o conteúdo do solvente aquoso na formulação, bem como o tamanho da estrutura da rede polimérica, permitindo que o fármaco ou o ativo se difunda para o meio externo. Os maiores exemplos deste sistema são justamente as membranas de hidrogel, pois os polímeros intumescem, mas não se dissolvem quando colocados em contato com água ou outros fluidos biológicos. A Tabela 3 traz uma lista de hidrogéis sensíveis ao ambiente, utilizados para liberação de fármacos na forma de hidrogel, alvo deste estudo.

O sistema biodegradável corresponde a sistemas em que o material se degrada dentro do corpo, como resultado de processos biológicos naturais, eliminando a necessidade de remoção do sistema de liberação de fármaco após a completa eliminação do ativo.

Já os sistemas de efluxo ativo se caracterizam por possuírem uma camada líquida de fármaco, um agente osmótico e um revestimento de membrana semipermeável. São sistemas que tipicamente agem no sistema gastrointestinal (GI). No trato GI, a água passa através da membrana semipermeável do sistema, expandindo o agente osmótico. Este, por sua vez, pressiona a camada de fármaco, liberando-o no trato GI através do orifício de liberação. A duração e a velocidade de liberação do fármaco são controladas pela composição da membrana (SINKO, 2008).

Tabela 3. Hidrogéis sensíveis ao ambiente, utilizados para liberação de fármacos.

Estímulo	Hidrogel	Mecanismo
pH	Hidrogel ácido ou básico	Alteração de pH, intumescimento, liberação de fármaco
Força iônica	Hidrogel iônico	Alteração na força iônica, alteração na concentração de íons, alteração no intumescimento e liberação do fármaco
Substâncias químicas	Hidrogel contendo grupos aceptores de elétrons	Compostos doadores de elétrons, formação de complexos de transferência de cargas, alteração no intumescimento e liberação do fármaco
Substrato enzimático	Hidrogel contendo enzimas imobilizadas	Presença de substrato, conversão enzimática, produtos que alteram o intumescimento, liberação do fármaco
Magnético	Partículas magnéticas dispersas em microesferas de alginato	Aplicação de campo elétrico, alteração na porosidade do hidrogel, alteração no intumescimento e liberação do fármaco
Térmico	Hidrogel termo-responsivo, poli(n-isopropilacrilamida)	Alteração na temperatura, alteração nas interações polímero-polímero e água-polímero, alteração no intumescimento e liberação do fármaco
Elétrico	Hidrogel polieletrólito	Aplicação de campo elétrico, membrana carregada, eletroforese do fármaco com carga, alteração no intumescimento, liberação do fármaco
Irradiação ultra-sônica	Hidrogel de álcool etilvinílico	Irradiação de ultra-som, aumento de temperatura, liberação do fármaco

(Fonte: SINKO, 2008, baseado em LANGER & PEPPAS, 1981).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Poliacrilamida aniônica (PAAM), Massa molar: $2,5 \cdot 10^7$ g/mol, Grau de hidrólise 70%, Nome comercial: Aguapol 125 marca Produquímica
- Albumina de soro bovino (BSA), grau de pureza analítico, Sigma Aldrich
- Papaína 30.000 USP/mg, grau de pureza analítico, Merck
- Cloridrato de benzoil DL-arginina *p*-nitroanilida, grau de pureza analítico, Sigma Aldrich
- Cloridrato de L-cisteína monohidratado, grau de pureza analítico, Synth
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado, grau de pureza analítico, Synth
- Etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA), grau de pureza analítico, Synth
- Dimetilsulfóxido (DMSO), grau de pureza analítico, Synth
- Ácido acético P.A. 100%, Synth
- Ácido clorídrico 37%, P.A, Synth
- Hidróxido de sódio P.A. 100%, Synth
- Cloreto de sódio P.A. 100%, Synth
- Cloreto de cálcio P.A. 100%, Synth
- Cloreto de potássio, P.A. 100%, Synth
- Polietilenoglicol (PEG) 4000, Synth
- Água de Osmose Reversa

4.2 Equipamentos

- Banho termostatzado marca Quimis, modelo Q-226N1
- Calorímetro marca Mettler Toledo, modelo DSC 822e
- Estufa incubadora de CO₂ marca Fanema, modelo Orion 520
- Espectrofotômetro marca Hitachi, modelo Cary 1E
- Espectrofotômetro de microplacas marca Thermo Scientific, modelo Multiskan EX Microplate (Leitor de Elisa)
- Extrator *Soxhlet*
- Homogeneizador marca Fisatom, modelo 723
- Incubadora tipo Shaker marca Tecnal, modelo TE-420
- Irradiador *Gammacell* fonte ⁶⁰Co, localizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN
- Liofilizador marca FTS Systems, modelo Dura Stop – TDS 3 Dura Dry, localizado no Centro de Biotecnologia (CB) do IPEN
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de bancada Table Top, modelo TM 3000, localizado no Laboratório de Microscopia do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais (CCTM) do IPEN
- pHmetro marca Mettler Toledo, modelo DL 15 Tritator

4.3 Síntese da membrana de PAAM

PAAM (na forma de pó) foi solubilizada em água Osmose Reversa utilizando um homogeneizador mecânico a 379 *rpm* por 4 horas (concentração final da solução = 1% PAAM), conforme mostra a Figura 10. A solução foi resfriada por 12 horas na temperatura de 2-8 °C (± 2 °C) e em seguida, congelada na temperatura de -20 °C (± 2 °C) por 12 horas. Na sequência, a solução foi colocada em recipientes de vidro e submetida ao processo de liofilização.

Vale ressaltar que tal metodologia foi a única capaz de promover homogeneização total da solução, dentre as demais alternativas testadas neste trabalho. As tentativas basearam-se na variação da concentração do polímero e no

período de agitação. Tendo em vista o alto grau de viscosidade e a alta capacidade de intumescimento do material (perceptível na Figura 10), os ensaios foram limitados, uma vez que soluções acima de 1% PAAM apresentaram-se extremamente viscosas, indicando que em concentrações superiores, o processo se tornaria inviável, restringindo assim, o emprego de tais métodos.

(a)

(b)

Figura 10. As figuras (a) e (b) representam a solubilização do polímero em água em homogeneizador mecânico a 379 rpm.

A amostra liofilizada (concentração final = 100% PAAM) foi fragmentada em diferentes e conhecidos tamanhos e massas e, em seguida, hidratada com volumes distintos e também conhecidos de água Osmose Reversa, a fim de estabelecer diferentes concentrações do polímero. Também foi adicionado PEG na concentração de 1,5% em todas as formulações, por suas propriedades plastificantes.

As concentrações viáveis estabelecidas de polímero após diversas tentativas de obtenção de concentrações menores e maiores, foram as seguintes: 4, 5, 6, e 10% (p/p). As amostras então foram mantidas congeladas na temperatura

de -20 °C (± 2 °C) por 24 horas e finalmente expostas ao processo de irradiação. As membranas obtidas neste processo corresponderam às membranas controle.

4.4 Preparo da solução de papaína e da solução de BSA

O preparo das soluções de proteínas foi realizado com base nas concentrações usuais de cada substância. Desta forma, a concentração selecionada para papaína correspondeu a 0,2% (p/v), considerando a aplicação da proteína para feridas e escaras na pele na faixa de concentração de 0.2-2% (LOPES *et al.*, 2008), podendo ser estendida até 10% em casos onde se necessita debridamento muito intenso. BSA, por outro lado, sendo aplicada como carreadora de fármaco, necessita de uma quantidade maior, deste modo, a concentração selecionada correspondeu a 1% (p/v). Ambas as proteínas foram diluídas em solução tampão fosfato 50 mM.

4.5 Incorporação das proteínas na membrana

O mesmo procedimento descrito no Item 4.3 *Síntese da membrana de PAAM* foi adotado para incorporação de cada proteína separadamente (papaína e BSA), utilizando volumes conhecidos das soluções previamente preparadas de modo a atingir as mesmas concentrações de polímero obtidas para as amostras controle: 4, 5, 6 e 10% PAAM.

Tais soluções foram individualmente incorporadas ao polímero liofilizado, fragmentado em diferentes e conhecidos tamanhos e massas. Todas as amostras foram mantidas congeladas na temperatura de -20 °C (± 2 °C) por 24 horas e então expostas ao processo de irradiação.

4.6 Processo de irradiação das amostras

A irradiação se define como o contato de um corpo ou objeto com a radiação (CNEN, 2010). O radioisótopo cobalto-60, originado a partir do cobalto-59, é um isótopo instável, formado pela reação de captura de um nêutron. É muito utilizado como fonte de radiação gama, devido sua longa meia-vida de 5,27 anos.

O irradiador *Gammacell* 220 (Figura 11) está localizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN, operando a 220 V (volts), com 3 fases, 60 hertz (Hz), fonte de 15 ampéres (A). É composto por 35 lápis tubulares, contendo sete fios de ^{60}Co cada, de 20 cm de altura, completamente vedados por soldagem, que contornam internamente a câmara primária totalmente isolada (ATOMIC ENERGY OF CANADA LIMITED, 1968).

As membranas de hidrogel foram obtidas através da irradiação do material com raios gama no irradiador *Gammacell* (Figura 11) até atingir dose de 25 kGy, dose capaz de esterilizar materiais (ISO 13409, 1996). A taxa de dose correspondeu a 1,2 kGy/h. As amostras foram mantidas congeladas durante toda a exposição aos raios gama através do uso de gelo seco.

Figura 11. A figura (a) representa o irradiador de Cobalto-60 *Gammacell* 220 do Centro de Tecnologia das Radiações CTR do IPEN. A figura (b) representa, em aumento, a câmara de irradiação onde as amostras são acondicionadas (SUFI, 2013).

4.7 Caracterização da membrana de PAAM

4.7.1 Ensaio de Intumescimento

Amostras contendo 0,3 g de cada membrana foram secas em estufa, na temperatura de 50 °C até atingirem peso constante. Após secagem, cada amostra foi imersa em bquer contendo soluo tampo salina (NaCl 0,9%) pH 6,0. O peso das amostras foi mensurado em intervalos regulares, at atingir valor constante (aproximadamente 4 horas). O teste foi realizado em triplicata.

O grau de intumescimento foi calculado conforme EQ. 2, em que I = Valor de Intumescimento (%), m_i = massa inicial da amostra seca e m_f = massa da amostra intumescida.

$$I(\%) = (m_f - m_i) / m_i \cdot 100 \quad (2)$$

4.7.2 Ensaio de Frao gel

A frao gel consiste em um ensaio utilizado para determinar o grau de reticulao de polmeros. Tal frao determinada aps remoo da frao solvel, obtendo-se, assim, a frao gelificada. A medida da frao gel em membranas contendo polmeros de massa molar muito elevada tende a ser dificultada pelas tcnicas usuais de caracterizao. Por isso, foram testadas duas diferentes tcnicas de determinao a fim de se obter a mais adequada para PAAM.

A primeira tcnica consistiu em amostras de 0,3 g que foram secas em estufa na temperatura de 50 °C por 48 horas. Aps a secagem, cada amostra foi colocada dentro de uma pequena rede constituda de tecido *non-woven* (TNT – tecido no tecido), a fim de garantir que a amostra no escapasse do sistema e, em seguida, imersa em bquer contendo soluo tampo salina (0,9% NaCl) como solvente. As amostras foram mantidas em incubadora tipo Shaker na temperatura de 25 °C e deixadas por 5 dias para a remoo da frao solvel. A soluo salina foi trocada diariamente durante o experimento e, decorridos os 5 dias, as amostras foram secas em estufa a 50 °C at atingirem massa constante.

A outra técnica realizada consistiu em utilizar temperaturas altas (solvente em ebulição) em menor tempo durante a remoção da fração solúvel. Amostras de 0,3 g foram secas em estufa na temperatura de 50 °C por 48 horas. Após a secagem, cada amostra foi colocada dentro de uma pequena rede constituída de tecido *non-woven* (TNT – tecido não tecido), a fim de garantir que a amostra não escapasse do sistema, e em seguida, colocada em extrator *Soxhlet* por 6 horas, no qual o solvente (solução salina - 0,9% NaCl) evapora e condensa sobre o material, promovendo a extração da fração solúvel (Figura 12). As amostras foram, em seguida, secas em estufa a 50 °C até atingirem massa constante.

Nas duas técnicas, os testes foram realizados em triplicata e as massas iniciais e finais das amostras foram comparadas.

Os resultados de fração gel foram quantificados utilizando EQ. 3 e EQ. 4, em que F_S = fração solúvel, F_G = fração gel, m_i = massa inicial da amostra seca e m_f = massa final da amostra após a segunda secagem.

$$F_S (\%) = (m_f - m_i / m_i) \cdot 100 \quad (3)$$

$$F_G (\%) = 100 - F_S \quad (4)$$

Figura 12. Extrator *Soxhlet* utilizado em uma das técnicas de Fração Gel.

4.7.3 Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Amostras das membranas poliméricas com cerca de 0,1 g foram previamente secas em estufa na temperatura de 25 °C e então acondicionadas em frasco fechado a vácuo até o momento do tratamento para a realização desta análise. A análise foi realizada em triplicata. Antes da visualização de suas superfícies, as amostras foram fixadas em um suporte recobertas com ouro.

Após este processo, as amostras foram fixadas em suporte condutor e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

4.7.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Análises térmicas como DSC são frequentemente utilizadas para descrever o comportamento de uma amostra em função da temperatura. Este tipo de análise é capaz de revelar transições térmicas, processo de degradação e também é possível obter dados de estudos relacionados à estabilidade térmica.

As amostras das membranas poliméricas foram previamente secas em liofilizador e então acondicionadas em frasco fechado a vácuo até o momento da realização desta análise. Amostras em triplicata contendo massa de aproximadamente 10 mg foram aquecidas no calorímetro na temperatura de 25 °C a 300 °C, com taxa de aquecimento igual a 10 °C / minuto em atmosfera de N₂ (50 ml N₂/minuto).

4.7.5 Determinação da densidade de reticulação

Os dados experimentais dos valores de densidade de reticulação foram determinados com base na massa das membranas antes e após o ensaio de intumescimento, conforme é descrito em Flory (1953).

Aplicando-se a Equação de Flory (EQ. 5), obtém-se o valor q correspondente à densidade de reticulação em mol/cm³.

$$q = \frac{[\ln(1-\chi) + \chi + \mu \cdot \chi^2 + p \cdot v] \cdot m}{Mc \cdot (\chi^{1/3} - 0,5\chi)} \quad (5)$$

O parâmetro χ da equação corresponde à fração do volume molar do polímero medido através do hidrogel intumescido, p corresponde à densidade do polímero, v ao volume molar do solvente, m ao volume molar das unidades monoméricas na cadeia e Mc à média de massa molar entre as cadeias reticuladas do polímero. O parâmetro μ corresponde ao valor de interação entre polímero e solvente (MARK, 1999).

Para obter o valor de χ , cuja medida é adimensional, correspondendo à fração do volume molar do polímero mensurado através do hidrogel intumescido, deve-se aplicar primeiramente duas equações descritas a seguir (EQ. 6 e EQ. 7).

$$I = \frac{(m_f - m_i) \cdot d_p}{m_i \cdot d_s} \quad (6)$$

$$\chi = 1 / (1 + I) \quad (7)$$

O valor I corresponde à razão de intumescimento (EQ. 6), onde m_i corresponde à massa do hidrogel inicial, m_f à massa do hidrogel intumescido, d_p à densidade do polímero e d_s à densidade do solvente utilizado no ensaio de intumescimento, neste caso, solução tampão salina (NaCl 0,9%).

4.7.6 Determinação do Ponto de carga zero (pH_{zpc})

A determinação do ponto de carga zero é um dado de fundamental importância neste trabalho, pois se relaciona ao grau de ionização das moléculas presentes no material. A intensidade desse efeito pode ser maior ou menor conforme a substância estudada, uma vez que as cargas da superfície da substância (no caso, do polímero) dependem da sua composição e das características da superfície do material (APPEL *et al.*, 2003; AI *et al.*, 2011).

Para a determinação do ponto de carga zero, foi utilizado o método adaptado de Ai e colaboradores (2011) e de Estevam e colaboradores (2012). Amostras contendo 0,12 g de cada membrana - membranas controle contendo 4%, 5%, 6% e 10% PAAM - foram colocadas individualmente em 50 ml de solução de KCl 0,1 M. O pH de cada amostra foi ajustado para valores que variaram de 2,0 a 12,0, com objetivo de manter a força iônica constante, utilizando para isto soluções de HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M.

O teste foi realizado em triplicata e as soluções permaneceram em incubadora na temperatura de 25 °C e velocidade de agitação igual a 60 *rpm* por 48 horas. Após este intervalo de tempo foram mensurados os valores de pH de cada amostra, conforme é mostrado na Figura 13.

(a)

(b)

Figura 13. Imagem representativa do ensaio de pH_{zpc} . A figura (a) representa as amostras contendo diferentes valores de pH em incubadora tipo Shaker; a figura (b) representa os valores de pH sendo mensurados através de um pHmêtro.

Para cada amostra, foi construída uma curva em Excel (Microsoft Office® Modelo 2010) da diferença entre os valores de pH inicial e final ($\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{inicial}} - \text{pH}_{\text{final}}$) e o valor de pH inicial de cada amostra. O ponto de intersecção com a abscissa da curva resultante, cujo $\Delta\text{pH} = 0$, indicou o valor de pH_{zpc} de cada membrana.

4.7.7 Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMC) - *Fluid Handling Capacity (FHC)*

A Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) - em inglês, *Fluid Handling Capacity (FHC)* - é uma determinação cujo objetivo consiste em simular a capacidade de permeabilidade da membrana em relação ao exsudato de um ferimento, cuja origem pode ser de uma ferida ou de uma queimadura na pele, supondo o uso desta membrana de hidrogel como curativo sobre um ferimento na pele. O método utilizado foi adaptado da norma europeia BS EN 13726-1 para hidrocolóides e curativos (BS EN, 2002; THOMAS, 2007). Tal teste prevê a utilização de um sistema de aço chamado “Copo de Paddington”, conforme mostra Figura 14 (a), que foi adaptado para este trabalho a um sistema de PVC, conforme mostra Figura 14 (b), simulando o aparato utilizado no teste original (ESTEVAM *et al.*, 2012).

As amostras correspondentes às membranas 5% PAAM - sendo membrana controle, membrana contendo papaína e membrana contendo BSA - foram devidamente pesadas e colocadas entre as partes do sistema, com 20 ml de uma solução cuja composição consistia em NaCl 142 mM e CaCl_2 2,5 mM e simulava o exsudato liberado por um ferimento.

O sistema, representado pela Figura 14 (b) consiste em três partes: a primeira delas constitui o local onde a solução é colocada; esta parte possui um anel de vedação que aprisiona a membrana quando é colocada em contato (Figura 14 d). Logo após, há outras duas partes, cuja finalidade é manter a membrana fixa no sistema. A Figura 14 (c) exemplifica cada parte do sistema.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 14. Aparato utilizado para determinar a Capacidade de Movimentação de Fluidos: (a) copo de Paddington; (b) sistema de PVC - copo de Paddington modificado; (c) detalhe do sistema de PVC desmontado e (d) base do sistema de PVC com anel de vedação.

Os sistemas e as membranas (medida aproximada das membranas = 3,5 cm de diâmetro) foram devidamente pesados e colocados em estufa incubadora de CO_2 na temperatura de 37 °C, e se mantiveram dentro de um dessecador com sílica, com o objetivo de manter a umidade dos sistemas abaixo de 20%. Depois de 24 horas, os sistemas foram removidos da estufa e, após 30 minutos (tempo para estabilizar a temperatura), as membranas e seus sistemas foram pesados novamente. O teste foi realizado em triplicata.

Os valores foram calculados conforme as equações a seguir:

$$TTV = x - y / \text{tempo} \times \text{área de superfície} \quad (8)$$

$$ABS = b - a / \text{tempo} \times \text{área de superfície} \quad (9)$$

$$CMF = TTV + ABS \quad (10)$$

TTV corresponde ao valor da Taxa de Transmissão de Vapor da solução (em inglês, *Moisture Vapour Transmition Rate* - MVTR); *x* ao peso completo do sistema (membrana + solução + sistema de PVC) no início do teste; *y* ao peso completo do sistema (membrana + solução + sistema de PVC) no final do teste após 24 horas (EQ. 8); *ABS* corresponde à Capacidade de Absorção (em inglês, *Absorbency*); *b* ao peso da membrana no início do teste; *a* ao peso da membrana no final do teste, após 24 horas (EQ. 9). *CMF* corresponde finalmente ao valor da capacidade de movimentação dos fluidos (em inglês, *Fluid Handling Capacity* - FHC) (EQ. 10).

4.8 Ensaios de liberação *in vitro* das proteínas

Para o estudo de liberação *in vitro* das proteínas pela membrana, os ensaios consistiram na imersão de uma amostra de 0,3 g de cada membrana contendo proteínas em solução tampão salina (0,9% NaCl) pH 6,0. O teste foi realizado na temperatura de 25° C, em um béquer contendo 25 ml de solução salina, com alíquotas de 2 ml sendo coletadas em função do tempo, com reposição deste meio. Em seguida, as amostras foram caracterizadas de acordo com conteúdo protéico para ambas as proteínas e atividade enzimática para papaína.

O teste foi realizado em triplicata e todas as concentrações de PAAM de membranas contendo proteínas foram submetidas a este ensaio, incluindo as amostras sem proteínas, correspondendo ao controle do teste.

4.8.1 Conteúdo protéico

As alíquotas coletadas em função do tempo foram analisadas por espectrometria UV–visível na faixa de 280 nm. Durante todo o ensaio, as amostras foram mantidas em incubadora tipo Shaker, na temperatura de 25 °C e velocidade de agitação igual a 80 *rpm*.

4.8.2 Análise da atividade enzimática

O ensaio para doseamento da atividade enzimática foi realizado em microplacas de 96 poços, através da quantificação de papaína liberada em função do tempo, utilizando o substrato específico cloridrato de benzoil DL-arginina *p*-nitroanilida (BAPA) a 40° C em tampão fosfato 50 mM com cisteína pH 6,0.

O substrato, ao sofrer uma hidrólise tripla, libera *p*-nitroanilina, um composto amarelo que pode ser estimado colorimetricamente utilizando-se para isto espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 405 nm, sendo, portanto, útil e sensível em determinações da atividade da papaína (ERLANGER *et al.*, 1961).

O ensaio consiste em verificar a quantidade de *p*-nitroanilina formada em função do tempo de reação, através de uma curva padrão, com concentrações definidas, obtendo-se assim a cinética da reação.

- **Solução tampão fosfato de cisteína e EDTA 50 mM**

Dissolveu-se 6,7 g de fosfato dibásico heptahidratado em 500 ml de água Osmose Reversa. Adicionaram-se 7,0 g de EDTA e 3,05 g de cloridrato de L-cisteína. O valor de pH foi ajustado para 6,0 usando solução de HCl 0,1M ou NaOH 0,1M.

- **Solução de ácido acético 30% v/v**

Transferiu-se 30 ml de ácido acético para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água Osmose Reversa.

- **Solução do substrato benzoil DL-arginina p -nitroanilida (BAPA)**

Pesaram-se 43,5 mg do substrato e dissolveram-se em 1 ml de DMSO. No momento do doseamento, transferiram-se 400 μ l desta solução para um balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com solução tampão 50mM fosfato de cisteína e EDTA. No momento do doseamento, os poços da microplaca foram preenchidos com as seguintes soluções, nesta sequência:

- 50 μ l de solução de ácido acético a 30% nos poços da primeira linha de cada diluição, a fim de impedir o início da reação (tempo=0);
- 120 μ l de solução do substrato DL-arginina p -nitroanilida (BAPA);
- 100 μ l da solução correspondente ao ensaio de liberação de cada amostra de membrana de PAAM contendo papaína;
- 50 μ l de solução de ácido acético 30% nos poços das linhas subseqüentes, a cada intervalo de 15 minutos, a fim de interromper a reação, ou seja, nos tempos 15, 30 e 45 minutos.

Durante a montagem do experimento, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo e revestidas com papel alumínio para proteção de luz. No momento da reação, a microplaca foi colocada em banho termostatizado na temperatura de 40 °C. Os resultados foram mensurados utilizando espectrofotômetro de microplacas (Leitor de Elisa).

Figura 15. Representação da montagem do teste utilizando microplacas de 96 poços para doseamento da atividade enzimática da papaína.

4.9 Ensaio de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se células de fibroblastos BALB/c 3T3 (ATCC – American Type Culture Cell – código: CCL 163). Os fibroblastos foram mantidos em estufa incubadora úmida com atmosfera controlada a 37 °C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂, sendo cultivados em garrafas de 175 cm² com meio D10 – DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO nº 11965-092), contendo 10% Donor Bovine Serum (v/v) (GIBCO nº 11765-054), suplementados com: L-glutamina (4 mM/L) (GIBCO nº 25030-122), penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (100 µg/ ml) (GIBCO nº 15140-122) e anfotericina (0,25 µg/ ml) (GIBCO nº 10452-075).

Após atingirem sub-confluência de 70-80%, as células sofreram ação enzimática da tripsina a 0,05%/ EDTA 0,02% (p/v) (SIGMA nº T 4799/ E6758), e posteriormente sub-cultivadas nos 60 poços centrais da placa de 96 poços em densidade celular ($1,3 \times 10^4$ células/ poço).

Com o intuito de se quantificar a viabilidade e proliferação celular, após a exposição de 24 horas, foi aplicado o método colorimétrico vital (atóxico) MTS (PROMEGA CORPORATION, cat. Cell Titer 96® - Ensaio Aquoso não radioativo de proliferação celular) e a coloração resultante foi analisada em espectrofotômetro de microplacas (Leitor de Elisa) utilizando comprimento de onda de 490 nm.

Conforme pode ser observado na Figura 16, foram realizadas 8 diluições de concentração de 100 a 0,78% das seguintes amostras:

- Membrana 4% PAAM (controle)
- Membrana 5% PAAM (controle)
- Membrana 4% PAAM contendo papaína
- Membrana 5% PAAM contendo BSA

As membranas foram mantidas em meio extrator por 72 horas. As concentrações C1 a C8 corresponderam às diluições seriadas do líquido extrator e o meio de cultura: C1= 0,78% do volume líquido extrator contendo as amostras; C2= 1,56%; C3= 3,125%; C4= 6,25%; C5= 12,5%; C6= 25%; C7= 50%; C8= 100%.

Para o controle das proteínas, foram pesados 0,008 g de papaína (correspondente a 0,2% em massa da proteína) e 0,04 g de BSA (correspondente a 1% em massa da proteína). A viabilidade celular foi determinada de acordo com a EQ. 11.

$$VC (\%) = \frac{DO \text{ amostra}}{DO \text{ controle}} \cdot 100 \quad (11)$$

Onde: VC = viabilidade celular (%); *DO amostra* = densidade óptica da amostra e *DO controle* = densidade óptica do controle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	b	b	b	B	b	b	b	b	b	b	b	B
B	b	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
C	b	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
D	b	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
E	b	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
F	b	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
G	b	VC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	B
H	b	b	b	B	b	b	b	b	b	b	b	B

Figura 16. Esquema da disposição das células na placa de 96 poços. Legenda: b = branco (poços referentes ao controle do MTS); VC = controle de células; C1-C8 = poços referente às diluições da amostra - concentração, de 0,78 a 100% (Fonte: NIH Publication, 2001).

4.10 Ensaio de Adesão Celular

As células utilizadas para o teste de adesão celular foram cultivadas da mesma forma já descrita no Item 4.7.2. As membranas submetidas a esta análise foram fragmentadas e colocadas no diâmetro exato da medida de cada poço presente na placa de 12 poços.

A placa foi então esterilizada por 5 minutos de cada lado na lâmpada UV. O teste foi realizado em duplicata. Semearam-se $5 \cdot 10^4$ células por poço da placa sobre a superfície das membranas. As células foram retiradas da garrafa de cultivo celular com o auxílio de um “scraper”, que realiza o descolamento mecânico das células a fim de evitar perda dos fatores de adesão, ao invés do método convencional de uso da tripsina. Este método foi adotado com o intuito de preservar as células, uma vez que o objetivo do teste foi avaliar a própria adesão celular.

Em seguida, as placas foram colocadas em estufa incubadora de CO₂ na temperatura de 37 °C e as membranas foram avaliadas em dois tempos estabelecidos: 4 e 24 horas de contato.

Após os tempos pré-estabelecidos, as placas foram retiradas da estufa, o meio foi aspirado e as células foram fixadas nas membranas utilizando 0,5 ml de metanol por 20 minutos a 8 °C. Retirou-se o metanol e as membranas foram então lavadas com solução tampão duas vezes.

Foram adicionados 0,5 ml de solução de violeta de genciana 0,08% (p/v) a 20% de etanol e 80% de solução tampão e, após 3 minutos, as membranas foram novamente lavadas com solução tampão até a retirada total do excesso de corante. Em seguida as membranas foram submetidas à secagem em estufa a 35 °C para posterior análise por Microscópio Óptico e Microscópio Eletrônico de Varredura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção do método de preparo da membrana de PAAM

Devido à elevada massa molar do polímero, sua solubilização em água fica extremamente dificultada, mesmo em baixas concentrações. Na tentativa de adequar a proposta do trabalho ao melhor método, diferentes formas de preparo foram estudadas, a fim de se obter a técnica mais apropriada para síntese da membrana de PAAM.

O primeiro método foi realizado secando uma solução de PAAM a 1% em atmosfera de O_2 em temperatura ambiente, até total evaporação do solvente (água), e posterior formação de uma fina película sobre uma superfície lisa. Análises realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) permitiram uma avaliação da superfície do material, onde foram observados pequenos fragmentos externos e presença de impurezas, possivelmente provenientes de materiais externos de menor massa molar que aderiram à película (Figura 17), destacando assim algumas desvantagens deste processo.

Figura 17. Micrografia de superfície da película de PAAM proveniente da secagem da solução de PAAM em atmosfera de O_2 .

Ao comparar este método frente ao processo de liofilização da mesma solução de PAAM a 1%, observou-se que este último se mostrou mais adequado, uma vez que permite a formação de uma estrutura mais uniforme, com a presença de macro poros, o que viabilizou posterior incorporação das substâncias propostas (Figura 18). A liofilização requer congelamento antes e durante o processo, conferindo manutenção das propriedades do material e minimizando possível degradação do polímero, além da possibilidade de reconstituição da amostra imediatamente à forma inicial pela adição de água ou outra solução.

Em suma, o processo de síntese da membrana englobou quatro etapas principais: preparo da solução de polímero e subsequente liofilização, ressuspensão do polímero com ou sem adição de ativos, congelamento prévio e irradiação em condições de baixas temperaturas.

Figura 18. Micrografia de superfície da amostra de PAAM proveniente do processo de liofilização.

Destaca-se que, ao iniciar o processo a partir de uma solução, a gelificação do material é favorecida, considerando propriedades intrínsecas do polímero como as cadeias de elevada massa molar, longas e flexíveis, as quais tendem a se entrelaçar, atraindo-se umas às outras por ligações de proximidade de campo, como força de Van der Waals, até se cristalizarem (SINKO, 2008).

As membranas foram, na sequência, reconstituídas com água Osmose Reversa (membranas controle) ou com solução de proteína (membranas contendo ativos), e então irradiadas com raios gama em temperaturas baixas durante toda a exposição, visando preservar a integridade da amostra.

O processo de irradiação foi realizado com a finalidade de promover a reticulação e esterilização das amostras, simultaneamente, pelo método patenteado por Rosiak e colaboradores (1989), utilizando dose de 25 kGy. A Figura 19 apresenta imagens da membrana sintetizada sob as condições supracitadas, cuja concentração do polímero corresponde a 5 e 6%, respectivamente.

(a)

(b)

Figura 19. Membranas de PAAM a 5% (a) e a 6% (b), obtidas por meio do uso de radiação ionizante à dose de 25 kGy.

As imagens apresentadas na Figura 19 mostram a presença de bolhas no material obtido, constituindo um fator limitante atribuído ao processo de síntese, devido aos problemas estruturais na matriz polimérica. Fatores como agitação mecânica, posterior liofilização do polímero e uso da radiação ionizante, constituem variáveis que influenciam a estrutura final, conferindo propriedades que resultam na formação de uma estrutura com presença de bolhas.

5.1.1 Uso de temperatura criogênica para síntese da membrana

A maior parte dos trabalhos envolvendo o polímero em questão, seja relacionado à síntese de hidrogéis ou de géis utilizados para fins bioquímicos, utiliza a seguinte rota química para a obtenção do polímero: parte-se do monômero acrilamida (AAM) e através do uso de agentes como bisacrilamida (agente reticulante) e agentes oxidantes, como TEMED e persulfato de amônio, inicia-se o processo de polimerização da AAM e, como produto final, obtém-se PAAM (CAULFIELD *et al.*, 2002; OZMEN *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2010).

Neste trabalho, a amostra era proveniente de uma apresentação comercial do polímero na forma já polimerizada em PAAM, originado dos copolímeros AAM e ácido acrílico. Destaca-se a grande vantagem deste método, sobretudo em relação à toxicidade do material, uma vez que não há utilização de monômeros, isentando a amostra de possíveis resíduos tóxicos de monômeros.

Assim, uma metodologia específica - utilizando radiação ionizante e temperatura criogênica - foi desenvolvida para síntese da membrana, considerando que as propriedades deste polímero se diferem totalmente do mesmo obtido através da rota química descrita no parágrafo anterior e, na literatura, não há relatos de hidrogéis obtidos da forma proposta neste trabalho.

Um fato a destacar na execução deste trabalho, que acabou sendo o seu grande desafio, foi o tipo do polímero utilizado, tendo em vista seu alto grau de viscosidade e alta capacidade de intumescimento. Como consequência, métodos e resultados dificultaram sobremaneira a obtenção de sistemas ideais para o alcance de uma membrana polimérica.

A irradiação de polímeros em geral, em condições normais, pode levar a um efeito predominante de cisão de cadeias e, como consequência, impede a formação da membrana por esta técnica (BRADLEY, 1984). Foi observado, entretanto, que ao utilizar temperaturas criogênicas no processo, ocorreu uma inversão de fenômenos, de modo que a reticulação da cadeia polimérica se

sobressaiu sobre a cisão molecular, possibilitando a formação de uma membrana de hidrogel. Inicialmente, amostras preparadas e irradiadas em temperatura ambiente apresentavam intenso declínio de viscosidade, além de características visuais não aceitáveis, indicando o predomínio do fenômeno de cisão da cadeia molecular.

O efeito do congelamento da amostra permitiu a aproximação adequada das moléculas do polímero em função da formação de cristais de gelo, conferindo linearização da cadeia polimérica, além de limitar a formação e o acesso dos radicais oriundos da radiólise da água, promovendo, assim, o predomínio da reticulação frente à cisão molecular.

Na literatura, há trabalhos que demonstram a importância do uso da temperatura criogênica na síntese de hidrogéis de PAAM (OZMEN, *et al.*, 2007; DINU *et al.*, 2007), utilizando, porém, outra rota de síntese química como citada anteriormente, diferindo da que foi utilizada para síntese da membrana neste trabalho. Adicionalmente, o uso de baixas temperaturas é ideal para encapsular moléculas como proteínas, uma vez que processos degradativos são minimizados, favorecendo a estabilidade da proteína e sua integridade.

5.2 Caracterização da membrana de PAAM

5.2.1 Ensaio de Intumescimento

Quando há contato entre a membrana e o meio aquoso, seja ele água ou solução tampão, as cadeias poliméricas intumescem por meio da expansão de seu volume, aprisionando o líquido do meio entre elas. Um dos mecanismos de intumescimento ocorre por meio da diferença de pressão osmótica que direciona o solvente para o interior da membrana até que o equilíbrio seja atingido (FLORY, 1953). Devido ao grande poder de intumescimento característico de PAAM, foi adotado o uso de solução tampão salina (0,9% NaCl) como solvente para este ensaio, dada à presença dos sais, os quais amenizam o intumescimento da membrana, conferindo assim, resultados mais confiáveis ao teste.

Zor e colaboradores (1998) relatam o uso de solvente, como solução salina, como uma alternativa para o elevado grau de intumescimento do polímero. A Figura 20 ilustra amostras correspondentes às membranas PAAM (controle) antes e depois do teste de intumescimento. Comparando as duas imagens, é possível observar o alto poder de intumescimento do polímero, evidenciado pelo inchamento da amostra em poucos minutos.

Figura 20. A imagem (a) corresponde à amostra de membrana antes do ensaio de intumescimento, a imagem (b) corresponde à amostra intumescida, ao final do ensaio de intumescimento.

A hidrofiliicidade é uma propriedade muito marcante nessas membranas, devido à presença de grupamentos carboxílicos ($-\text{COOH}$) e amidas ($-\text{CONH}_2$) da molécula de PAAM. Estes grupamentos favorecem o intumescimento, através da formação de ligações de hidrogênio com a água (SPERLING, 2001).

De acordo com Bajpai e Giri (2003), o fato de a molécula de AAM ser aniônica acarreta em repulsão dos íons provenientes do grupamento carboxílico, gerando, assim, maior distensão das cadeias poliméricas, o que permite aumento nos níveis de intumescimento.

Segundo os resultados descritos na Tabela 4, observou-se uma relação entre a concentração do polímero e as propriedades de intumescimento. Os dados demonstram perfis poucos distintos de intumescimento entre as membranas com

concentração de PAAM igual a 4, 5, 6 e 10% (controle), diferentemente do perfil observado quando comparamos com as amostras contendo proteínas. Para amostra controle de PAAM 10%, os valores encontram-se elevados, na ordem de 2900% de intumescimento, bem como para PAAM 4% e 5%, cujo valor está entre 2800 e 2700%, respectivamente.

O efeito do aumento da concentração ($\leq 6\%$) de PAAM acarretou na diminuição das propriedades de intumescimento do material. Ao aumentarmos a concentração de polímero (10% p/p), observamos um efeito inverso, onde os níveis de intumescimento foram maiores que as demais concentrações testadas.

Tabela 4. Valores de intumescimento obtidos pelas membranas analisadas (n=3).

Grau de Intumescimento máximo (%)			
PAAM (%)	Membrana sem proteína	Membrana contendo Papaína	Membrana contendo BSA
4	2818 $\pm$ 176	265 $\pm$ 61	287 $\pm$ 85
5	2746 $\pm$ 190	327 $\pm$ 77	320 $\pm$ 93
6	1773 $\pm$ 145	228 $\pm$ 99	327 $\pm$ 74
10	2925 $\pm$ 182	413 $\pm$ 102	396 $\pm$ 80

Comparando os dados de intumescimento entre as membranas contendo proteínas e as membranas sem proteínas, nota-se que a incorporação dos ativos nas membranas conferiu notável diminuição no grau de intumescimento, na ordem de 400% em relação a 3000% das membranas controle.

Este fato indica que as proteínas exercem modificações nas propriedades do material, que pode ser atribuído às interações com o polímero. Adicionalmente, um novo arranjo do material é formado, podendo alterar também os tamanhos de poros da estrutura. A interpretação dos resultados do teste de intumescimento associada aos dados dos ensaios de densidade de reticulação e fração gel, permite analisar de modo mais amplo a estrutura da rede polimérica formada.

O gráfico mostrado na Figura 21 apresenta informações a respeito dos valores de intumescimento para uma amostra de PAAM a 6%, em função da dose de radiação utilizada.

Figura 21. Efeito da dose de irradiação no intumescimento da membrana à 6% de PAAM.

Conforme pode ser observado no gráfico da Figura 21, quanto maior a dose de radiação que o material foi exposto, menor foi o valor de intumescimento encontrado, evidenciando um perfil crescente de reticulação em função do aumento das doses de radiação.

Diante destes resultados, a dose de 25 kGy foi estabelecida para irradiação das membranas, pois esta é a dose capaz de induzir reticulação do polímero (ROSIK *et al.*, 1989). Além disso, tal valor corresponde à dose esterilizante para biomateriais (ISO 13409, 1996).

5.2.2 Determinação da densidade de reticulação

A densidade de reticulação foi estimada de acordo com a Equação de Flory (FLORY, 1953) descrita na EQ. 5 do Item 4.7.5, visando avaliar a influência da presença de proteínas na reticulação das cadeias poliméricas. Os valores obtidos encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de densidade de reticulação para as membranas de PAAM.

Densidade de reticulação (mol/cm ³)			
PAAM (%)	Membrana sem proteína	Membrana contendo Papaína	Membrana contendo BSA
4	$0,205 \times 10^{-1}$	$8,54 \times 10^{-1}$	$8,67 \times 10^{-1}$
5	$0,110 \times 10^{-1}$	$3,87 \times 10^{-1}$	$3,92 \times 10^{-1}$
6	$0,252 \times 10^{-1}$	$6,45 \times 10^{-1}$	$7,43 \times 10^{-1}$
10	$0,500 \times 10^{-1}$	$2,70 \times 10^{-1}$	$2,88 \times 10^{-1}$

Nota-se que a presença das proteínas conferiu aumento da densidade de reticulação de modo característico a cada concentração de polímero. Em concentrações mais elevadas de PAAM (10%), observou-se um efeito distinto, onde a densidade de reticulação atingiu níveis inferiores se comparados aos valores obtidos na ausência de proteínas. Valores muito próximos foram observados comparando membranas contendo papaína e BSA.

Na ausência de proteínas, observou-se que a reticulação atingiu baixos valores de densidade até concentrações iguais a 6% de PAAM. Tais valores aumentaram consideravelmente quando a concentração do polímero foi elevada para 10%. Este comportamento pode indicar que sem proteína, a reticulação não encontra barreiras físicas nem outras dificuldades estereoquímicas para ocorrer, levando à formação de uma cadeia com disposição mais livre e uma membrana com baixa densidade de reticulação.

Já na presença de proteínas, o sistema tende a se rearranjar em função das forças eletrostáticas existentes, sobretudo entre o grupo amina presente na estrutura das proteínas e o ácido acrílico presente no polímero, de modo a acomodar as proteínas na rede, o que caracteriza uma estrutura diferenciada e mais densa, com menor tamanho de poros, tendendo a controlar a liberação das moléculas (ZHAO *et al.*, 2010). Adicionalmente, a presença de proteínas leva a uma diminuição do grau de intumescimento, tornando as cadeias da membrana mais densas e resistentes, o que dificulta sua expansão.

5.2.3 Ensaio de Fração Gel

A medida da fração gel em membranas contendo polímeros de massa molar muito elevada tende a ser dificultada pelas técnicas usuais de caracterização. Isto ocorre devido às propriedades intrínsecas da estrutura do polímero, a qual impede a saída de fragmentos menores, ou seja, a porção não reticulada do sistema, por conta do seu alto grau de intumescimento.

Por isso, duas técnicas foram utilizadas nesta determinação. Uma delas correspondeu à remoção da fração solúvel com solução salina durante 6 horas em extrator *Sohxlet*, no qual o solvente (solução salina) evapora e condensa sobre o material, promovendo a extração da fração solúvel. A segunda técnica consistiu em utilizar o mesmo solvente em temperatura ambiente e a solução, por sua vez, foi trocada diariamente durante o experimento, durante 5 dias. O resultado da primeira técnica está apresentado na Tabela 6 e o resultado da segunda técnica encontra-se descrito na Tabela 7.

Tabela 6. Dados de Fração gel obtidos das membranas de hidrogel controle, com a presença de papaína e com a presença de BSA utilizando solvente em altas temperaturas (n=3).

Fração Gel (%)			
PAAM (%)	Membrana sem proteína	Membrana contendo Papaína	Membrana contendo BSA
4	26 ± 0,4	30 ± 0,3	29 ± 0,5
5	27 ± 0,3	30 ± 0,5	25 ± 0,4
6	29 ± 0,4	34 ± 0,4	37 ± 0,6
10	35 ± 0,6	37 ± 0,4	37 ± 0,5

A presença das proteínas é um fator que poderia dificultar a reticulação do polímero, induzindo a valores baixos de fração gel. No caso da primeira técnica, foi obtido um percentual baixo de fração gel ao utilizar altas temperaturas de solvente em um curto tempo de reação, o que representa uma limitação do método aplicado a este tipo de membrana.

Já o segundo método, cuja diferença principal se deu no uso da temperatura do solvente e na duração do teste, resultou em percentuais mais altos de fração gel. Adicionalmente, embora a membrana polimérica tenha passado por efeitos durante a irradiação (cisão de cadeia associada à reticulação), os fragmentos de massa molar baixa podem ter aderido fortemente à solução salina e a outras moléculas de baixa ou alta massa molar, por meio de ligações de hidrogênio, tornando sua solubilização extremamente lenta, gerando altos índices de fração gel (Tabela 7). Destaca-se a estabilidade apresentada pela membrana de hidrogel ao longo de 5 dias, cuja forma inicial foi preservada, indicando que a reticulação ocorreu de maneira satisfatória, caso contrário, a membrana geraria fragmentos e perderia sua forma inicial.

Tabela 7. Dados de Fração gel obtidos das membranas de hidrogel controle, com a presença de papaína e com a presença de BSA utilizando solvente a temperatura ambiente (n=3).

Fração Gel (%)			
PAAM (%)	Membrana sem proteína	Membrana contendo Papaína	Membrana contendo BSA
4	99 ± 0,7	99 ± 1,1	98 ± 0,8
5	99 ± 0,9	99 ± 0,7	99 ± 1,1
6	99 ± 0,6	99 ± 0,6	99 ± 0,9
10	98 ± 1,0	98 ± 0,8	99 ± 0,7

5.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Três amostras correspondendo às membranas a 5% PAAM, sendo elas: controle, membrana contendo papaína e membrana contendo BSA foram analisadas por DSC.

Os resultados do ensaio de DSC estão apresentados na Figura 22 e demonstram que as três amostras estudadas apresentaram um sinal intenso característico ao fenômeno de fusão do polímero, registrado por volta de 160 °C. Nota-se ligeiro aumento na temperatura de fusão (na faixa de 163 à 166 °C), possivelmente relacionado ao tamanho das lamelas dos cristais de PAAM.

Os resultados obtidos demonstram que a amostra PAAM 5% controle (sem proteína) corresponde à amostra mais cristalina, visto que a sua entalpia de fusão apresenta o valor mais alto, evidenciado por sua maior área no gráfico. De fato, segundo aspectos visuais, a membrana com tal concentração foi a que apresentou melhores resultados quanto às características visuais e organolépticas, tendo em vista textura e consistência do material.

As moléculas de proteína podem dificultar a cristalização do polímero, tornando mais difícil a aproximação das moléculas de PAAM, o que pode ser observado conforme a ocorrência de mudanças na entalpia de fusão nas amostras contendo proteína. Este ligeiro aumento da temperatura de fusão pode ser explicado em razão das proteínas estarem agindo como centro de nucleação. Em relação à amostra contendo papaína, nota-se a presença de um centro de nucleação mais intenso, observado através de um maior aumento em sua temperatura de fusão, igual a 3,15 °C. Já para a membrana contendo BSA, há a presença de um deslocamento menor da temperatura de fusão, igual a 2 °C.

Na temperatura em torno de 250° C, é possível observar outra modificação proveniente de mudanças na estrutura do material na presença de proteínas. Especificamente, na amostra contendo BSA observou-se um deslocamento igual a 1,32 °C, já na amostra contendo papaína o deslocamento foi maior, igual a 2,15 °C.

Em suma, a técnica de análise térmica selecionada não possibilitou a visualização de mudanças significativas relacionadas a eventos térmicos, os quais poderiam fornecer informações específicas sobre a interação das moléculas de proteína com o polímero. Deste modo, fica destacada a necessidade de se utilizar uma técnica distinta e mais específica da utilizada, que permita tal avaliação em trabalhos futuros.

Figura 22. Curva de DSC das amostras PAAM a 5% (controle), PAAM contendo papaína e PAAM contendo BSA.

5.2.5 Determinação do Ponto de carga zero (pH_{zpc})

Este parâmetro revela a tendência da superfície de uma substância em se tornar positiva ou negativamente carregada, em função do pH do meio em que está inserida. Em outras palavras, representa o valor de pH requerido para que a carga do adsorvente, no caso do polímero, seja nula (pH_{zpc}).

Para valores de pH inferiores ao pH_{zpc} , a carga superficial da substância é positiva e a adsorção de ânions é favorecida. Para valores de pH superiores ao pH_{zpc} , a carga superficial é negativa e a adsorção de cátions é favorecida (APPEL *et al.*, 2003; Al *et al.*, 2011, ESTEVAM *et al.*, 2012).

De acordo com os resultados obtidos, os valores de pH_{zpc} encontrados para as membranas de PAAM variaram de 2,29 a 3,33. Estes dados, quando comparados ao valor de pH da solução contendo proteínas (pH= 6,0), observou-se que a carga superficial da membrana de hidrogel tende a ser negativa.

A Tabela 8 representa os valores de pH_{zpc} obtidos para as membranas de PAAM e a relação entre as cargas totais das proteínas.

Tabela 8. Valores de pH_{zpc} obtidos para as membranas de PAAM e a relação entre carga total das moléculas de proteínas conforme o valor de pH_{zpc} (n=3).

PAAM (%)	Valor de pH_{zpc}	Carga total moléculas de PAAM	Carga total moléculas de papaína	Carga total moléculas de BSA
4	2,81 $\pm$ 0,01	-	+	-
5	2,29 $\pm$ 0,03	-	+	-
6	3,33 $\pm$ 0,02	-	+	-
10	3,27 $\pm$ 0,02	-	+	-

Conforme pode ser analisado na tabela acima, comparando-se os dados entre as cargas totais da papaína e da BSA, pode-se observar que o polímero, quando em contato com BSA cujo PI (ponto isoelétrico) é igual a 4,8, sofre um fenômeno de repulsão entre as cargas (polímero e BSA – carga negativa), fato que torna favorável a liberação mais rápida da proteína pela membrana, pois a interação entre as substâncias tende a ser pequena.

Já a papaína, ao contrário da BSA, possui PI igual a 9,5. Este fato pode levar à tendência de atração entre a carga do polímero e a carga da proteína, que são, neste caso, opostas (polímero – carga negativa e papaína – carga positiva), o que, deste modo, pode tornar mais favorável a interação entre essas substâncias. Assim, haveria a possibilidade de uma liberação mais lenta da papaína, considerando o fato de que cargas opostas se atraem.

A interpretação destes resultados associados aos dados de cinética de liberação de cada proteína, que serão abordados mais adiante, permitirá analisar de modo mais amplo a interação entre o polímero e as proteínas.

5.2.6 Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMC) - *Fluid Handling Capacity (FHC)*

De acordo com Thomas (2007), uma ferida na pele, dependendo de sua natureza, pode produzir cerca de 5 gramas de exsudato por 10 cm² de área da ferida a cada 24 horas. Por isso, é de fundamental importância estimar se as membranas produzidas possuem propriedades de absorção de exsudato, visando seu uso como possível curativo para a pele.

Este ensaio foi realizado segundo norma europeia BS EN 13726-1 (BS EN, 2002), cujo procedimento pode ser realizado de duas maneiras - com ou sem inversão do sistema que o compõe. Normalmente, o teste é realizado invertendo-se a posição do sistema, de modo que a membrana fique em contato direto com o líquido que simula o exsudato. Porém, para a membrana de PAAM, dado o alto poder de intumescimento do material que aumenta muito em tamanho, o teste foi realizado sem a inversão do sistema, somente com a transferência de vapor da solução para a membrana durante o experimento. Os resultados foram obtidos em função da evaporação da solução, calculado em relação à diferença de massa da membrana.

A Tabela 9 representa os valores obtidos de Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF), da Taxa de Transmissão de Vapor da solução (MVTR) e de Capacidade de Absorção (ABS).

Tabela 9. Resultado do Teste de Capacidade de movimentação de fluidos, correspondendo à capacidade de permeabilidade das membranas (n=3).

	Membrana sem proteína	Membrana contendo Papaína	Membrana contendo BSA
TTV	1,355 ± 0,017	1,467 ± 0,009	1,270 ± 0,009
ABS	1,336 ± 0,009	1,822 ± 0,014	1,473 ± 0,010
CMF	2,691 ± 0,013	3,289 ± 0,020	2,743 ± 0,012

TTV= Taxa de Transmissão de Vapor da solução (em inglês, *Moisture Vapour Transmission Rate* - MVTR); **ABS**= Capacidade de Absorção (em inglês, *Absorbency*); **CMF**= Capacidade de movimentação dos fluidos (em inglês, *Fluid Handling Capacity* - FHC).

Tais resultados demonstram que a membrana contendo papaína apresentou capacidade de movimentação dos fluidos mais elevada, maior taxa de transmissão de vapor e capacidade de absorção, cuja explicação pode ser evidenciada também pelo teste de pH_{zpc} (Item 5.2.5), cujo resultado demonstrou maior interação entre tal proteína e o polímero.

Adicionalmente, a Figura 23 apresenta um gráfico representativo da permeabilidade das membranas obtido pelo teste de Capacidade de Movimentação de Fluidos, comparando seus valores.

Figura 23. Gráfico da permeabilidade das membranas no Teste de Capacidade de movimentação de Fluidos (n=3).

Tais dados permitem analisar que o maior valor de capacidade de movimentação de fluidos correspondeu à membrana contendo papaína, cujo valor encontra-se em 3,29 g/10 cm². Para a membrana contendo BSA, o valor encontra-se abaixo, em 2,75 g/10 cm². A membrana controle correspondeu ao valor mais baixo obtido, igual a 2,70 g/10 cm². Todos os valores apresentados correspondem a 24 horas de ensaio.

Dados presentes na literatura apresentam valores de 3 a 5 g/10 cm² em 24 horas para sistemas sem contato direto com a membrana (THOMAS, 2007), corroborando os dados obtidos.

É importante ressaltar que se o ensaio fosse realizado com contato direto entre membrana e o líquido que simula exsudato, os valores de Capacidade de Movimentação de Fluidos seriam ainda maiores, uma vez que haveria absorção direta do líquido pela membrana.

5.3 Ensaios de liberação *in vitro* das proteínas

A liberação das proteínas pela membrana foi analisada por meio de técnica espectroscópica UV-visível na faixa de 280 nm, em que as proteínas apresentam seus valores máximos de absorção em função da presença de seus aminoácidos aromáticos. A partir dos valores de absorbância, foi construído o gráfico de liberação segundo a concentração das substâncias (em mg.ml⁻¹) em função do tempo (horas), partindo-se de uma curva padrão para cada proteína. A Figura 24 e a Figura 25 representam os gráficos de liberação das proteínas, papaína e BSA, respectivamente.

Figura 24. Cinética de liberação da papaína pelas membranas de PAAM (n=3).

Figura 25. Cinética de liberação de BSA pelas membranas de PAAM (n=3).

Conforme pode ser observado nos gráficos da Figura 24 e da Figura 25, a cinética de liberação das proteínas nestes sistemas apresentou uma fase inicial de liberação rápida e uma segunda fase mais lenta, em que o tamanho da molécula de proteína se torna o fator principal e as interações entre a proteína e o polímero tendem a dominar a taxa de liberação da substância pelo sistema.

O perfil cinético de liberação apresentou um comportamento característico, evidenciado por picos nas primeiras 2 horas de ensaio para as duas proteínas, efeito conhecido como efeito *Burst*, causado pelo relaxamento das cadeias poliméricas, seguido de uma difusão contínua de aproximadamente 80% das proteínas liberado nas 50 horas de análise (KHOURY *et al.*, 2003).

A disposição de parte das moléculas de proteína na superfície da membrana pode justificar a liberação inicial mais intensa, especialmente para as membranas contendo 4 a 5% de PAAM, uma vez que as moléculas presentes na superfície possuem maior facilidade em se difundir no meio, ao passo que a quantidade de proteína incorporada no interior da membrana é liberada de forma mais gradual.

O tempo escolhido para análise de liberação das proteínas igual a 50 horas, se deve ao fato de que os curativos comumente empregados no tratamento de queimaduras, feridas e escaras de pele, costumam ser utilizados por 24 a 48 horas de contato.

Adicionalmente, quando se compara a liberação das moléculas de papaína e BSA, nota-se que as moléculas de papaína apresentaram um perfil de liberação mais lento. Considerando os dados de pH_{zpc} (Item 5.2.5) para a papaína, analisamos que estas moléculas encontram-se mais aprisionadas na membrana devido às forças de atração entre suas cargas, evidenciando o perfil mais lento de liberação. Deste modo, seria possível obter um controle mais adequado das moléculas de papaína pela membrana de PAAM.

Além disso, deve-se levar em conta a composição bioquímica de cada molécula e o espaço que cada uma ocupa na rede tridimensional formada. BSA é constituída de uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e composta por três domínios homólogos, possuindo 67 kDa (EMERSON, 1989).

A molécula de papaína, por outro lado, é constituída de uma cadeia polipeptídica de 212 resíduos de aminoácidos que se dobra para formar dois domínios, possuindo 23 kDa (KAMPHUIS *et al.*, 1984), ou seja, 1/3 do tamanho da molécula de BSA. Isto poderia permitir uma maior acomodação das moléculas de papaína, evidenciando também o perfil mais lento de liberação desta proteína evidenciando o perfil mais lento de liberação evidenciando o perfil mais lento de liberação.

Ao observarmos a cinética de liberação das proteínas em função da concentração de polímero, encontramos um perfil similar para a maioria das amostras. Contudo, os níveis de liberação de BSA foram mais intensos para a concentração de 5% PAAM, evidenciando que esta concentração de polímero é capaz de conferir uma estrutura mais adequada ao material para liberação da molécula.

Inicialmente, a nanoestruturação foi proposta visando adequar a estrutura do material, sobretudo o tamanho de poro da membrana, para obter uma liberação controlada das substâncias incorporadas. Contudo, observou-se que a liberação de tais substâncias estava diretamente relacionada com a afinidade química entre o polímero e as proteínas, e não em função da densidade de reticulação propriamente dita. Deste modo, a etapa de nanoestruturação relacionada à análise de tamanho de poro não foi estendida.

5.3.1 Atividade enzimática

A análise da atividade enzimática é de fundamental importância para papaína, uma vez que permite assegurar se a enzima está mantendo seu sítio ativo preservado, o qual é responsável por sua ação biológica.

Conforme pode ser observado na Figura 26, o perfil da atividade enzimática revelou que durante o intervalo de tempo analisado, todas as membranas produzidas apresentaram bioatividade apesar do decaimento biológico observado pelas curvas do gráfico mostrado a seguir.

Figura 26. Atividade enzimática relativa da papaína medida em USP.mg⁻¹ para membranas em diferentes concentrações de PAAM (4-10%).

Índices mais altos de bioatividade foram registrados para a membrana contendo 4% de PAAM. Membranas contendo 5 e 6% de PAAM também apresentaram comportamento similar, embora ligeiros aumentos e quedas tenham sido detectados. Este comportamento é típico da enzima, que requer o grupo sulfidril livre para desempenhar ação catalítica. Sua conformação estrutural é estabilizada por ligações dissulfeto que, uma vez destruídas, levam à redução e consequente perda da atividade biológica catalítica da enzima (ZHUANG & BUTTERFIELD, 1991).

5.4 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade das membranas foi realizado conforme preconizado pelas normas para biomateriais (ISO 10993, 1992) e os volumes de meio extrator foram calculados com base no parâmetro de intumescimento das membranas.

A escolha das membranas na concentração a 4% e 5% de polímero para realização deste teste foi atribuída ao fato de tais membranas apresentarem características visuais mais adequadas, bem como apropriados níveis de

liberação das proteínas pelas membranas de PAAM. Os resultados encontram-se descritos para cada amostra analisada nas Figuras 27 a 30.

A Figura 27 e Figura 28 correspondem ao resultado de citotoxicidade das membranas controle. Já a Figura 29 e Figura 30 correspondem ao resultado de citotoxicidade das membranas contendo papaína e contendo BSA, respectivamente.

Figura 27. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 4% (controle). As concentrações C1 a C8 correspondem às diluições seriadas do líquido extrator contendo as amostras e o meio de cultura: C1= 0,78% do volume líquido extrator contendo as amostras; C2= 1,56%; C3= 3,125%; C4= 6,25%; C5= 12,5%; C6= 25%; C7= 50%; C8= 100%.

Figura 28. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 5% (controle). As concentrações C1 a C8 correspondem às diluições seriadas do líquido extrator contendo as amostras e o meio de cultura: C1= 0,78% do volume líquido extrator contendo as amostras; C2= 1,56%; C3= 3,125%; C4= 6,25%; C5= 12,5%; C6= 25%; C7= 50%; C8= 100%.

Figura 29. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 4% contendo papaína. As concentrações C1 a C8 correspondem às diluições seriadas do líquido extrator contendo as amostras e o meio de cultura: C1= 0,78% do volume líquido extrator contendo as amostras; C2= 1,56%; C3= 3,125%; C4= 6,25%; C5= 12,5%; C6= 25%; C7= 50%; C8= 100%.

Figura 30. Ensaio de citotoxicidade da membrana PAAM 5% contendo BSA. As concentrações C1 a C8 correspondem às diluições seriadas do líquido extrator contendo as amostras e o meio de cultura: C1= 0,78% do volume líquido extrator contendo as amostras; C2= 1,56%; C3= 3,125%; C4= 6,25%; C5= 12,5%; C6= 25%; C7= 50%; C8= 100%.

Existem preocupações em relação ao uso de PAAM como um biomaterial. A primeira delas é relativa à neurotoxicidade da acrilamida (acrilamida é irritante aos olhos, pele e trato respiratório), cuja presença no material polimérico poderia ser residual, dependendo do processo de síntese do polímero. Outro ponto diz respeito à possibilidade do polímero se degradar e voltar à forma de monômero original (AAM) (CAULFIELD *et al.*, 2002).

Entretanto, nas condições em que o teste foi realizado, as membranas não apresentaram citotoxicidade, como pode ser observado nos gráficos relacionados, onde nota-se que a viabilidade celular encontra-se acima de 70%, de acordo com o que preconiza norma para biomateriais (ISO 10993, 1992).

Desta forma, tais membranas se mostraram adequadas para aplicação como biomateriais, não apresentando resíduos tóxicos de monômero (AAM). A Figura 31 faz menção ao controle das proteínas para o teste realizado.

Figura 31. Ensaio de Citotoxicidade de papáina e BSA (controle das proteínas). As concentrações C1 a C8 correspondem às diluições seriadas do líquido extrator contendo as proteínas e o meio de cultura: C1= 0,78% do volume líquido extrator contendo as amostras; C2= 1,56%; C3= 3,125%; C4= 6,25%; C5= 12,5%; C6= 25%; C7= 50%; C8= 100%.

No gráfico da Figura 31, destaca-se o caráter não citotóxico da BSA, bem como a citotoxicidade da papáina, observado pelo decaimento do valor de viabilidade celular. A papáina, enzima proteolítica por natureza, é também considerada como uma enzima cuja atividade é semelhante a da tripsina (*trypsin-like activity*) (ERLANGER et al., 1961), possuindo um efeito sobre a adesão celular, impedindo tal processo, ocasionando o desprendimento das células da placa ou outra superfície onde as mesmas estejam sendo cultivadas.

Avaliando-se o gráfico referente aos controles (Figura 31), pode-se observar claramente que o processo de extração utilizado para a avaliação da citotoxicidade indireta das membranas de PAAM, inativou a papáina, comprovando que todo e qualquer efeito tóxico que as membranas viessem a apresentar seria gerado diretamente pelos componentes da mesma, pois em nenhum dos resultados observou-se comportamento semelhante ao apresentado na figura supracitada.

5.5 Ensaio de adesão celular

A adesão celular está diretamente ligada às interações entre os componentes do polímero, as moléculas incorporadas na membrana e a superfície das células. Trata-se de um processo complexo, que envolve vários passos, incluindo adesão imediata, mobilização do citoesqueleto e subsequente espalhamento das células. Estes passos são mediados por diferentes conjuntos de moléculas e sinais (ROCHA *et al.*, 2001).

Neste ensaio, foi avaliada a adesão celular de fibroblastos BALB/c 3T3 nas membranas a 5% PAAM - controle (Figura 32), membranas a 5% PAAM contendo BSA (Figura 33) e membranas a 5% PAAM contendo papaína (Figura 34) - e as imagens foram obtidas através de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

A análise inicial foi realizada por meio de Microscopia Óptica na tentativa de se observar a presença de células aderidas nas membranas. Devido às características de alto grau de intumescimento da membrana de PAAM, tal análise foi inviabilizada, levando ao uso de técnicas alternativas como MEV. Vidal *et al.* (2013), Lim & Park (2012) e Gristina *et al.* (2009) encontraram resultados semelhantes aos apresentados em materiais poliméricos utilizando células BALB/c 3T3 e analisando-os por MEV, corroborando os dados apresentados nas próximas figuras.

Nota-se a presença das células de fibroblastos representadas pela presença de diversos pontos brancos nas Figura 31, Figura 32 e Figura 33.

O processo de adesão celular é uma reação tempo-dependente. Cabe ressaltar que o tempo de incubação de 4 horas justifica-se pelo conhecimento de que fibroblastos levam de 2 a 4 horas para se aderirem às superfícies. O ensaio também foi realizado com o tempo de incubação de 24 horas como comparativo e as imagens correspondentes são apresentadas na Figura 32 (b), Figura 33 (b) e Figura 34 (b).

Figura 32. Micrografia das membranas 5% PAAM controle após 4 horas de contato com as células BALB/c 3T3 (a) e 24 horas de contato (b) para o teste de adesão celular. Microscopia eletrônica de varredura, aumento x 1500 (a) e x 4000 (b).

Figura 33. Micrografia das membranas 5% PAAM contendo BSA após 4 horas de contato com as células BALB/c 3T3 (a) e 24 horas de contato (b) para o teste de adesão celular. Microscopia eletrônica de varredura, aumento x 4000 (a) e x 4000 (b).

Figura 34. Micrografia das membranas 5% PAAM contendo papaína após 4 horas de contato com as células BALB/c 3T3 (a) e 24 horas de contato (b) para o teste de adesão celular. Microscopia eletrônica de varredura, aumento x 2000 (a) e x 4000 (b).

Em relação aos resultados obtidos, é possível notar que a adesão celular nas membranas sem proteínas foi maior no ensaio de 24 horas de contato com as células, caracterizada pela maior presença das células de fibroblastos representadas pelos diversos pontos brancos nas figuras. Este é um dado esperado, uma vez que o tempo possibilita a adesão daquelas células que não se encontravam aderidas.

Outro dado relevante diz respeito à ocorrência de menor adesão nas membranas contendo proteínas. Este aspecto é notável nas imagens relacionadas a tais membranas quando comparada às membranas controle, tornando-se indicativo de que as proteínas dificultaram ou mesmo inibiram a adesão das células pela membrana.

Para membranas utilizadas no tratamento de queimaduras de pele ou como agentes no tratamento de feridas e escaras de pele, este evento se torna muito notável e interessante, uma vez que as membranas destinadas a este fim não devem aderir à pele, pois, caso contrário, causariam problemas no momento da troca do curativo ou em sua retirada na pele.

Na Figura 35, encontra-se representada uma micrografia obtida através de Microscopia Óptica, correspondente ao controle das células BALB/c 3T3, onde é possível observar claramente o crescimento de tais células, mostrando a confiabilidade do teste realizado.

Figura 35. Imagem obtida através de Microscopia Óptica referente ao controle das células BALB/c 3T3 aderidas na placa de 96 poços, aumento 1000x.

Sumarizando os resultados obtidos, observou-se que as proteínas parecem possuir uma ação protetora sobre as células de fibroblastos, impedindo que haja adesão na membrana. Tal efeito, entretanto, deve ser melhor elucidado, principalmente em relação à natureza do polímero em questão e às células que foram avaliadas, uma vez que não foram utilizadas outros tipos de células, como os queratinócitos humanos. Cabe ressaltar, assim, a importância em se utilizar outros tipos de células para esta análise em trabalhos futuros.

6. CONCLUSÕES

O polímero empregado no preparo de membranas para incorporação da papaína e BSA se mostrou adequado e as membranas contendo PAAM 4% a 10% p/p corresponderam às concentrações mais indicadas de acordo com testes preliminares, destacando-se 4% e 5% de PAAM, considerando os parâmetros analisados.

Uma nova técnica de síntese da membrana de PAAM foi desenvolvida, partindo-se do polímero na forma polimerizada em PAAM, originado dos copolímeros AAM e ácido acrílico, diferindo da técnica tradicional que parte-se de monômeros. Adicionalmente, o uso de temperatura criogênica no processo de síntese e de irradiação do material permitiu obter membranas estáveis para incorporação de ativos termosensíveis como proteínas.

Os parâmetros da nanoestrutura foram obtidos por meio do cálculo da densidade de reticulação e determinação do ponto de carga zero (pH_{zpc}) do polímero. Os dados de cinética de liberação mostraram que a liberação de papaína e BSA foi controlada pela afinidade química das proteínas com os grupamentos do polímero. A diferença entre os valores obtidos referentes ao tamanho de poros de cada membrana não influenciou a cinética de liberação das proteínas, nas condições experimentais avaliadas.

Os resultados obtidos demonstraram que as características estruturais do polímero foram conservadas e as membranas apresentam uma liberação dos ativos incorporados em função do tempo. De modo especial, o polímero mostrou possuir maior afinidade com a papaína, liberando-a mais lentamente.

Nas condições realizadas, as membranas analisadas não apresentaram citotoxicidade, a papaína manteve sua bioatividade preservada apesar do decaimento biológico observado. As proteínas parecem inibir a adesão celular nas membranas, fato que torna muito interessante seu uso como biomaterial para tratamento de escaras e feridas na pele. Um estudo mais aprofundado, porém, deve ser realizado para assegurar tal afirmação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AI, L.; LI, M.; LI, L. Adsorption of Methylene Blue from Aqueous Solution with Activated Carbon/Cobalt Ferrite/Alginate Composite Beads: Kinetics, Isotherms, and Thermodynamics. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.56, p.3475–3483, 2011.
2. ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. reversible adsorption by a pH and temperature-sensitive acrylic hydrogel. **Journal of Controlled Release**, v. 80, p. 247-257, 2002.
3. AOUADA, F.A.; MOURA, M.R. de; MENEZES, E. A.; NOGUEIRA, A. R. A.; MATTOSO, L.H.C. Síntese de hidrogéis e cinética de liberação de amônio e potássio. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, p. 1643-1649, 2008.
4. AOUADA, F.A.; MUNIZ, E.C.; VAZ, C.M.P.; MATTOSO, L.H.C. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1482-1490, 2009.
5. APPEL, G.; MA, L.; RHUE, R.; KENNELLEY, E. Point of zero charge determination in soils and minerals via traditional methods and detection of electroacoustic mobility. **Geoderma**, v.113, p.77–93, 2003.
6. ATOMIC ENERGY OF CANADA LIMITED. **Instruction manual - Gammacell 220 – Cobalt 60 irradiation unit**. 6. ed. Ottawa: [s. n.], 1968.
7. AZEVEDO, T. L. F.; BERTONHA, A.; GONÇALVES, A. C. A. Uso de hidrogel na agricultura, **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.1, n.1, p.23-31, 2002.
8. BAJPAI, A.K.; GIRI, A. Water sorption behavior of highly swelling (carboxymethylcellulose-g-polyacrylamide) hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 271–279, 2003.
9. BARDAJEE, G. R.; POURJAVADI, A.; SOLEYMAN, R.; SHEIKH, N. Irradiation mediated synthesis of a superabsorbent hydrogel network based on polyacrylamide graft onto salep. **Nuclear Instrumental Methods**, v. 266, p. 3932-38, 2008.

10. BRADLEY, R. **Radiation Technology Handbook**. New York: Marcel Dekker, 10^a ed., 334 p., 1984.
11. British Standards **BS EN 13726-1**. Test methods for primary wound dressings. In: Part 1: Aspects of Absorbency, Section 3.3: Fluid Handling Capacity, 2002.
12. BRYHAN, M.D.; HERSH, L.S.; SMITH, F.M. A method of attaching dialdehyde starch to a surface and products produced by that method, **EP 0596315 B1**, 1998.
13. BURILLO, G. S.; OGAWA, T. The gamma-ray-induced crosslinking of polyacrylamide. **Journal of Applied Polymer Science**, v.32, p.3783-3789, 1986.
14. CARTER, D. C.; HO, J. X. Estrutura da Albumina de Soro. **Advanced Protein Chemistry**, v.45, p.153-203, 1994.
15. CAULFIELD, J.M., QIAO, G.G., SOLOMON, D. H. Some aspects of the properties and degradation of polyacrylamides. **Chemical Review**, v.102, p.3067-3083, 2002.
16. CAYKARA, T.; KIPER, S.; DEMIREL, G. Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: Synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants, **European Polymer Journal**, v. 42, p. 348-355, 2006.
17. CHEN, J.; LIU, M.; CHEN, S. Synthesis and characterization of thermo- and pH-sensitive kappa-carrageenan-g-poly(methacrylic acid)/poly(N,N-diethylacrylamide) semi-IPN hydrogel. **Materials Chemistry and Physics**, v. 115, p. 339-346, 2009.
18. CLOUTIER, J.; BLAIS, A-S., MOORE, K.; BOLDUC, S. A prospective study using a new bulking agent for the treatment of vesicoureteral reflux: polyacrylamide hydrogel, **The Journal of Urology**, 2013, DOI: 10.1016/j.juro.2013.03.071.
19. CNEN – **Comissão nacional de Energia nuclear**. Radioatividade. Disponível em: <<http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf>>. Acesso em: 02.fev. 2013.

20. DINU, V. M.; OZMEN, M. M.; DRAGAN, S. E.; OKAY, O. Freezing as a path to build macroporous structures: Superfast responsive polyacrylamide hydrogels, **Polymer**, v. 48 (1), p.195-204, 2007.
21. EMERSON, T. E. Uniques features of Albumin – a brief review. **Critical Care Medicine**, v.17, n°7, p.690-94, 1989.
22. ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of tripsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, 1961.
23. ESTEVAM, L. S.; DEBONE, H. S.; YOSHIDA, C. M. P.; SILVA, C. F. Adsorption of bovine serum and bovine haemoglobin onto chitosan film, **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n.8/9, p. 785-792, 2012.
24. FALABELLA, A. F. Debridement and wound bed preparation. **Dermatologic Therapy**, v. 19, p. 317–325, 2006.
25. FERNANDEZ, E.; HERNANDEZ, R.; CUBERES, M. T.; MIJANGOS, C.; LOPEZ, D. New hydrogels from interpenetrated physical gels of agarose and chemical gels of polyacrylamide: effect of relative concentration and crosslinking degree on the viscoelastic and thermal properties, **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 48, p. 2403–2412, 2010.
26. FLORY, P.J., **Principles of Polymer Chemistry**, Cornell University, Ithaca, N.Y., 1953.
27. Food and Drug Administration, FDA, **Questions and answers about FDA's enforcement action regarding unapproved topical drug products containing papain**, 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/EnforcementActivitiesbyFDA/SelectedEnforcementActionsonUnapprovedDrugs/ucm119646.htm>>. Acesso em: 27.jan.2013.
28. GRISTINA, R.; D'ALOIA E.; SENESI, G.S.; MILELLA, A.; NARDULLI, M.; SARDELLA, E.; FAVIA, P.; D'AGOSTINO, R. Increasing cell adhesion on plasma deposited fluorocarbon coatings by changing the surface topography, **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v.88, p.139-149, 2009.
29. GUILHERME, M. R.; SILVA, R.; GIROTTI, E. M.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Hydrogels based on PAAm network with PNIPAAm included:

- hydrophilichydrofobic transition measured by the partition of orange II and Methylene Blue in water, **Reactive & Functional Polymer**, v. 44, p. 4213-4219, 2003.
30. HARVEY, B.G. **Introduction to Nuclear Physics and Chemistry**, Prentice-Hall, New Jersey, 1976.
  31. HIRAYAMA, K.; AKASHI, S.; FURUYA, M.; FUKUHARA, K. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS AND FRIT-FAB LC/MS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.173, nº2, p.639-46, 1990.
  32. ISO 10993/EN 30993. Biological evaluation of medical devices. Tests for cytotoxicity: in vitro methods, **International Organization for Standardization**, Geneve, Switzerland, 1992.
  33. ISO/TS 13409. Sterilization of health care products - Radiation sterilization - Substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches, **International Organization for Standardization**, 1996.
  34. 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.
  35. KHOURY, C. H. R.; ADALSTEINSSON, T. H.; JOHNSON, B.; CRONE, W. C.; BEEBE, D.J. Tunable microfabricated hydrogels - a study in protein interaction and diffusion, **Biomedical Microdevices**, v.5 (1), p. 35–45, 2003.
  36. KRANE, K. S. **Introductory Nuclear Physics**, John Wiley & Sons Inc., New York, 1987.
  37. LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 2, p.201-214, 1981.
  38. LEE, C. T.; KUNG, P. H.; LEE, Y. D. Preparation of poly(vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 348-354, 2005.
  39. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1995. 238p.

40. LI, B.; JIANG, Y.; LIU, Y.; WU, Y.; YU, H.; ZHU, M. Novel poly(Nisopropylacrylamide)/ clay/poly(acrylamide) IPN hydrogels with the response rate and drug release controlled by clay content, **J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.** V.47 (1), p. 96–106, 2008.
41. LIM, J. I.; PARK, H-K. Preparation of enhanced three-dimensional porous chitosan scaffolds by acetylation and aqueous extraction, **Journal of Porous Mater**, v.19, p.537–542, 2012.
42. LIU, J.; LI, L.; CAI, Y. Immobilization of camptothecin with surfactant into hydrogel for controlled drug release. **European Polymer Journal**, v 48, p. 1767-74, 2006.
43. LOPES, P. S.; RUAS, G. W.; BABY, A. R.; PINTO, C. A. O.; WATANABE, I.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. *In vitro* safety assessment of papain on human skin: A qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1, 2008.
44. 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.
45. LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros – Determinação de peso molecular e análise térmica.** Rio de Janeiro, E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2001.
46. LUGÃO, A.B.; MALMONGE, S.M. Use of radiation in the production of hydrogels. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v. 185, p.37-42, 2001.
47. LUGÃO. A.B.; ARTEL, B. W. H.; YOSHIGA, A., LIMA, L. F. C. P.; PARRA, D.F.; BUENO, J.; LIBERMAN, S.; FARRAH, M; TERCARIOL, W.R.; OTAGURO, H. Production of high melt strength polypropylene by gamma irradiation, **Radiation Physics and Chemistry**, v.76, p.1691-1695, 2007.
48. MANDAL, H.; PISANOVA, E. Polymer-aldehyde binding system for manufacture of wood products. **EP 1971640 A1**, 2008.

49. MARCONATO, J. C.; FRANCHETTI, S. M. M. Polímeros superabsorventes e as fraldas descartáveis: Um material alternativo para o estudo de polímeros. **Química Nova na escola**, v.15, p.42-44, 2002.
50. MARK, J. E. **Polymer Data Handbook**, Oxford University Press, New York, 1999. Disponível em: <<http://www.objectplastic.com/2010/03/polymer-data-handbook-james-mark-editor.html>>. Acesso em: 10.jul.2012.
51. MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; FAVARO, S.L.; RADOVANOVIC, E.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C. Release of BSA from porous matrices constituted of alginate-Ca²⁺ and PNIPAAm-interpenetrated networks. **Materials Science and Engineering**, v. 29, p 2319-2325, 2009.
52. NADDAF, A. A.; TSIBRANSKA, I.; BART, H. J. Kinetics of BSA release from poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, p.581–588, 2010.
53. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Polymer Science and Engineering: The Shifting Research Frontiers. **National Academy Press**, Washington, DC., 1994, 192p.
54. NEMEN, D.; DORA, C. L.; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p. 129-139, 2007.
84. NIH Publication. **Guidance document on using *in vitro* data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity**, n. 01-4500, ago. 2001.
55. O'NEIL, M.J. (Ed.) *et al.* **The Merck index**. 13^a. Ed. Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, 2001, 7089p.
56. OZMEN, M. M.; DINU, V. M.; DRAGAN, S. E.; OKAY, O. Preparation of Macroporous Acrylamide-based Hydrogels: Cryogelation under Isothermal Conditions, **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 44, p.1195–1202, 2007.
57. PACIOS, I.E.; PASTORIZA, A.; PIEROLA, I.F. Effect of the crosslinking density and the method of sample preparation on the observed microstructure of macroporous and conventional poly(N,N-

- dimethylacrylamide) hydrogels. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, p. 263-272, 2006.
58. PEPPAS, N. A.; HKARE, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 11, p. 1-35, 1993.
  59. PEPPAS, N.A. Hydrogels in medicine and pharmacy. Boca Raton, Florida: **CRC, volume II: polymers**, p. 1-48. 40, 1987.
  60. PEPPAS, N.A.; BURES, P; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-46, 2000.
  61. PIAI, J.F.; MOURA, M.R.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C. Kinetic study of bovine serum albumin (BSA) released from alginate- Ca^{2+} /PNIPAAm hydrogels. **Macromolecular Symposia**, v.266 (1), p.108–113, 2008.
  62. 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 Wound, Ostomy and Continence Nursing**, v. 30, p. 175-183, 2003.
  63. REICHMANIS, E.; O'DONNELL, J. H. **The effects of radiation on high-technology polymers**. Washington DC: American Chemical Society, 1989.
  64. ROBYT, J.F.; WHITE, B.J. **Biochemical Techniques – Theory and practice**, Waveland Press. Prospect Heights., Illinois. 1990. 403p.
  65. ROCHA, H.A.O.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; CARVALHO, L.C.M.; VEIGA, S. S.; LEITE, E.L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H.B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.621-626, 2001.
  66. ROSEN, M. R. Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetics Products: Technology, **Applications and Formulations**. New York: William Andrew, p. 7-9, 2005.
  67. ROSIAK J.M.; RUCINSKA-RYBUS, A.; PEKALA, W. Method of manufacturing hydrogel dressings, **US Patent 4,871 490**, 1989.
  68. ROSIAK, J.M.; OLEJNICZAK, J. Medical Application of Radiation Formed Hydrogels, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 42, p. 903-906, 1993.

69. ROSIAK, J.M.; ULANSKI, P. Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, p. 139-151, 1999.
70. SANCHEZ-DÍAZ, J. C.; MARTÍNEZ-RUVALCABA A.; ORTEGA-GUDIÑO, P.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, A.; MENDIZÁBAL, E.; PUIG, J. E. Determination of the diffusion coefficients in the ascorbic acid delivery from nanostructured-polyacrilamide hydrogels. **Polymer Bulletin**, v. 56, p. 437–446, 2006.
71. SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. **Journal of molecular catalysis Part b: enzymatic**, v. 38, p. 171-177, 2006.
72. SINANI, V. A.; VALUYEV, L. I.; CHUPOV, V. V.; PLATE, N. A. Effect of serum albumin on the structure of polyacrylamide hydrogels, **Polymer**, v.30, n.10, p.2227-2234, 1988.
73. SINGH D.; SINGH, R. Papain incorporated chitin dressings for wound debridement sterilized by gamma radiation, **Radiation Physics and Chemistry**, v.81, p.1781–1785, 2012.
74. SINKO, P.J. Martin: **Físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, 810p.
75. SPERLING, L.H. **Introduction to Physical Polymers Science**. 3 ed., John Wiley & Sons, Inc. Publication, 2001. 671p.
76. SPINKS, J. W. T.; WOODS, R. J. **An introduction to radiation chemistry**. 3ª ed. New York, John Wiley and Sons, 1990.
77. STARLEY, I. F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S. W. The treatment of pediatric burns using topical papaya. **Burns**, v.25 p.636-639, 1999.
78. SUFI, B. S. **Utilização de cocultura de melanócitos e queratinócitos para avaliação da ação do líquido da castanha de caju (LCC) na pigmentação epidérmica**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
79. TELGENHOFF, D.; LAM, K.; RAMSAY, S.; VASQUEZ, V.; VILLAREAL, K; SLUSAREWICZ, P; ATTAR, P.; SHROOT, B. Influence of papain urea

- copper chlorophyllin on wound matrix remodeling. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, p. 727–735, 2007.
85. THOMAS, S. Fluid Handling Properties of Allevyn dressing. **Wound Management Communications**, BST Publications, p.1-8, 2007.
  80. USP XXIX: **United States Pharmacopeia**. Convention, Rockford, MD. p. 2699-2701, 2006.
  81. VARCA, G.H.C.; ANDRÉO-FILHO, N.; LOPES, P.S.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins: an overview of the complexation of pharmaceutical proteins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, p. 255-263, 2010.
  82. VIDAL, G.; BLANCHI, T.; MIESZAWSKA, A. J.; CALABRESE, R.; ROSSI, C.; VIGNERON, P.; DUVAL, J-L; KAPLAN, D. L.; EGLES, C. Enhanced cellular adhesion on titanium by silk functionalized with titanium binding and RGD peptides, **Acta Biomaterialia**, v.9, p.4935–4943, 2013.
  83. WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999, 334p.
  84. WOFFORD Jr.; KOSKI, A. J. **A polymer for the drought years (on-line)**. Colorado Green, 1990.
  85. WOODWARD J. **Immobilized cells and enzymes: a practical approach**. ed. IRL Press Limited, Oxford, 1985, 177p.
  86. ZHAO, Q.; SUN, J.; LIN, Y.; ZHOU, Q. Study of the properties of hydrolyzed polyacrilamide hydrogels with various pore structures and rapid pH-sensitivities, **Reactive and Functional Polymers**, v.70, p.602-609, 2010.
  87. ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D. A. Denaturation studies of active-site labeled papain using electron paramagnetic resonance and fluorescence spectroscopy. **Biophysical Journal**, v.60, p.623-628, 1991.
  88. ZOR, S. D.; SARIISIK, S. B.; OKAY, O. Swelling behavior of anionic acrylamide-based hydrogels in aqueous salt solutions: comparison of experiment with theory, **Journal of Applied Polymer Science**, v.70, p.567–575, 1998.
  89. ZULLI, G.; LOPES, P. S.; VELASCO, M. V. R.; ALCANTARA, M. T. S.; ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; MATHOR, M. B. Influence of gamma radiation onto polymeric matrix with papain, **Radiation Physics and Chemistry**, v.79, p.286-288, 2010.