AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**SÍNTESE INDUZIDA POR RADIAÇÃO DE NANOCARREADORES BIOATIVOS À BASE DE
PAPAÍNA PARA CARREAMENTO DE RADIOFÁRMACO**

Gabriela Nemesio Fazolin

**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
2019**

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

**SÍNTESE INDUZIDA POR RADIAÇÃO DE NANOCARREADORES BIOATIVOS À BASE DE
PAPAÍNA PARA CARREAMENTO DE RADIOFÁRMACO**

Gabriela Nemesio Fazolin

**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

Versão Corrigida

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: IPEN/CNEN

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

Como citar:

NEMESIO FAZOLIN, G. ***Síntese induzida por radiação de nanocarreadores bioativos base de papaína para carregamento de radiofármacos***. 2019. 85 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nemesio Fazolin, Gabriela

Síntese induzida por radiação de nanocarreadores bioativos à base de papaína para carregamento de radiofármacos / Gabriela Nemesio Fazolin; orientador Prof. Dr. Ademar Benevolo Lugão. -- São Paulo, 2019.
85 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Nanopartícula de papaína. 2. Nanocarreador. 3. Reticulação por radiação gama. 4. Condições experimentais. 5. Radiofármaco. I. Benevolo Lugão, Prof. Dr. Ademar, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a minha família e amigos, que acreditaram no meu potencial e me inspiraram a ser melhor todos os dias.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa se realizar.”

(Roberto Shinyashiki)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivone e Ismael, que investiram no meu estudo, incentivaram e me instruíram a ser quem sou hoje. Obrigada por todas as broncas e conselhos, pois me fizeram crescer e perseverar.

Ao meu companheiro, Felipe, por toda a paciência e dedicação diária. Por acreditar e me inspirar todos os dias. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão, Matheus, pelo carinho e parceria. Muito obrigada por me acompanhar nesta vida.

As melhores amigas Angel, Natália e Tássia, que nas horas mais difíceis estavam presentes para me apoiar. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos!

Aos meus afilhados, Arthur, Helena e Giovanna, por alegrarem meus dias com sorrisos, brincadeiras e tanto carinho.

A Katia, Ilson, Andresa e Elton, por me receberam de braços abertos e compartilhar tantos momentos juntos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ademar Lugão pelo conhecimento transmitido e por acreditar no meu potencial.

Aos amigos Justine, Gustavo Varca e a pequena Lara, que estiveram ao meu lado nas horas fáceis e difíceis e me ensinaram o valor de uma grande amizade. Muito obrigada por acreditarem em mim e me ensinarem tanto! Gu, obrigada também pela co-orientação. Você foi fundamental no meu crescimento.

Aos meus queridos Lucas Freitas de Freitas e Caroline Lima, pela parceria, amizade e suporte. Agradeço todo dia por terem aparecido na minha vida. Sem vocês os meus dias não seriam tão felizes!

Aos amigos do laboratório Nanothera, Kamila Nogueira, Thomaz Sevilha,

Jorge Gabriel, Francoleno Avelino, Cássia Priscila, Aryel Heitor. Pelas conquistas compartilhadas. Pela força e atenção. Pela amizade.

A Bruna Roque, pela amizade, conversas e por me ajudar tantas vezes que precisei.

Aos professores e pesquisadores que fizeram parte da minha trajetória, Dr. Fábio Marques, pelo suporte e conhecimento passado na etapa de radiomarcção, Dr. Sławomir Kadłubowski pela ajuda nos artigos e parceria.

À Elizabeth Somessari, Paulo Santos e Dr. Pablo Vásquez pela irradiação das amostras.

Ao João e ao Takeshi que estiveram sempre a disposição para ajudar nos serviços de manutenção. Pelas conversas e cafés da manhã.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/USP) e à Universidade de São Paulo pela infraestrutura disponível.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pela bolsa de mestrado concedida.

À Associação Internacional de Irradiação (International Irradiation Association - iia) e ao Congresso de Radiação Ionizante e Polímeros (Ionizing Radiation and Polymers Symposium - IRaP) pelo prêmio científico concedido.

RESUMO

A papaína, enzima proteolítica extraída do fruto da *Carica papaya* Linnaeus, apresenta grande perspectiva para carregamento de fármacos devido propriedade anti-inflamatória, antitumoral e aumento da permeação. O presente trabalho teve como objetivo estudar as variáveis de processo da síntese radio-induzida, com o propósito de avaliar a influência destes parâmetros na formação da nanopartícula além do seu potencial como nanocarreador. A síntese foi realizada na presença (20%, v/v) e ausência de etanol, tampão fosfato e radiação gama (10 kGy) para reticulação e esterilização simultânea. As amostras foram avaliadas através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, para verificar diâmetro hidrodinâmico, UV e fluorescência para verificação do conteúdo proteico e estrutura secundária, respectivamente. A atividade enzimática foi avaliada utilizando o substrato N-alfa-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida (BAPA). Parâmetros como concentração proteica, molaridade do tampão, pH, tempo e temperatura de solvatação e taxa de dose foram estudados. Posteriormente, foi realizado estudo da estabilidade por 180 dias e demonstração da capacidade de radiomarcagem utilizando o tecnécio-99m, além da natureza da reticulação e esterilização das amostras. Conclui-se que a síntese otimizada das nanopartículas de papaína ocorre a 10 mg.mL⁻¹ utilizando tampão fosfato 50 mM com (pH 7) à 0°C, tempo de solvatação de 1 a 6 horas e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹. Ao usar essas condições, a formação de nanopartículas ocorrerá de maneira mais efetiva e com atividade proteolítica preservada. A reticulação das nanopapaínas, nas condições descritas acima, ocorrem majoritariamente por natureza intramolecular e apresenta esterilidade na dose estabelecida de 10 kGy. As amostras se mostraram estáveis por até 30 dias quando mantidas sob 0°C. A radiomarcagem com ^{99m}Tc por via direta obteve eficiência de 90% e demonstrou o grande potencial da nanopartícula como nanocarreador.

Palavras chave: Nanopartícula de papaína • Nanocarreador • Reticulação por radiação gama • Condições experimentais • ^{99m}Tecnécio • Radiofármaco.

ABSTRACT

Papain, proteolytic enzyme extracted from the fruit of *Carica papaya* Linnaeus, presents great prospect for drug delivery due to the anti-inflammatory and antitumor proprieties and increased permeation. The present work aims to study variable process conditions of radio-induced synthesis, with the purpose of evaluating the influence of the parameters on the nanoparticle formation and potential for radiopharmaceutical loading. The synthesis was performed in the presence (20%, v/v) and absence of ethanol, phosphate buffer and ionizing radiation at 10 kGy, using ^{60}Co as a radioactive source to promote crosslinking and simultaneous sterilization. The samples were evaluated by dynamic light scattering to verify hydrodynamic diameter, UV and fluorescence for verification of protein content and secondary structure, respectively. The enzymatic activity was evaluated using N-alpha-benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide (BAPA) as specific substrate. Parameters such as protein concentration, buffer molarity, pH, time and temperature of solvation and dose rate were studied in order to evaluate the changes and the effect of each condition on the formation of the nanoparticle. Subsequently, a study of the stability of the samples for 180 days and the efficiency of the radiolabeling with technetium-99m were carried out. Additionally, the nature of protein crosslinking and the sterilization was studied. It was concluded that the optimized synthesis of papain nanoparticles occurs at 10 mg.mL⁻¹ using 50 mM phosphate buffer (pH 6-7) at 0°C, solvation time of 1 to 6 hours and dose rate of 5 kGy.h⁻¹. By using these conditions, the formation of nanoparticles will occur more rapidly, with preserved proteolytic activity and considerable levels of cross-linking. Papain crosslinking are intramolecular and 10 kGy demonstrate sterilized potential. Samples were stable for 20-30 days when kept at 20°C and 0-4°C, respectively. Radiolabeling with technetium by direct route obtained efficiency of 90% and demonstrated great potential as a nanocarrier.

Key words: Papain nanoparticle • Nanocarrier • Crosslinking by gamma radiation • Experimental conditions • $^{99\text{m}}$ Technetium • Radiopharmaceutical.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Enzima proteolítica de interesse biotecnológico.....	2
1.2 Estabilidade enzimática.....	4
1.3 Reticulação induzida por radiação gama.....	5
1.4 Radiomarcagem utilizando ^{99m} Tc.....	8
1.5 Estado da arte.....	10
2.OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Materiais.....	14
3.1.1 Equipamentos.....	16
3.2 Métodos.....	17
3.2.1 Síntese da nanopartícula.....	17
3.2.2 Condições variáveis de processo.....	17
3.2.2.1 Concentração proteica.....	17
3.2.2.2 Molaridade do tampão.....	17
3.2.2.3 Avaliação do potencial hidrogeniônico.....	18
3.2.2.4 Tempo de solvatação.....	18
3.2.2.5 Temperatura de solvatação.....	18
3.2.2.6 Taxa de dose.....	18
3.2.2.7 Estabilidade.....	19
3.2.3 Caracterização.....	20
3.2.3.1 UV e Fluorescência.....	20

3.2.3.2 Bitirosina.....	20
3.2.3.3 Aminoácidos aromáticos.....	20
3.2.3.4 Espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.....	20
3.2.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	21
3.2.3.6 Atividade enzimática.....	21
3.2.3.7 Sonicação.....	21
3.2.3.8 SDS-Page.....	22
3.2.3.9 Quantificação de sulfidril livre.....	22
3.2.3.10 Teste de esterilidade e identificação microbiológica.....	23
3.2.4 Radiomarcção.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Síntese de nanopapaína.....	24
4.2 Avaliação das variáveis de processo.....	30
4.2.1 Concentração proteica.....	30
4.2.2 Molaridade do tampão.....	33
4.2.3 Avaliação do potencial hidrogeniônico	38
4.2.4 Tempo de solvatação.....	41
4.2.5 Temperatura de solvatação.....	46
4.2.6 Taxa de dose.....	50
4.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	55
4.4 Natureza da reticulação proteica.....	56
4.5 SDS-Page.....	60
4.6 Esterilização simultânea.....	62
4.7 Estabilidade.....	64
4.8 Radiomarcção.....	70

5. CONCLUSÕES.....	73
6. BIBLIOGRAFIA.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína com concentrações proteicas variando entre 0.1 a 2.5 mg.mL⁻¹ sintetizadas em banho de gelo (0°C) e irradiadas a 10 kGy com taxa de dose a 5 kGy.h⁻¹.

Tabela 2 - Diâmetro hidrodinâmico versus pH das amostras de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C a 10 kGy com taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ e em diferentes molaridades de tampão, variando entre 1 a 50 mM.

Tabela 3 - Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C à 10 kGy com taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ em pHs variando de 3 a 10.

Tabela 4 - Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas durante 1, 6 e 24 horas antes da irradiação.

Tabela 5 – Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxas de doses variáveis de 0.8, 2, 5 e 10 kGy.h⁻¹.

Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sonicadas por 2 horas à (40 kHz, 137 watts) e grupos -SH livres encontrados utilizando o reagente DTNB e teste de Ellman.

Tabela 7 – Avaliação da esterilidade das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ e previamente inoculadas com 10⁶ UFC mL⁻¹ de C. Xerosis de acordo com as normas da USP 40, NF 35 (2017) e de acordo com a ISO 11737-2:2009.

Tabela 8 – Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade das amostras de

nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} mantidas por 180 dias à 0°C para avaliar estabilidade de acompanhamento.

Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} mantidas por 180 dias à 20°C para avaliar estabilidade acelerada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da papaína refinada em 1,65 Å (9pap.pdb utilizando software JSmol).

Figura 2 - Estrutura da papaína dividida em subunidades, indicando alfa hélice, folha beta, ligações de hidrogênio e pontes de dissulfeto (9pap.pdb utilizando software JSmol).

Figura 3 – Velocidade de reação da enzima, indicando curva de pH ótimo (Adaptado de Nelson e Cox., 2005).

Figura 4 - Efeito da radiação gama na molécula de água (Retirado de: Da Silva et al., 2014).

Figura 5 - Mecanismo de formação da bitirosina composto pela abstração, recombinação e isomerização (Adaptado de Giulivi *et al.*, 2003; Querez *et al.*, 2016)

Figura 6 - Diagrama do decaimento do ^{99}Mo para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{99}Tc de acordo com Marques *et al.*, 2001.

Figura 7 - Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 0.8 kGy.h^{-1} e os controles - papaína nativa, papaína irradiada (10 kGy) e papaína em solução aquosa contendo EtOH (20% EtOH, sem irradiação).

Figura 8 – Espectro de fluorescência de **(A)** bitirosina (λ_{Ex} : 350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) e **(B)** tirosina (λ_{Ex} : 272 nm; λ_{Em} : 297-500 nm) das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 0.8 kGy.h^{-1} .

Figura 9 – Espectro de fluorescência de **(A)** triptofano (λ_{Ex} : 295 nm; λ_{Em} : 320-500 nm) e **(B)** fenilalanina (λ_{Ex} : 260 nm; λ_{Em} : 285-500 nm) das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa

de dose de 0.8 kGy.h⁻¹.

Figura 10 - Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 0.8 kGy.h⁻¹, demonstrando atividades de 80-100% mesmo após processo de irradiação. As atividades da papaína nativa foram consideradas como 100%.

Figura 11 - Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sintetizadas em concentrações proteicas de **(A)** 2.5 mg.mL⁻¹ ; **(B)** 1.0 mg.mL⁻¹ ; **(C)** 0.5 mg.mL⁻¹ e **(D)** 0.1 mg.mL⁻¹. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de onda de λ =280nm.

Figura 12 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sintetizadas em diferentes concentrações proteicas (2.5, 1.0, 0.5 e 0.1 mg.mL⁻¹). As atividades da papaína nativa foram consideradas como 100%.

Figura 13 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sintetizadas com diferentes molaridades de tampão (1, 10, 25 e 50 mM) e água deionizada. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de onda de λ =280nm.

Figura 14 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sintetizadas com diferentes molaridades de tampão (1, 10, 25 e 50 mM) e água deionizada. Os dados de pH correspondem a média aritmética (n=3) de cada

amostra. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Figura 15 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sintetizadas em diferentes pHs (3 a 10). As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de onda de λ =280nm. Os controles de papaína nativa e irradiadas foram considerados sob pH 7.

Figura 16 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sintetizadas em diferentes pHs (3 a 10). A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Figura 17 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas por **(A)** 1 hora, **(B)** 6 horas e **(C)** 24 horas antes da irradiação. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de onda de λ =280nm.

Figura 18 – Espectro de fluorescência de tirosina (λ_{Ex} :272 nm, λ_{Em} : 297-500 nm), (B) triptofano (λ_{Ex} :295 nm, λ_{Em} :320-500 nm) e (C) fenilalanina (λ_{Ex} :260 nm, λ_{Em} : 285-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas por 1 hora.

Figura 19 - Espectro de fluorescência de tirosina (λ_{Ex} :272 nm, λ_{Em} : 297-500 nm), (B) triptofano (λ_{Ex} :295 nm, λ_{Em} :320-500 nm) e (C) fenilalanina (λ_{Ex} :260 nm, λ_{Em} : 285-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹)

irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas por 6 horas.

Figura 20 - Espectro de fluorescência de tirosina (λ_{Ex} :272 nm, λ_{Em} : 297-500 nm), (B) triptofano (λ_{Ex} :295 nm, λ_{Em} :320-500 nm) e (C) fenilalanina (λ_{Ex} :260 nm, λ_{Em} : 285-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas por 24 horas.

Figura 21 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, desolvatadas por 1 hora, 6 horas e 24 horas antes da irradiação. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Figura 22 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a -20, 0 e 20°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de onde de λ =280nm.

Figura 23 - Gráfico do diâmetro hidrodinâmico obtidos para amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a -20, 0 e 20°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹.

Figura 24 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a -20, 0 e 20°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sintetizadas em **(A)** água deionizada e **(B)** tampão fosfato 50 mM. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Figura 25 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a

0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de **(A)** 0.8 kGy.h⁻¹, **(B)** 2 kGy.h⁻¹, **(C)** 5 kGy.h⁻¹ e **(D)** 10 kGy.h⁻¹. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de onda de $\lambda=280\text{nm}$.

Figura 26 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose variando entre 0.8, 2, 5 e 10 kGy.h⁻¹ sintetizadas em **(A)** água deionizada e **(B)** tampão fosfato 50 mM. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Figura 27 - Papaína nativa (A) e nanopapaína (B) (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ realizadas por microscopia eletrônica de transmissão feitas através da técnica de contrastação negativa (NS-TEM) utilizando acetato de uranila 1%.

Figura 28 - Análise estatística por *Kruskal-Wallis* da contagem das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ por comparação de tamanhos e solventes utilizados no preparo das amostras (água e etanol) analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (NS-TEM) utilizando acetato de uranila 1%. As amostras correspondem a (I) papaína nativa, (II) papaína com 20% EtOH diluída em água, (III) papaína irradiada em água, (IV) nanopapaína em água, (V) papaína com 20% EtOH diluída em EtOH e (VI) nanopapaína em EtOH.

Figura 29 - Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sonicadas por 2 horas à (40 kHz, 137 watts).

Figura 30 – Eletroforese com gel de poliacrilamida 12% obtida das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sendo **(M)** Marcador de proteína para amplo peso molecular (10-240 kDa),

(A1) papaína nativa, (A2) papaína nativa sonicada, (B1) papaína irradiada, (B2) papaína irradiada sonicada, (C1) nanopapaína e (C2) nanopapaína sonicada. As amostras foram sonciadas por duas horas à 40 kHz e 135 watts

Figura 31 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} mantidas por 180 dias à 0°C para avaliar estabilidade de acompanhamento.

Figura 32 - Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} mantidas por 180 dias à 20°C para avaliar estabilidade acelerada.

Figura 33 - Esquema de radiomarcção das nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} com $^{99\text{m}}\text{tecnécio}$.

Figura 34 - Contador de radiação da cromatografia em camada fina (ITLC-SG) utilizando solventes diferentes onde (A) acetona e (B) solução piridina, ácido acético e água (3:5:1,5).

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

^{60}Co	Cobalto 60
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio 99 meta estável
^{99}Mo	Molibdênio 99
Aq	Aquoso
BAPA	N-alfa-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
Em	Emissão
EtOH	Etanol
Ex	Excitação
Fe_3O_4	Óxido de ferro (III)
H_2O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	Pertecnetato de sódio
NS	Contrastação negativa
SnCl_2	Cloreto de estanho (II)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

°C	Grau Celsius
d	Diâmetro
keV	Kilo elétron-volt
kGy	Kilo Gray
kGy.h ⁻¹	Kilo Gray por hora
mg	Miligrama
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
µm	Micrômetro

1. INTRODUÇÃO

O uso de proteínas vegetais, como a papaína e a bromelina, e animais, como a albumina do soro bovino, vêm sendo estudadas ao longo dos anos, em escala nanotecnológica, por possuírem características importantes na prevenção e no tratamento de doenças e feridas (Lopes *et al.*, 2008). Entretanto, as moléculas nativas apresentam, majoritariamente, instabilidade química e biológica. Neste caso, as nanopartículas surgem como possibilidade de aumentar a estabilidade da molécula, além de melhorar as propriedades das proteínas (Esmaili *et al.*, 2011). O tamanho da partícula, neste caso, é essencial para a aplicação biomédica, pois pode aumentar e melhorar a absorção de fármacos para liberação controlada.

Entre outras características essenciais, as nanopartículas se destacam também pela possibilidade de administração por várias vias (oral, nasal, parentérica, intraocular, etc.) além de possuir ou permitir o direcionamento para tecidos ou sítios específicos como inflamados e cancerosos (Avnir *et al.*, 2011). Desta forma, constituem alternativa terapêutica para diagnóstico e tratamento de diferentes tipos de câncer como pulmão, mama e ovário, dentre outros (Babapoor *et al.*, 2011; Wahome *et al.*, 2012). Exemplos do emprego destas nanopartículas compreendem à nanopartículas ligadas ao paclitaxel, um potente quimioterápico antineoplásico, comercializado como abraxane® (Gradishar, 2005; Elsadez e Kratz, 2012).

A papaína, enzima proteolítica de origem vegetal, é conhecida por seu efeito promotor de absorção cutânea, onde é capaz de auxiliar na passagem de moléculas sobre a principal barreira da pele: o extrato córneo (Sim *et al.*, 2003). Seu emprego visa garantir e assegurar a boa penetração do medicamento e melhor eficácia do

ativo (Lopes *et al.*, 2008). A O direcionamento específico junto ao efeito promotor confere a papaína grande potencial em aplicação como nanocarreador de radiofármacos para aplicação em teranóstica, a saber terapia e diagnostico em uma única molécula.

1.1 Enzima proteolítica de interesse biotecnológico

A papaína (E.C. 3.4.22.2) é uma enzima extraída do fruto da *Carica papaya* Linnaeus, com peso molecular de 23,4 kDa e ampla atividade proteolítica. Foi citada como uma das primeiras proteínas a ter sua estrutura tridimensional (**Figura 1**) determinada (Drenth e Jansonius, 1967). Em 1984, Kamphius e colaboradores adicionaram informações sobre a estrutura da proteína, determinando o dobramento da cadeia em dois domínios (R e L) de tamanhos semelhantes e conformações diferentes, possibilitando a formação de um vale na superfície da enzima.

Figura 1 - Estrutura da papaína refinada em 1,65 Å (9pap.pdb utilizando software JSmol).

A estrutura da papaína é composta por 212 aminoácidos, entre eles a cisteína (Cis25), a histidina (His159) e a asparagina (Asn175) (Szabó et al, 2006) que compõe o sítio ativo da enzima. Sua estrutura secundária é composta de 25% de hélices (contendo 7 hélices e 55 resíduos) e 21% folha beta (com 17 vertentes; 45 resíduos) (**Figura 2**). A temperatura ótima de trabalho da papaína nativa é 65°C, além de apresentar pH ótimo (correspondente a máxima atividade) entre 6 e 7 (Mitchel *et al.*, 1970; Kilara *et al.*, 1977). O ponto isoelétrico (pI), pH onde as cargas positivas se igual a cargas negativas apresentando carga nula, está entre 8.75 e 9.55 (Sluyterman e Graaf, 1972). Isso significa que se a enzima for colocada em uma solução com pH inferior ao pI, os grupos funcionais tendem a adquirir carga positiva pois serão protonados (captam H⁺), e respectivamente, quando estiver em um pH maior que o pI, os grupos funcionais terão carga negativa pois estarão desprotonados (perdem H⁺). Como o pI está diretamente ligado aos grupos funcionais, isso pode influenciar diretamente na atividade enzimática.

Figura 2 - Estrutura da papaína dividida em subunidades, indicando alfa hélice, folha beta, ligações de hidrogênio e pontes de dissulfeto (9pap.pdb utilizando software JSmol).

Produtos à base de papaína com aplicação em curativos já estão disponíveis comercialmente devido à sua propriedade debridante, além de características anti-inflamatória, anti-infeciosa e antidiabéticas. A papaína também dispõe de propriedades antitumorais e grande perspectiva para carreamento de fármacos (Varca *et al.*, 2014a; Muller *et al.*, 2016)

Muller e colaboradores (2016) compararam a papaína e a bromelina (mistura proteolítica derivada da família *Bromeliaceae*) em ensaios *in vitro* para relatar o efeito anticancerígeno em tumor colangiocarcinoma (CC) – células epiteliais que revestem o tecido intra e extra-hepático do sistema biliar. O estudo demonstrou que ambas as enzimas são eficazes e inibem a proliferação das células, indicando-as como potencial terapia em tumor CC.

1.2 Estabilidade enzimática

Dentro de certos limites, a velocidade de uma reação enzimática tende a diminuir ou a aumentar, de acordo com sua reação catalítica em análise. Essa mudança comportamental provoca agitação nas moléculas e maior possibilidade delas se chocarem para reagir. Pontos extremos podem ser intensos a ponto de romper ligações e desnaturar enzimas (Borella *et al.*, 2016). Parâmetros como temperatura, pH ou presença de sais podem influenciar diretamente na atividade e estabilidade enzimática, sendo causa problemática pois a bioatividade é parâmetro essencial para o desenvolvimento de atividade terapêutica (Borella *et al.*, 2015).

A faixa de atividade máxima apresentada por uma enzima é chamada de parâmetro ótimo de trabalho, por exemplo, pH ótimo / atividade ótima (**Figura 3**). A maioria das enzimas apresenta faixa de pH ótimo entre 6 e 8, mas há exceções, assim como a temperatura ótima pode variar de 30 a 60°C (Nelson e Cox, 2005).

Figura 3 – Velocidade de reação da enzima, indicando curva de pH ótimo (Adaptado de Nelson e Cox., 2005).

Problemas comuns na utilização da papaína estão diretamente relacionados com a instabilidade química e atividade enzimática afetada, provenientes principalmente por mudanças de temperatura e tempo de estocagem (Borella *et al.*, 2016). Amostras de papaína demonstraram atividade enzimática mais estável quando armazenadas em baixas temperaturas (5-10°C).

O uso de excipientes, ou adjuvantes farmacotécnicos, utilizados para conferir características específicas como viscosidade, aumento de solubilidade etc. (Allen Jr. *et al.*, 2007), também são componentes que podem interferir na estabilidade do princípio ativo e aumentar a proliferação de microrganismos (Pinto, 2005 e Miura, 2012).

1.3 Reticulação induzida por radiação gama

Técnicas conhecidas de reticulação de nanopartículas propõe o uso de um reticulante químico para promover as ligações covalentes entre as moléculas. Embora os reticulantes químicos promovam a reticulação desejada, há a possibilidade de gerar resíduos tóxicos, restringindo seu uso em aplicações

biomédicas e áreas relacionadas, além da necessidade de etapas de lavagem necessárias a remoção adequada do agente reticulante, tóxico por natureza. Como alternativa, o uso da radiação para induzir reticulação ou formação de ligações covalentes de natureza intra- ou intermolecular foi explorado por Ulanski e colaboradores (1998, 1999) e tem como vantagem a possibilidade de permitir o controle da reticulação, sem a necessidade de agentes reticulante, além de promover a esterilização do meio simultaneamente, essencial para uso biomédico (Kadlubowski, 2014), sem a formação de subprodutos tóxicos.

Conforme descrito por Soto Espinosa e colaboradores (2012), e mais recentemente Queiroz e colaboradores (2016), a exposição de albumina (proteína globular) à radiação ionizante promove a reticulação e permite o controle de tamanho da nanopartícula. Varca e colaboradores (2014a e 2014b) utilizaram métodos similares para demonstrar que a papaína na presença de etanol e irradiada a 10 kGy apresenta tamanho controlado e a atividade enzimática preservada quase em sua totalidade.

Embora os mecanismos radioquímicos relacionados as reticulações proteicas induzidas por radiação ainda permaneçam não totalmente esclarecidos, a síntese de nanopartículas induzida por radiação, em solução aquosa, ocorre majoritariamente por meio dos radicais livres gerados a partir da radiólise da água (**Figura 4**) (Le Caer, 2011). De maneira mais específica, em função da interação da radiação com a água, a radiólise leva a formação de espécies tais como os íons e_{aq}^- , H_2O^+ , $OH^\cdot$, $H_2O^\cdot$, H^+ e radicais $OH^\cdot$, $H^\cdot$, $HO_2^\cdot$, sendo que o e_{aq}^- e $OH^\cdot$ são as espécies que apresentam maior efeito redutor e oxidante, respectivamente (Dzaugis *et al.*, 2015).

Figura 4 - Efeito da radiação gama na molécula de água (Retirado de: Da Silva *et al.*, 2014).

A exposição das proteínas a essas espécies provoca mudanças conformacionais (Giulivi *et al.*, 2003) levando a proteína a condições de estresse oxidativo, e em alguns casos formando ligações de bitirosina (Bian e Chowdhury, 2014), até o momento, atribuídas como uma das principais ligações envolvidas na reticulação proteica.

A formação da bitirosina em proteínas ocorre em 3 etapas: abstração do hidrogênio, seguida da recombinação e por último a isomerização (**Figura 5**), no qual é possível determinar por meio da reticulação se a bitirosina foi formada. (Giulivi *et al.*, 2003).

Figura 5 - Mecanismo de formação da bitirosina composto pela abstração, recombinação e isomerização (Adaptado de Giulivi *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2016)

1.4 Radiomarcação utilizando ^{99m}Tc

Além dos sistemas nanoparticulados, outro agente importante na busca pelo diagnóstico e tratamento de câncer, são os radiofármacos. Neste caso, a substância emissora de radiação, ou o denominado radioisótopo, é aplicada na área de medicina nuclear e possui características promissoras na detecção, imagem e pesquisa sobre possíveis tratamentos de células cancerígenas (Marques *et al.*, 2001 e Brito *et al.*, 2012).

Atualmente, os radiofármacos a base de tecnécio-99m correspondem a 80% do serviço na área de medicina nuclear. Este elevado índice de utilização é consequência da praticidade da obtenção do radioisótopo a partir de um sistema gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) (**Figura 6**) e das boas propriedades físicas e químicas, como meia-vida física de 6 horas, decaimento por emissão de radiação gama pura, fótons de 140 keV (Marques *et al.*, 2001) e baixo índice de efeitos colaterais desses agentes (Hesslewood e Keeling, 1997).

A utilização do ^{99m}Tc possibilita também imagens com ótimas resoluções sem

comprometer o paciente em relações dosimétricas (Araújo, 2005 e Santos-Cuevas *et al.*, 2017).

Figura 6 - Diagrama do decaimento do ^{99}Mo para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{99}Tc de acordo com Marques *et al.*, 2001.

A técnica denominada radiomarcagem consiste em conjugar uma molécula com um composto radioativo com o propósito de melhorar a absorção do radiofármaco no sistema, dentre outros aspectos. French e colaboradores (2010) avaliaram a utilização de nanocarreadores como facilitadores de distribuição de radiofármacos no organismo. Este estudo, quando comparado com métodos sem nanocarreadores, mostrou-se mais satisfatório, pois acarretou menores efeitos colaterais e o volume tumoral estudado reduziu significativamente. Foi constatado também que o nanocarreador libera o radiofármaco gradativamente no organismo, mantendo uma atividade radioativa fracionada que desempenha um papel de eficácia no tratamento de tumores (Box, 2011).

Nanocarreadores à base de quitosana (Banerjee *et al.*, 2005), cloranfenicol revestido com PLGA (Halder *et al.*, 2008) e nanopartículas magnéticas já foram

estudados utilizando ^{99m}Tc como radiofármaco (Tsai *et al.*, 2014). No caso da quitosana radiomarcada com ^{99m}Tc , observou-se eficiência de radiomarcção superior a 90% e radioatividade no fígado e baço (Banerjee *et al.*, 2005).

Por outro lado, o estudo envolvendo o antibiótico cloranfenicol revestido com nanopartículas de PLGA e radiomarcados com tecnécio-99m revelou utilidade do sistema para administração de uso prolongado do fármaco (Halder *et al.*, 2008), enquanto a nanopartícula metálica (Fe_3O_4) marcada com pertecnetato de Tc-99m mostrou alta eficiência e estabilidade de marcação (Tsai *et al.*, 2014). Seguindo modelos de moléculas radiomarcadas com ^{99m}Tc estudados previamente, este trabalho visou demonstrar a capacidade de emprego da nanopartícula à base de papaína como nanocarreador, utilizando o ^{99m}Tc como radiofármaco modelo.

1.5 Estado da arte

Nanopartículas à base de enzimas são consideradas um avanço tecnológico com relação a seu emprego para aplicações biomédicas, dada à sua natureza biológica, além de apresentarem, na maioria das vezes, elevada biocompatibilidade (Silva *et al.*, 2010). Limitações inerentes a enzimas, como baixa estabilidade e alta sensibilidade a condições variadas de processamento podem ser melhoradas através da nanoestruturação e/ou interação com outro componente químico, seja ele metálico (Wang *et al.*, 2015; Sheng *et al.*, 2018) ou polimérico (DevRaj *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2013).

A papaína, possui boa perspectiva de aplicação em diversas áreas, como biocatálise (Guo *et al.*, 2016), biosensores (Desai *et al.*, 2018), no diagnóstico e tratamento de doenças (Chen *et al.*, 2017 e Liu *et al.*, 2017), carreamento de drogas

(Leichner *et al.*, 2017), entre outros.

Com relação à pesquisa relacionada ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de sistemas para carreamento de fármacos, diversas técnicas e produtos foram desenvolvidos nos últimos anos, dentre eles: Agregados de enzimas reticuladas com aplicação em biocatalisadores (Sheldon, 2011), paclitaxel ligado à albumina como o Abraxane® (Gradishar, 2005), além do desenvolvimento de produtos à base de papaína para aplicações biomédicas (Singh e Singh, 2012).

Além disso, podem ser sintetizadas por várias rotas, entre elas a preparação de complexos em solução aquosa (Muller *et al.*, 2013), por radiação utilizando ^{60}Co como fonte radioativa (Varca *et al.*, 2014a) ou por feixe de elétron (*electron beam*), (Varca *et al.*, 2016) e tendem a não apresentar toxicidade significativa (Tarhini *et al.*, 2017).

Sabe-se que a síntese de nanopartículas de papaína induzida por radiação gama, utilizando o etanol como cosolvente, leva a produção de nanopartículas de tamanho controlado e com elevado potencial para carreamento de fármacos. Estudos recentes mostram a comparação dos resultados em que a nanopartícula de papaína foi sintetizada em condições variáveis de etanol (0-40%) e na presença de cloreto de sódio (0-25%), e que, neste caso, o etanol apresentou resultados melhores quanto a distribuição de tamanho das nanopartículas de papaína (Varca *et al.*, 2014a).

A influência de diferentes doses de radiação gama (2.5, 5, 7.5 e 10 kGy com taxa de dose de 1.2 kGy.h^{-1} no momento do estudo) foram avaliadas, assim como o aumento de escala na concentração final de papaína, variando de 12.5 à 50 mg.mL^{-1}

¹. Observeu-se que o aumento da concentração de papaína não influenciou diretamente na formação de nanopartícula de papaína. Contudo, melhores resultados foram obtidos utilizando dose de 10 kGy (Varca *et al.*, 2014b).

Com o intuito de obter uma comparação ao gamacell, Varca e colaboradores (2016) realizaram um trabalho onde as amostras foram irradiadas utilizando feixe de elétron (*electron beam*), utilizando taxa de dose superior ($6.8 \text{ kGy} \cdot \text{min}^{-1}$), doses que variaram de 2.5 a 10 kGy, além de estudar a síntese em diferentes atmosferas, como de argônio e óxido nítrico. O resultado final, assim como as amostras tratadas em irradiador gammacell, foram partículas com tamanho controlado.

Com relação a influência da atmosfera, observou-se que a atmosfera é um parâmetro relevante na atividade residual das amostras, uma vez que na presença de argônio e óxido nítrico o sistema saturado se mostrou mais efetivo na preservação da bioatividade frente as nanopartículas sintetizadas em atmosfera contendo oxigênio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A presente dissertação teve como objetivo desenvolver e otimizar a síntese de nanopartícula bioativa à base de papaína sintetizada por radiação e demonstrar potencial emprego da nanopartícula de papaína como nanocarreador de radiofármacos.

2.2 Objetivos específicos

- Estudo da síntese radio-induzida do nanocarreador em condições variadas de processo;
- Determinação a influência de parâmetros como pH, molaridade do tampão, taxa de dose de irradiação e concentração proteica na formação da nanopartícula;
- Avaliação da estabilidade das nanopartículas frente à temperatura, tempo de solvatação e armazenamento;
- Determinação da capacidade de ligação da nanopapaína com o ^{99m}Tc ;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados na pesquisa apresentavam de grau de pureza analítico ou equivalente e os seguintes materiais foram utilizados durante a pesquisa:

- β -Mercaptoetanol (Labsynth[®]);
- Acetato de uranila (Sigma Aldrich[®]);
- Acetona (Labsynth[®]);
- Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (Sigma Aldrich[®]);
- Ácido acético (Labsynth[®]);
- Ácido bórico (Labsynth[®]);
- Ácido cítrico (Labsynth[®]);
- Ácido etilenodiamino tetracético (Labsynth[®]);
- Acrilamida (Labsynth[®]);
- Álcool etílico absoluto (Labsynth[®]);
- Álcool metílico absoluto (Labsynth[®]);
- Azul de bromofenol (Labsynth[®]);
- Bis-acrilamida (Labsynth[®]);
- Cloreto de sódio (Labsynth[®]);
- Coomassie blue G250 (Labsynth[®]);
- *Corynebacterium xerosis* (ATCC[®] 373 TM);
- Dimetilsulfóxido (Labsynth[®]);
- Dodecilsulfato de sódio (Labsynth[®]);
- Fosfato de sódio bibásico anidro (Labsynth[®]);

- Fosfato de sódio monobásico anidro (Labsynth®);
- Fosfato de sódio tribásico dodecahidratado (Labsynth®);
- Glicerina (Labsynth®);
- Hidróxido de sódio (Labsynth®);
- L-cisteína (Labsynth®);
- Marcador de proteína para amplo peso molecular (10-240 kDa) (Thermo Scientific®);
- N-alfa-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida (Sigma Aldrich®);
- Papaína 30.000 USP-U/mg (Sigma Aldrich®);
- Piridina (Labsynth®);
- Persulfato de amônio (Labsynth®);
- Tetrametiletenodiamina (Sigma Aldrich®);
- Tris (aminometano) (Labsynth®);

3.1.1 Equipamentos

- Banho de água termostatizado (QUIMIS®);
- Banho ultrassônico Ultra Cleaner 1400 (Unique®, Brasil);
- Calibrador de atividade CRM™ – 35R (Carpintec®);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) modelo D5002, cobra II, auto gama (Camberra®);
- Detector de radiação Raytest Gabi, (Agilent Technologies®);
- Gerador molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN);
- Irradiador Multipropósito (IPEN);
- Irradiador tipo Gammacell (Atomic Energy of Canada Ltd®);
- Leitor de microplacas SpectraMax i3 Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices®);
- Microscópio eletrônico de transmissão NS-TEM (JEOL®);
- PHmetro modelo SevenCompact S220 (Mettler Toledo®);
- PowerPac para eletroforese vertical (Bio-Rad®, USA);
- Zetasizer Nano ZS90 (Malvern®);

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese da nanopapaína

As nanopartículas de papaína foram sintetizadas na concentração de 10 mg.mL⁻¹, 20% de etanol (v/v) e tampão fosfato 50mM (pH 7.2), sob banho de gelo durante o processo, segundo a técnica de Varca e colaboradores (2014 e 2016). As amostras foram expostas a radiação gama a fim de receber dose de 10 kGy e 5kGy.h⁻¹. Em paralelo foram mantidos sob as mesmas condições os controles contendo: papaína nativa (sem etanol e sem irradiar), papaína irradiada (sem etanol, irradiada a 10 kGy) e papaína com etanol (20% de etanol (v/v), sem irradiar).

3.2.2 Condições variáveis de processo

As nanopartículas de papaína e devidos controles foram sintetizadas em condições variáveis de processo, conforme descrito abaixo. Todas as sínteses foram realizadas em triplicatas e o resultado final demonstrado em gráficos e tabelas equivalem a média dos três pontos encontrados.

3.2.2.1 Concentração proteica

As nanopartículas de papaína foram sintetizadas em diversas concentrações proteicas, variando entre 2,5; 1; 0,5 e 0,1 mg.mL⁻¹, além da concentração padrão pré-estabelecida de 10 mg.mL⁻¹ (Varca *et al.*, 2014b).

3.2.2.2 Molaridade do tampão

A influência molaridade do tampão fosfato na síntese das nanopartículas foi avaliada na faixa de 1-50 mM, especificamente utilizando 1, 10, 25 e 50 mM. Adicionalmente a síntese foi feita na presença de água deionizada, como controle

negativo.

3.2.2.3 Avaliação do potencial hidrogeniônico

Para compreender o efeito do pH na formação da nanopartícula de papaína, a síntese foi nas condições da síntese padrão, variando-se o pHs entre 3 e 10. O tampões ácidos (3 a 6) foram feitos através de mistura de ácido cítrico 50 mM e ácido bórico 20 mM e os tampões básicos (8 a 10) utilizando fosfato de sódio tribásico dodecahidratado 0.1 M. O potencial hidrogeniônico foi medido através de um PHmetro modelo SevenCompact S220 (Mettler Toledo®).

3.2.2.4 Tempo de solvatação

A fim de determinar a influência do tempo de solvatação, após a adição do etanol (0°C), as amostras ficaram em repouso por 1, 6 e 24 horas antes de serem irradiadas. Após a irradiação, as amostras foram armazenadas a 0°C ± 2°C.

3.2.2.5 Temperatura de solvatação

Visando compreender o efeito da temperatura de irradiação na formação da nanopartícula, as amostras foram submetidas à radiação em condições distintas de temperatura, como em temperatura ambiente (20°C ± 2°C), em condições criogênicas (-20°C ± 2°C) e em banho de gelo (0°C ± 2°C). As amostras criogênicas foram congeladas em freezer tradicional e a temperatura foi controlada através de termo higrômetro digital.

3.2.2.6 Taxa de dose

A avaliação da influência da taxa de dose foi realizada mediante irradiação

das amostras utilizando taxas de dose de 2, 5 e 10 kGy.h⁻¹ em irradiador multipropósito. Adicionalmente, taxa de doses inferiores a 1 kGy.h⁻¹, tais como 0.8 kGy.h⁻¹ foram avaliadas utilizando irradiador do tipo Gamacell (Atomic energy limited, Canada).

3.2.2.7 Estabilidade

As amostras foram analisadas de acordo com os testes de estabilidade descritos pela ANVISA (Brasil, 2005), a fim de determinar estabilidade acelerada e estabilidade de acompanhamento bem como determinar um prazo de validade para as amostras.

Ensaio de estabilidade acelerada

A nanopartícula de papaína e amostras controle foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada no período de 6 meses. As amostras foram mantida a 20°C ± 2°C e avaliadas por métodos de espalhamento dinâmico de luz e atividade enzimática.

Estabilidade de acompanhamento

A avaliação da estabilidade de acompanhamento da nanopartícula de papaína foi realizada por período de 6 meses (a contar da síntese) nos tempos 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias sob armazenamento à 0°C ± 2°C. As amostras foram avaliadas quanto a atividade enzimática e espalhamento dinâmico de luz.

3.2.3 Caracterização

Após o processo de irradiação, as amostras de papaína foram previamente filtradas utilizando filtro de seringa com membrana de celulose regenerada (Chromafil® Xtra RC-20/25) (0.45 μm) e caracterizadas por técnicas de espectrofotometria de ultravioleta (UV), fluorescência, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e por microscopia eletrônica de transmissão por contratação negativa (NS-TEM), a fim de entender as mudanças estruturais e padronizar a nanopartícula.

3.2.3.1 UV e Fluorescência

O conteúdo proteico foi analisado por espectrofotometria utilizando comprimento de onda $\lambda_{280\text{nm}}$. Ajustes de concentração foram realizados utilizando tampão 50 mM de modo a atingir equivalência em absorbância próximo a 0,2.

3.2.3.2 Bitirosina

O espectro de fluorescência da bitirosina foi verificado em λ_{Ex} : 350 nm e λ_{Em} : 375-500 nm).

3.2.3.3 Aminoácidos aromáticos

O espectro de fluorescência da tirosina foi verificado utilizando λ_{Ex} 272 nm e λ_{Em} 297-500 nm. O triptofano foi encontrado em λ_{Ex} : 295 nm e λ_{Em} : 320-500 nm. Para determinação da fenilalanina, utilizou-se λ_{Ex} : 260 nm e λ_{Em} : 285-500 nm.

3.2.3.4 Espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e seus controles foram estimados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em Zetasizer Nano ZS90

(Malvern®) à temperatura de 20°C, utilizado ângulo de 173° e 10 corridas de 10 segundos para cada amostra. O potencial Zeta foi medido nas mesmas condições, ambos em conformidade com os padrões estabelecidos pela ISO 13321 e ISO 22412.

3.2.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram transferidas para os *grids* e foi adicionado o acetato de uranila a 1%. Foi verificado o tamanho e forma da nanopartícula por microscopia eletrônica de transmissão por constatação negativa (NS-TEM).

3.2.3.6 Atividade enzimática

Para o estudo da determinação da atividade enzimática da papaína foi utilizado o substrato específico N-alfa-Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida (BAPA). O substrato foi diluído em dimetilsulfóxido e estocado no freezer até o preparado das amostras. As amostras foram diluídas em tampão fosfato 50mM contendo fosfato de sódio bibásico anidro, L-cisteína e EDTA e pH acertado para 7 utilizando solução de hidróxido de sódio 1M. As amostras permaneceram em banho de água termostaticado (QUIMIS®) por 45 minutos a 40°C. A absorbância foi registrada no comprimento de onda de 405 nm em um leitor de microplacas i3 SpectraMax (Molecular Devices, EUA) (Ferraz *et al*, 2014).

3.2.3.7 Sonicação

As amostras foram sonicadas por 2 horas na frequência de 40 kHz a 135 Watts (RMS) usando um banho ultrassônico Ultra Cleaner 1400 (Unique, Brasil).

3.2.3.8 SDS-Page

Alíquotas de nanopartícula de papaína e respectivos controles (papaína nativa, irradiada e com etanol) foram aquecidos a 90°C por 5 minutos e diluído em tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol e dodecilsulfato de sódio como agente denaturante. Os tampões de corrida e empilhamento foram feitos com tris (aminometano) e o tampão de amostra, contendo azul de bromofenol e glicerina. O persulfato de amônio foi utilizado para polimerização do gel e a tetrametiletilenodiamina para aceleração da reação. As amostras foram corridas em gel de poliacrilamida (bis-acrilamida e acrilamida) a 12% e gel de empilhamento a 4%, utilizando marcador de proteína de ampla gama (10 a 260 kDa), 90 V e aproximadamente 45 mA. O gel foi corado durante 12 horas com solução de *coomassie blue* e descorado com solução de ácido acético e metanol. A eletroforese foi realizada em um *PowerPac* básico mini vertical (Bio-Rad, USA). O procedimento foi realizado de acordo com Laemmli (1970).

3.2.3.9 Quantificação de sulfidril livre

O teor de sulfidril livre foi determinado através do teste de Ellman (Ellman, 1959). Alíquotas de 500 μ L de papaína nativa, irradiada e nanopapaína foram retiradas e diluídas em 2,5 mL de tampão fosfato 50 mM pH 8, antes e após sonicação, seguido da adição de 50 μ L de DTBN (0,4% w/v). As amostras foram agitadas durante 2 minutos e incubadas a 20°C por 15 minutos. A curva de calibração foi determinada utilizando uma solução de cisteína para obtenção da curva padrão de teor de sulfidril livre. O resultado foi calculado através da interpolação da curva de calibração de cisteína para estimar o grupo -SH livre. O experimento foi realizado em leitor de placas SpectraMax i3 Multi-Mode (Molecular

Devices, USA) no comprimento de onda de 412 nm.

3.2.3.10 Teste de esterilidade e identificação microbiológica

A nanopapaína e seus devidos controles foram submetidos ao teste de esterilidade antes e depois da inoculação com *C. xerosis* a fim de atingir 10^6 UFC.mL⁻¹ de uma solução padrão de *Corynebacterium xerosis* (ATCC® 373™)..

A garantia da esterilidade foi testada por uma empresa independente e acreditada (Controlbio Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda, Brasil) usando a inoculação direta conforme descrito no guia de Teste de Esterilidade da farmacopéia americana (United States Pharmacopeia 40, NF 35, 2017) e de acordo com a ISO 11737-2:2009. As amostras foram inoculadas em meio de cultura e incubadas por 14 dias com verificação diária.

A identificação foi realizada de acordo com a norma 1113 da Farmacopéia Americana (USP 40, NF 35, 2017) utilizando mini sistema BBL™Crystal™. Após a inoculação, a identificação foi realizada utilizando microcultura em placa seguida de análise em microscópio ótico (Lacaz *et al.*, 1998).

3.2.4 Radiomarcagem

O radiofármaco utilizado para a etapa da radiomarcagem foi o tecnécio (^{99m}Tc). O sistema de geração molibdênio-99/tecnécio-99m (⁹⁹Mo/^{99m}Tc) é composto por uma coluna cromatográfica empacotada com óxido de alumínio, onde encontra-se adsorvido, por afinidade eletrônica, o molibdato. O tecnécio-99m foi eluído em solução de cloreto de sódio 0,9% na forma de pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄) e a atividade aferida calibrador de atividade CRM™ – 35R (Carpintec®).

O procedimento foi realizado segundo Faintuch e colaboradores (2005), onde foi empregado o uso de agentes redutores para a radiomarcção dos conjugados. A conjugação foi realizada através da marcação direta, onde a nanopapaína foi adicionada a uma alíquota de pertecnetato de sódio e cloreto de estanho dihidratado. Uma gota da amostra conjugada foi adicionada a uma fita para corrida em cromatografia de camada fina. Uma das extremidades da fita foi mergulhada em soluções de acetona e piridina:ácido acético:água. Após o fim da corrida, as fitas foram cortadas em 5 pedaços iguais e analisadas quanto a sua radioatividade através de um contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) modelo D5002, cobra II, auto gama.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese de nanopapaína

Inicialmente, as nanopartículas de papaína foram sintetizadas conforme previamente estudado e publicado por Varca e colaboradores (Varca *et al.*, 2014 e 2016) a fim de obter nanopartículas reprodutíveis para comparação com demais amostras propostas neste estudo. Para isto, as amostras padrões foram sintetizadas na concentração proteica de 10 mg.mL⁻¹, na presença de 20% de etanol absoluto (v/v), irradiadas a 10 kGy (0.8 kGy.h⁻¹) e utilizando banho de gelo (Varca *et al.*, 2014)

Quando se fala em nanopartícula, um parâmetro essencial a ser analisado em todas as etapas do processo é o tamanho. Através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, observou-se que os tamanhos da papaína nativa e papaína irradiada (10 kGy) eram de aproximadamente 4.0 ± 1.0 nm e os tamanhos das amostras de papaína com etanol e nanopapaína foram de 8.0 ± 1.0 nm conforme ilustrado na **figura 7**.

Figura 7 - Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 0.8 kGy.h⁻¹ e os controles - papaína nativa, papaína irradiada (10 kGy) e papaína em solução aquosa contendo EtOH (20% EtOH, sem irradiação).

Após a irradiação, as nanopartículas foram previamente filtradas utilizando filtro de seringa com membrana de celulose regenerada (Chromafil® Xtra RC-20/25) (0.45 µm) e diluídas em tampão fosfato 50 mM (pH 7,2) até atingirem absorvância entre 0.2-0.4, conforme leitura em espectro de UV a λ 280 nm. Para verificação da bitirosina (**Figura 8a**), a amostra foi analisada em λ_{Ex} 350 nm e λ_{Em} 375-500 nm. Observou-se que a papaína nativa possui uma ligação de bitirosina, contudo, após irradiada este perfil cresce na ordem de 225% para a amostra irradiada e cerca de 150% para as amostras de nanopapaína, demonstrando uma grande contribuição da irradiação nesta etapa.

Por outro lado, a emissão da tirosina (**Figura 8b**) (λ_{Ex} 272 nm; λ_{Em} 297-500 nm) apresentou perfil contrário. A papaína nativa apresenta grande quantidade de tirosinas enquanto a amostra irradiada e nanopapaína apresentam tirosinas livres

em menor escala. Isso se deve ao fato de que as tirosinas formam ligações de bitirosinas durante o processo de irradiação, além de uma possível degradação por ação direta ou indireta dos radicais, que acarreta na oxidação destes resíduos.

Figura 8 – Espectro de fluorescência de **(A)** bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) e **(B)** tirosina (λ_{Ex} : 272 nm; λ_{Em} : 297-500 nm) das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 0.8 kGy.h⁻¹ e controles.

Outros aminoácidos aromáticos como triptofano e fenilalanina também foram avaliados após a síntese das nanopartículas de papaína. O triptofano (**Figura 9a**) foi avaliado por fluorescência nos comprimentos de onda de λ_{Ex} 295 nm; λ_{Em} 320-500 nm e a fenilalanina (**Figura 9b**) em λ_{Ex} 260 nm; λ_{Em} 285-500 nm. Para estes aminoácidos, observou-se o mesmo perfil encontrado na tirosina: papaína nativa > nanopapaína > papaína irradiada, respectivamente, evidenciando um ataque a estes radicais. Adicionalmente, observou-se que a tirosina tende a receber maior dano da radiação comparado aos outros aminoácidos, e por isso apresenta maior alteração no sinal (Lal *et al.*, 1997).

Figura 9 – Espectro de fluorescência de **(A)** triptofano (λ_{Ex} : 295 nm; λ_{Em} : 320-500 nm) e **(B)** fenilalanina (λ_{Ex} : 260 nm; λ_{Em} : 285-500 nm) das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 0.8 kGy.h⁻¹

Com relação a atividade enzimática, observou-se que após o processo de irradiação, a nanopartícula de papaína perde cerca de 20% de sua atividade inicial – resultado comparado considerando papaína nativa com 100% de atividade – conforme demonstrado na **Figura 10**, corroborando resultados reportados anteriormente para papaína (Varca *et al.*, 2014b; Varca *et al.*, 2016).

Figura 10 - Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 0.8 kGy.h⁻¹, demonstrando atividades de 80-100% mesmo após processo de irradiação. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

A inativação de enzimas em solução induzida pela radiação é conhecida por ocorrer por via indireta. Os ataques de radicais livres resultantes da radiólise do solvente impactam na atividade enzimática por comprometer a ligação do substrato devido a mudanças conformacionais ou via modificação direta do sítio ativo (Saha *et al.*, 1995).

No caso da papaína, a oxidação induzida pela radiação da cisteína-25, um dos aminoácidos que formam o sítio ativo (característica das proteases da cisteína), é a via mais provável para essa inativação.

4.2 Avaliação das variáveis de processo

4.2.1 Concentração proteica

Altas concentrações de papaína (12.5 – 50 mg.mL⁻¹) já foram testadas anteriormente e observou-se que o aumento da concentração não influencia diretamente na formação de nanopartículas de papaína (Varca *et al.*, 2014b).

Visando compreender a contribuição do conteúdo proteico na formação das nanopartículas, foram utilizadas concentrações até 100 vezes menores de papaína (em relação à concentração padrão de 10 mg.mL⁻¹) para realização da síntese, sendo elas: 2.5, 1, 0.5 e 0.1 mg.mL⁻¹. De acordo com a **tabela 1**, observou-se uma alteração no tamanho em baixas concentrações proteicas.

Tabela 1 - Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína com concentrações proteicas variando entre 0.1 a 2.5 mg.mL⁻¹ sintetizadas em banho de gelo (0°C) e irradiadas a 10 kGy com taxa de dose a 5 kGy.h⁻¹.

Concentração proteica	Papaína nativa	Papaína irradiada	Nanopapaína
	Tamanho (d. nm)		
2.5 mg.mL ⁻¹	3.5 ± 0.9	3.4 ± 0.9	6.6 ± 1.7
1 mg.mL ⁻¹	3.9 ± 0.9	2.9 ± 0.8	6.9 ± 1.6
0.5 mg.mL ⁻¹	3.3 ± 0.9	4.2 ± 1.5	1.3 ± 0.2
0.1 mg.mL ⁻¹	1.7 ± 0.5	4.2 ± 1.2	0.7 ± 1.2

De maneira específica, as amostras nativas apresentaram tamanho hidrodinâmico de 1.7 a 3.9 nm, enquanto as irradiadas apresentaram de 2.9 a 4.2 nm. As nanopapaínas apresentaram maior desvio, sendo 6.6 e 6.9 nm para as

concentrações de 2.5 e 1 mg.mL⁻¹ enquanto que para as concentrações abaixo de 1 mg.mL⁻¹ apresentaram partículas de 1 nm, considerado um valor fora dos padrões avaliados anteriormente para estas nanopartículas. Contudo, o equipamento utilizado para esta análise (ZetaSizer ZS90, Malvern®) não é calibrado para enxergar partículas inferiores a 1 mg.mL⁻¹. Portanto, estes resultados estão relacionados com a linearidade do equipamento e não com a amostra propriamente dita.

Seguindo os tamanhos apresentados e comparando-os com o da concentração de 10 mg.mL⁻¹ (Varca *et al.*, 2014), entende-se que concentrações abaixo de 1 mg.mL⁻¹ não são suficientes para formação de nanopartículas de papaína com tamanho entre 6-8 nm. As concentrações de 1 e 2.5 mg.mL⁻¹ permanecem em avaliação.

Em relação ao perfil de bitirosina formado em diferentes concentrações proteicas, corroborando o experimento acima e conforme demonstrado na **figura 11**, observou-se que quanto menor a concentração, menor o sinal de bitirosina. É importante ressaltar que as amostras nativas foram normalizadas para 1 a fim de melhorar a comparação dos sinais. Por fim destaca-se que o conteúdo proteico é um fator limitante para permitir a formação da partícula e a reticulação por bitirosina por consequência. Adicionalmente, tais resultados sugerem uma possível relação da bitirosina com a formação da partícula, conforme previamente idealizado.

Figura 11 - Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sintetizadas em concentrações proteicas de **(A)** 2.5 mg.mL⁻¹ ; **(B)** 1.0 mg.mL⁻¹ ; **(C)** 0.5 mg.mL⁻¹ e **(D)** 0.1 mg.mL⁻¹. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de λ =280nm.

No tangente à atividade proteolítica, quando irradiada em baixas concentrações, conforme demonstrado na **figura 12**, observa-se que a papaína sofre uma perda de atividade quase que total, contendo apenas 10-30% da atividade proteolítica inicial. Isso pode ser resultado da baixa concentração de proteína no sistema, pois possivelmente, a maioria das partículas presentes no sistema sofrem ataque dos radicais livres provenientes da radiólise da água e por isso perderam atividade.

Figura 12 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sintetizadas em diferentes concentrações proteicas (2.5, 1.0, 0.5 e 0.1 mg.mL⁻¹). A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Após o estudo do tamanho, reticulação por bitirosina e atividade enzimática das baixas concentrações de papaína, entende-se que a melhor solução é continuar trabalhando com a concentração de 10 mg.mL⁻¹ já explorada na literatura (Varca *et al.*, 2014) pois apresenta tamanho e bitirosina controlados além de atividade proteolítica adequada para possível veiculação de fármaco. Desta forma, a melhor concentração ou conteúdo proteica para realização da síntese foi estabelecido como 10mg.mL⁻¹.

4.2.2 Molaridade do tampão

Para entender melhor a influência da molaridade do tampão na síntese de nanopartículas de papaína, foi estudada a variação deste parâmetro de diversas formas, por meio da avaliação da estrutura secundária por fluorescência, verificação

do tamanho ou diâmetro hidrodinâmico por DLS, seguido da quantificação da atividade enzimática utilizando o substrato específico. Como controle, as amostras foram sintetizadas e irradiadas em tampão fosfato 50 mM, referente a síntese padrão e em água deionizada, como controle negativo para avaliação das propriedades obtidas em função dos meios/solventes distintos.

Após processo de irradiação e preparação das amostras para análise de fluorescência, conforme citado acima, observou-se à formação de bitirosina (**Figura 13**) em todas as molaridades de tampão: 1, 10, 25, 50 mM e água deionizada. A ordem dos perfis de bitirosina variam de 1 a 1.75 vezes na ordem crescente de: 25 > 10 > água deionizada > 1 > 50 mM. Apesar de todas as molaridades apresentarem formação de bitirosina, verificou-se que esta ordem é aleatória nas molaridades abaixo de 50 Mm. Contudo, melhores resultados foram obtidos a 50 mM e observa-se que a presença do tampão leva a formação da bitirosina de forma mais pronunciada, corroborando a hipótese de que é necessário um próton para a formação da bitirosina. As amostras controles de papaína nativa e papaína irradiada foram sintetizadas utilizando síntese padrão e tampão fosfato 50 mM.

Figura 13 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} sintetizadas com diferentes molaridades de tampão (1, 10, 25 e 50 mM) e água deionizada. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de $\lambda=280\text{nm}$.

Em relação ao diâmetro hidrodinâmico (**Tabela 2**) é correto dizer que as diferentes molaridades de tampão também não afetam significativamente o tamanho das partículas, pois as variações são na faixa de 1 nm. As papaínas nativas e irradiadas apresentam tamanhos médios de 4.0 nm enquanto a nanopapaína resulta em 8.4 nm.

Quando se muda a molaridade do tampão fosfato, nota-se a alteração no pH de cada solução, causada pela diminuição/aumento da quantidade de sal e consequente perda da capacidade tamponante. O pH da água deionizada (utilizada neste teste e base de todos os tampões) é 5.0 ± 0.2 . Observa-se que a partir da

adição de fosfato, o pH começa a variar de 6.5 a 7.3 para papaína nativa, de 5.4 a 7.3 para papaína irradiada e 5.7 a 7.7 para nanopapaína.

Tabela 2 - Diâmetro hidrodinâmico versus pH das amostras de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C a 10 kGy com taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ e em diferentes molaridades de tampão, variando entre 1 a 50 mM.

Condições	Papaína nativa	Papaína irradiada	Nanopapaína
Diâmetro hidrodinâmico (d. nm) x pH			
Água Deionizada	3.6 ± 0.9 / 5.6	3.3 ± 0.8 / 5.2	8.0 ± 1.4 / 5.6
1 mM	4.1 ± 1.0 / 6.5	3.9 ± 0.9 / 5.4	8.0 ± 1.8 / 5.7
10 mM	4.2 ± 1.0 / 6.9	3.9 ± 1.0 / 6.7	8.9 ± 1.6 / 6.8
25 mM	4.4 ± 1.0 / 7.0	4.3 ± 1.2 / 6.9	8.2 ± 1.7 / 7.2
50 mM	3.7 ± 1.0 / 7.3	4.6 ± 1.1 / 7.3	9.3 ± 1.9 / 7.7

Embora a molaridade do tampão não afete significativamente a formação de bitirosina e no tamanho das nanopartículas, não se sabe ao certo qual a influência do pH nestas etapas. Este tema foi abordado mais a frente no tópico 5.3.2 Avaliação do potencial hidrogeniônico

Os resultados obtidos nas análises de atividade enzimática (**Figura 14**), assim como na formação de bitirosina, indicaram resultados aleatórios. As amostras sintetizadas com tampão fosfato 1 e 50 mM apresentaram 80 e 90% de atividade, respectivamente, quando comparadas com a papaína nativa. As amostras que foram irradiadas em água deionizada e tampão fosfato 10 e 25 mM apresentaram bioatividade média de 70%.

Figura 14 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sintetizadas com diferentes molaridades de tampão (1, 10, 25 e 50 mM) e água deionizada. Os dados de pH correspondem a média aritmética (n=3) de cada amostra. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Com isso, conclui-se que a molaridade do tampão afeta a atividade enzimática da nanopartícula de papaína aleatoriamente. Parte desse fenômeno deve-se a ampla faixa de pH ótimo da papaína, situada entre 3-9 (O’Neil, 2001) que revela um bom desempenho da enzima nos pHs avaliados e desta forma, sem maiores prejuízos a atividade enzimática. No entanto, entende-se que a melhor condição para síntese, neste caso, continua sendo com tampão fosfato 50 mM, já que apresenta resultado reprodutível, bons níveis de bitirosina e não afeta o tamanho da partícula.

4.2.3 Avaliação do potencial hidrogeniônico

Conforme supracitado, assim como qualquer enzima, a papaína possui um pH ótimo de trabalho, onde apresenta maior estabilidade e preservação das principais propriedades, como o tamanho e a atividade enzimática. O pH ótimo da papaína nativa está entre 6 e 7 (Mitchel *et al.*, 1970; Kilara *et al.*, 1977). A fim de encontrar o pH ótimo de trabalho da nanopapaína, bem como sua influência na formação da partícula, a síntese foi realizada em pHs diversos, variando entre 3 e 10.

De acordo com a **figura 15**, observamos que todas as amostras de papaína nativa apresentaram reticulação a 10 kGy, independente do pH. Na **figura 15a** podemos observar que, assim como observado anteriormente, o pico de bitirosina da nanopapaína é maior que o encontrada na nativa e menor que o da amostra irradiada (sem etanol). Atribui-se tal modificação a fatores como, um potencial efeito *scavenger* do etanol (Huang *et al.*, 2015), bem como da nova conformação adquirida pela nanopartícula frente a irradiação na presença de um cosolvente capaz de promover uma aglomeração controlada, adequada a formação da partícula.

A **figura 15b** refere-se ao aumento de escala da figura principal (**figura 15a**), possibilitando a observação da ordem dos picos. Conforme avaliado na imagem, a reticulação ocorre em maior quantidade (comparado à nativa) na seguinte ordem de pHs: 3, 9, 4, 6, 8, 10, 7 e 5. Contudo, a diferença varia na ordem de 0.4 vezes, um valor muito baixo para se tornar relevante neste aspecto.

Figura 15 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} sintetizadas em diferentes pHs (3 a 10). As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorvância (aprox. 0,2) no comprimento de $\lambda=280\text{nm}$. Os controles de papaína nativa e irradiadas foram considerados sob pH 7.

Assim como em outros parâmetros avaliados, a influencia do pH na formação das nanopartículas de papaína foi nula. Independente do pH, a nanopartícula foi formada e apresentou tamanho similar em todas as condições. Na **tabela 3** é possível observar que a média de 3.6 e 3.8 nm da papaína nativa e irradiada estava próxima e dentro do desvio apresentado. As amostras com etanol e nanopapaína também apresentaram baixo desvio e tamanhos de aproximadamente 6.9 e 7.4 nm, respectivamente. Sendo assim, o pH não influenciou diretamente na formação das nanopapaína.

Tabela 3 - Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C à 10 kGy com taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ em pHs variando de 3 a 10.

pH	Papaína nativa	Papaína irradiada	Papaína c/ EtOH	Nanopapaína
Diâmetro hidrodinâmico (d. nm)				
3	2.7 ± 0.4	3.6 ± 0.4	7.0 ± 1.6	9.2 ± 1.2
4	3.8 ± 0.8	3.6 ± 0.4	8.1 ± 1.2	8.4 ± 1.0
5	4.1 ± 0.9	4.2 ± 0.9	7.0 ± 1.6	6.5 ± 1.6
6	2.9 ± 1.0	3.0 ± 0.4	5.7 ± 0.6	6.4 ± 1.6
7	3.6 ± 0.9	3.8 ± 0.9	7.2 ± 1.4	8.8 ± 1.5
8	4.1 ± 0.9	4.1 ± 0.9	5.9 ± 1.2	5.6 ± 0.6
9	3.4 ± 0.9	4.6 ± 0.6	8.0 ± 1.0	7.8 ± 0.9
10	3.8 ± 0.8	3.4 ± 0.5	6.5 ± 0.7	6.7 ± 0.8
Média	3.6	3.8	6.9	7.4
Desvio Padrão	0.5	0.5	0.9	1.3

Apesar do pH não influenciar diretamente na formação de bitirosina e no tamanho das nanopartículas, a atividade enzimática foi afetada pelos diferentes pHs. Em geral, enzimas são sensíveis a drásticas mudanças de pH e pode desnaturar, dependendo do ambiente em que se encontra.

Na **figura 16** é possível observar que a atividade enzimática muda de acordo com o pH, conforme esperado. Observa-se que todas as amostras apresentam baixa atividade nos pHs 3 e 4, começando a subir entre 5 e 7 e voltando a diminuir nos pHs 8 e 10. Assim como citado na literatura (Kilara *et al.*, 1977), a maior atividade da papaína nativa foi encontrada no pH 7. Para as amostras de papaína irradiada, papaína com etanol e nanopapaína, a atividade ótima acontece no pH 6, sugerindo

pequena alteração nas propriedades intrínsecas da enzima, e evidenciando modificações em sua estrutura em virtude desta alteração.

Figura 16 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sintetizadas em diferentes pHs (3 a 10). A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

4.2.4 Tempo de solvatação

Uma das primeiras etapas da síntese de nanopartículas de papaína descritas neste trabalho indica a desolvatação de proteína utilizando o etanol como cosolvente, conforme sugerido por Varca *et al.* 2014, Soto Espinoza *et al.* 2012.

A desolvatação, por definição, ocorre quando um agente químico – neste caso, o etanol - retira as moléculas de água que estão alojadas dentro da estrutura da proteína, diminuindo assim a proximidade das moléculas, atribuída como essencial para a formação das nanopartículas pela técnica selecionada.

Os efeitos da desolvatação são importantes para manter a estrutura estável e otimizar funções das proteínas (Choi *et al.*, 2013). A fim de estudar a influência deste parâmetro na formação e reticulação das nanopartículas de papaína, as amostras foram desolvatadas durante 1, 6 e 24 horas antes de serem irradiadas.

Em relação ao diâmetro hidrodinâmico das partículas, observou-se (**Tabela 4**) que os tamanhos médios são: 3.7 nm para papaína nativa e irradiada e 6.9 nm para nanopapaína, com desvio padrão médio de 0.4 a 0.7 nm. Sendo assim, entende-se que o tempo de solvatação não muda os tamanhos de maneira significativa. Ou seja, independentemente do tempo de desolvatação os tamanhos foram similares, considerando os desvios.

Tabela 4 - Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas durante 1, 6 e 24 horas antes da irradiação.

Tempo de solvatação	Papaína nativa	Papaína irradiada	Nanopapaína
	Tamanho (d. nm)		
1 hora	4.2 ± 1.0	3.2 ± 1.0	6.2 ± 1.6
6 horas	3.3 ± 0.9	4.3 ± 0.9	7.4 ± 1.8
24 horas	3.7 ± 0.9	3.6 ± 0.9	7.1 ± 1.7
Média	3.7	3.7	6.9
Desvio Padrão	0.4	0.5	0.6

As modificações na estrutura secundária foram avaliadas através das análises de fluorescência, conforme supracitado. Na **figura 17** observou-se mudança significativa na formação de bitirosina, principalmente nas amostras desolvatadas durante 1 e 24 horas. O perfil da amostra irradiada apresenta aumento de 2 vezes nos tempos 6 e 24 horas, enquanto na amostra desolvatada por 1 hora antes da irradiação, este número aumenta cerca de 30%, subindo 2.3 vezes. As amostras referentes às nanopartículas de papaína indicaram formação de bitirosina e aumento de 1.6 vezes nas amostras de 1 hora, 1.7 vezes na de 6 horas e apenas 1.1 vezes em 24 horas.

Figura 17 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} desolvatadas por **(A)** 1 hora, **(B)** 6 horas e **(C)** 24 horas antes da irradiação. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de $\lambda=280\text{nm}$.

As amostras de papaína nativa foram normalizadas para 1, portanto, não houve mudança no gráfico. Com isso, entende-se que a desolvatação influencia diretamente na formação de bitirosinas, sendo indicado os tempos de 1 a 6 horas de

desolvatação antes da irradiação, como condições ótimas para execução da síntese

Outros aminoácidos como tirosina, triptofano e fenilalanina foram analisadas também através da fluorescência nas amostras desolvatadas durante 1 (**Figura 18**), 6 (**Figura 19**) e 24 horas (**Figura 20**). Observou-se que nestes casos não houveram mudanças significativas pois os perfis permaneceram semelhantes em todos os casos.

Figura 18 – Espectro de fluorescência de **(A)** tirosina (λ_{Ex} :272 nm, λ_{Em} : 297-500 nm), **(B)** triptofano (λ_{Ex} :295 nm, λ_{Em} :320-500 nm) e **(C)** fenilalanina (λ_{Ex} :260 nm, λ_{Em} : 285-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} desolvatadas por 1 hora.

Figura 19 - Espectro de fluorescência de **(A)** tirosina (λ_{Ex} :272 nm, λ_{Em} : 297-500 nm), **(B)** triptofano (λ_{Ex} :295 nm, λ_{Em} :320-500 nm) e **(C)** fenilalanina (λ_{Ex} :260 nm, λ_{Em} : 285-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de

dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas por 6 horas.

Figura 20 - Espectro de fluorescência de **(A)** tirosina (λ_{Ex} :272 nm, λ_{Em} : 297-500 nm), **(B)** triptofano (λ_{Ex} :295 nm, λ_{Em} :320-500 nm) e **(C)** fenilalanina (λ_{Ex} :260 nm, λ_{Em} : 285-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ desolvatadas por 24 horas.

Em relação a atividade enzimática, observou-se que o tempo de solvatação não afetou a bioatividade das nanopartículas de papaína pois em todas as condições (1, 6 e 24 horas) **(Figura 21)** observou-se perda de apenas 10% em comparação a papaína nativa. As amostras irradiadas também não apresentaram perda significativa da atividade, totalizando apenas 5% de perda de atividade para as amostras desolvatadas por um período de 6 horas.

Figura 21 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} , desolvatadas por 1 hora, 6 horas e 24 horas antes da irradiação. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

O etanol possui um papel muito importante na síntese descrita neste trabalho. Além de promover a desolvatação, possui propriedade *scavengers*, conforme abordado mais amplamente acima, protegendo a proteína do efeito de radicais potencialmente oxidantes como a $\text{OH}^\cdot$. É importante destacar que nesta etapa todas as amostras analisadas possuíam a mesma concentração de etanol, desta forma, os efeitos estudados sobre a desolvatação estão mais relacionados com o tempo propriamente dito e não com a propriedade de captura de radicais livres durante o processo de irradiação.

4.2.5 Temperatura de solvatação

A fim de entender o efeito da temperatura na formação das nanopartículas de papaína, amostras foram preparadas e estabilizadas por 1 hora e 30 minutos nas

temperaturas de -20, 0 e 20°C e irradiadas a 10 kGy com taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ nas mesmas condições de temperatura. Para atingir a temperatura de 0°C, as amostras foram mantidas em banho de gelo e para a condição de -20°C as amostras foram congeladas. Em ambos o caso a temperatura foi acompanhado e confirmado através de um termo higrômetro digital de bancada.

A reticulação proteica por meio de bitirosina aumenta conforme a temperatura aumenta. Conforme observado na **Figura 22** as amostras preparadas a 20°C mostraram aumento dos níveis de bitirosina em 3 a 3.5 vezes, quando comparadas com a nativa, enquanto as amostras irradiadas a zero graus apresentaram aumento de 2 a 2.7 vezes e as amostras sintetizadas a -20°C apresentaram níveis menores na formação de bitirosina (1.2 a 1.8 vezes) quando comparada com os valores da amostra nativa. Sendo assim, a temperatura foi capaz de alterar os níveis de reticulação e mostrou ser um parâmetro relevante para o processo.

Figura 22 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a -20, 0 e 20°C com dose de 10 kGy

e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹. As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de $\lambda=280\text{nm}$.

Os resultados de espalhamento dinâmico de luz mostraram que a temperatura de síntese e irradiação não afeta significativamente a formação da nanopartícula de papaína. Em termos específicos, observa-se através do gráfico (**Figura 23**) que os tamanhos e os erros de cada condição foram praticamente os mesmos. Sendo assim, entende-se que a temperatura empregada na etapa de solvatação não influencia no tamanho das nanopartículas.

Figura 23 - Gráfico do diâmetro hidrodinâmico obtidos para amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a -20, 0 e 20°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹.

As amostras de nanopartículas de papaína tendem a perder cerca de 20% da atividade enzimática inicial após processo de irradiação. Conforme mostrado na **Figura 24**, todas as amostras sintetizadas e irradiadas em diferentes temperaturas

na presença de água deionizada apresentaram atividade enzimática maior que 80%.

As amostras sintetizadas em tampão fosfato (50 mM) apresentaram atividade esperada (perda de 20% ou menos) nas condições criogênicas (-20 e 0°C). No entanto, as amostras irradiadas a 20°C sofreram perda mais significativa de atividade enzimática, apresentando mais de 30% de perda quando comparada com a amostra nativa inicial. Conforme esperado, temperaturas criogênicas, favoreceram a preservação da atividade proteolítica da enzima.

Figura 24 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a -20, 0 e 20°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sintetizadas em **(A)** água deionizada e **(B)** tampão fosfato 50 mM. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

Apesar da perda de atividade proteolítica ser pouco significativa quando a síntese é realizada utilizando em água deionizada ou em tampão fosfato 50 mM, entende-se que a melhor temperatura para trabalhar com a nanopapaína é a de 0°C, devido a bons resultados apresentados na análise de tamanho, fluorescência e preservação da atividade enzimática nesta temperatura. Adicionalmente, esta

temperatura é próxima a temperatura de armazenamento sugerida pelo fornecedor (2-8°C), evitando assim a rápida degradação e perda da bioatividade.

4.2.6 Taxa de dose

Os efeitos da taxa de dose da radiação gama na formação das nanopartículas de papaína foram avaliados através da exposição das amostras na dose pré-estabelecida de 10 kGy, realizada utilizando diferentes taxas de doses conforme demonstrado na **tabela 5**.

Sob a taxa de 0.8 kGy.h⁻¹ foram obtidas partículas com tamanho de 3.5 nm para papaína irradiada e 7.1 nm para nanopapaína. A 2 kGy.h⁻¹ os resultados de tamanho para papaína irradiada e nanopapaína, foram respectivamente, 4.4 e 7.5 nm. Para as amostras irradiadas a 5 e 10 kGy.h⁻¹ os resultados obtidos foram 3.9 e 4.7 nm para papaína irradiada, e ambas apresentaram 7.9 nm de tamanho para nanopapaína. Observa-se que apesar dos diferentes tempos de exposição as amostras não sofreram mudanças significativas de tamanho. Todas as taxas de dose testadas apresentam resultados similares para a papaína irradiada (3 a 4 nm) e para nanopapaína (7 a 8 nm) e baixo erro, variando de 0.8 a 1.8 nm.

Tabela 5 – Comparação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxas de doses variáveis de 0,8, 2, 5 e 10 kGy.h⁻¹.

Tamanho das amostras	Taxa de dose (kGy.h ⁻¹)			
	0.8	2	5	10
Papaína irradiada (d.nm + Desvio padrão)	3.5 ± 0.8	4.4 ± 0.9	3.9 ± 0.8	4.7 ± 0.9
Nanopapaína (d.nm + Desvio padrão)	7.1 ± 1.6	7.5 ± 1.8	7.9 ± 1.5	7.9 ± 1.6

A influência da taxa de dose na formação da bitirosina também foi avaliada. Os perfis de fluorescência (**Figura 25**) mantiveram o comportamento típico reportado acima, papaína irradiada > nanopapaína > papaína nativa.

As amostras irradiadas a 0,8 kGy.h⁻¹ (**Figura 25a**) demonstraram um maior nível de bitirosina para papaína irradiada, aproximadamente 4 a 5 vezes maior que a papaína nativa, enquanto a nanopapaína apresentou aumento de aproximadamente 1,5 vezes. A 2 kGy.h⁻¹ (**Figura 25b**) as amostras irradiadas apresentaram aumento de 1,5 vezes para papaína irradiada e 1,3 vezes para nanopapaína, quando comparadas com a papaína nativa.

As amostras de nanopartícula de papaína irradiadas a 5 kGy.h⁻¹ (**Figura 25c**) apresentaram maior nível de bitirosina quando comparado com as outras taxas de dose, com aumento de 5 e 2,6 vezes para papaína irradiada e nanopapaína, respectivamente. Sob a taxa de 10 kGy.h⁻¹ (**Figura 25d**), as amostras de papaína irradiada apresentaram picos com 2,6 vezes de aumento, contudo, a amostra de nanopapaína não apresentou aumento na formação da bitirosina conforme esperado, apresentando níveis próximos a da papaína nativa, evidenciando que esta

condição não foi ideal para a promoção da reticulação.

Figura 25 – Espectro de fluorescência de bitirosina (λ_{Ex} :350 nm; λ_{Em} : 375-500 nm) obtidos a partir de amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de **(A)** 0.8 kGy.h^{-1} , **(B)** 2 kGy.h^{-1} , **(C)** 5 kGy.h^{-1} e **(D)** 10 kGy.h^{-1} . As amostras foram diluídas para atingir equivalência em absorbância (aprox. 0,2) no comprimento de $\lambda=280\text{nm}$.

Os resultados sugerem que as amostras irradiadas a 0.8 e a 5 kGy.h^{-1} apresentam maiores níveis de bitirosina para as papaínas irradiadas, mostrando aumento de 4 e 5 vezes, respectivamente, enquanto as outras condições não excedem valores superiores a 3 vezes. Por outro lado, as nanopartículas de papaína irradiadas a 2 e 5 kGy.h^{-1} demonstraram maior controle na formação da bitirosina

nas amostras de nanopapaína. Verificou-se, portanto, que as amostras irradiadas a 5 kGy.h⁻¹ promovem maior reticulação proteica e com isso, considera-se que esta condição seja adequada para padronização da rota de síntese.

Conforme demonstrado anteriormente (Varca *et al.*, 2014b), a nanopapaína foi irradiada numa escala de 0-10 kGy com taxa de dose de 1.2 kGy.h⁻¹ e apresentou preservação da bioatividade e menor degradação proteica a 10 kGy.

As análises de atividade enzimática revelaram que tanto as amostras irradiadas em água quando em tampão fosfato (50 mM, pH 7,2) apresentaram resultados similares. As amostras expostas a 0.8, 2 e 5 kGy.h⁻¹ apresentaram 80% de bioatividade para a nanopapaína, enquanto as amostras de nanopapaína irradiadas a 10 kGy.h⁻¹ apresentaram uma perda significativa de 30% comparado a papaína nativa.

Comparando os dois gráficos (**Figura 26**) observa-se que as amostras irradiadas a 0.8 e 2 kGy.h⁻¹ permaneceram com 80% da atividade inicial. Contudo, as amostras irradiadas a kGy.h⁻¹ mostraram menor perda da atividade enzimática em relação a todas as taxas de dose estudadas, permanecendo com 90% da atividade inicial, comparada com a papaína nativa. Em ambos os casos, tanto em água deionizada quanto em tampão fosfato, as amostras irradiadas com taxa de 10 kGy.h⁻¹ apresentaram maior perda na bioatividade, novamente fornecendo evidências de que esta não é a condição mais adequada para síntese da nanopartícula.

Figura 26 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose variando entre 0.8, 2, 5 e 10 kGy.h^{-1} sintetizadas em **(A)** água deionizada e **(B)** tampão fosfato 50 mM. A atividade da papaína nativa foi considerada como 100%.

De acordo com os resultados apresentados, é possível concluir que a melhor taxa de dose para irradiação das nanopartículas de papaína corresponde a 5 kGy.h^{-1} , por apresentar maior atividade enzimática em ambas as condições – água deionizada e tampão fosfato 50 mM.

4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Apesar do tamanho ter sido estabelecido através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, faz-se necessário a comprovação por outras vias. A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada a fim de conhecer a morfologia das nanopapaínas e confirmar o tamanho.

Através da técnica de contrastação negativa (NS-TEM) foi possível observar pequenas esferas brancas depositadas sob o grid. A **figura 27a** refere-se a amostra de papaína nativa e a **figura 27b** são as nanopapaína, onde é possível verificar o

aumento no número de partículas após a nanoestruturação realizada pelo processo de desolvatação e irradiação.

Figura 27 – Papaína nativa (A) e nanopapaína (B) (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} realizadas por microscopia eletrônica de transmissão feitas através da técnica de contrastação negativa (NS-TEM) utilizando acetato de uranila 1%.

Cerca de 400 nanopartículas foram contadas a fim de estabelecer um dado estatístico adequado. Na **figura 28** é possível observar diferentes condições experimentais. Conforme visto na técnica de espalhamento dinâmico de luz, a amostra de papaína nativa e irradiada apresentaram tamanho médio entre 4-5 nm, enquanto a nanopapaína, tanto em água quanto em etanol, apresentou tamanho próximo dos 10 nm.

Figura 28 - Análise estatística por *Kruskal-Wallis* da contagem das nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} por comparação de tamanhos e solventes utilizados no preparo das amostras (água e etanol) analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (NS-TEM) utilizando acetato de uranila 1%. As amostras correspondem a (I) papaína nativa, (II) papaína com 20% EtOH diluída em água, (III) papaína irradiada em água, (IV) nanopapaína em água, (V) papaína com 20% EtOH diluída em EtOH e (VI) nanopapaína em EtOH.

4.4 Natureza da reticulação proteica

Com o intuito de investigar a natureza da reticulação proteica nas nanopapaína, as amostras foram previamente sonicadas e o diâmetro hidrodinâmico foi avaliado por DLS, a fim de observar aumento ou diminuição no tamanho das amostras. Sabe-se que o aumento de tamanho pode indicar presença de reticulação intermoleculares enquanto a não modificação e possível diminuição pode indicar presença de reticulação intramolecular (Djoullah *et al.*, 2016).

Estudos prévios demonstraram que o processo de sonicação pode inativar a papaína nativa, formando agregados ou quebrando as moléculas irreversivelmente (Feng *et al.*, 2010). Essa inativação é diretamente ligada com a atividade da proteína

e pode estar relacionada com a variação das estruturas secundárias e terciárias (Yu *et al.*, 2014). Neste contexto, entende-se que as nanopartículas de papaína sintetizadas por radiação não perdem atividade após a sonicação como ocorre com a papaína nativa, já que se trata de uma estrutura mais estável e definida (**Figura 29**).

Figura 29 - Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} sonicadas por 2 horas à (40 kHz , 137 watts).

Para avaliar o tamanho das nanopapaínas após 2 horas de sonicação foram utilizados controles (sem sonicação) e analisados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Conforme demonstrado na **tabela 6**, os resultados indicam que a papaína nativa sem sonicação apresenta 3.4 nm enquanto a irradiada e nanopapaína apresentam 3.9 e 7.7 nm respectivamente. A papaína nativa e irradiada após sonicação apresentam os mesmos tamanhos que os controles. Por outro lado, a nanopapaína apresenta uma diminuição no tamanho de 7.7 para 5.8

nm. A papaína nativa possui um grupo de sulfidril livre e três grupos dissulfeto conforme descrito na literatura (Light *et al.*, 1964).

Em relação ao grupo sulfidril, foi observado que a papaína irradiada não apresenta grupos extras antes e depois da sonicação. Já a nanopapaína apresenta dois e três grupos sulfidrilas antes e depois da sonicação, respectivamente, sugerindo uma conformação distinta daquela obtida utilizando radiação na ausência de etanol, e composta também, de maneira mais significativa forças de natureza intramolecular.

Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ sonicadas por 2 horas à (40 kHz, 137 watts) e grupos -SH livres encontrados utilizando o reagente DTNB e teste de Ellman.

Amostras	Tamanho (d.nm)	Sulfidril livre (-SH/mol de papaína)
Papaína nativa	3.4 ± 0.8	1.0 ± 0.10
Papaína nativa (sonicada)		1.8 ± 0.09
Papaína irradiada	3.9 ± 1.0	0.1 ± 0.08
Papaína irradiada (sonicada)	3.5 ± 0.9	0.1 ± 0.09
Nanopapaína	7.7 ± 0.9	2.0 ± 0.11
Nanopapaína (sonicada)	5.8 ± 1.2	3.2 ± 0.17

Os resultados do tamanho mostraram uma pequena diferença que pode indicar a existência de ligações intramoleculares nas nanopartículas de papaína, evidenciadas pela diminuição no tamanho após o processo de sonicação. Adicionalmente, os resultados sugerem que resíduos de cisteína livre derivados da quebra das pontes dissulfeto após a ultrasonicação reagiram e formaram novas

ligações intramoleculares que permanecem ainda com cisteínas livres nos mesmos resíduos moleculares (Singh e MacRitchie, 2001).

A redução no tamanho da partícula pode estar relacionada com a cavitação e forças turbulentas durante a ultrasonicação (Yanjun *et al.*, 2014). No sistema biológico, a rápida combinação do OH• com radicais no sítio ativo pode inativar enzimas ou proteínas ao oxidar os grupos sulfidrilas tornando-se pontos dissulfeto (Halliwell e Gutteridge, 1986). Este tipo de redução através da técnica de sonicação já foi observado em proteínas de soja isolada (Arzeni *et al.*, 2012), proteína do girassol (Malik *et al.*, 2017) proteína de amendoim isolada (Zhang *et al.*, 2014) entre outras.

O aumento e/ou diminuição do tamanho está diretamente relacionado com o tempo em que a amostra permanece no ultrassom. Em testes preliminares (não demonstrados neste trabalho), não foi observado diferença entre amostras sonicadas por 15, 30 minutos e 2 horas, todos os resultados apresentaram diminuição no tamanho. Contudo, Gulseren e colaboradores (2007) reportaram que após 40 minutos de sonicação, amostras de BSA apresentaram pequenos agregados.

O tamanho da nanopartícula de papaína também pode ter sido reduzido pela exposição das sulfidrilas que estavam enterradas, após a ultrasonicação (Malik *et al.*, 2017). Este processo também indica o aumento do grupo sulfidrilas pois as pontes dissulfeto se quebram durante a sonicação, reduzindo ligações S-S para formar S-H (Hu *et al.*, 2013).

Utilizando o método e equação de Ellman (1959), os valores obtidos para a papaína nativa foram normalizadas para 1 a fim de comparar os resultados. É possível observar (**tabela 6**) que a papaína irradiada não tem sulfidrilas livre capaz de

ser detectada pelo ensaio, enquanto a nanopapaína apresenta 2 e 3 grupos, antes e depois da sonicação, respectivamente. Para a albumina do soro bovino (BSA) e proteína do soro do leite, foi reportado o oposto. Gulseren e colaboradores (2007) reportaram que sonicar albumina causa modificações na estrutura da proteína, aumentando as cargas da superfície e o tamanho como consequência de pequenos agregados, enquanto a sulfidrila livre apresenta diminuição significativa (Gulseren *et al.*, 2007). Na proteína do soro do leite, a sonicação não modifica a estrutura secundária pois o grupo -SH está localizado dentro da molécula e faz com que se torne menos vulnerável à degradação após sonicação (Chandrapala *et al.*, 2011).

4.5 Eletroforese

Conforme discutido anteriormente, a natureza da reticulação pode ser identificada através do aumento ou diminuição do peso molecular, uma vez que a natureza intermolecular acarreta ganho de massa por exclusividade, adicionalmente a modificação de tamanho. Para entender e determinar o peso da nanopapaína, as amostras foram sonicadas por 2 horas e corridas em gel de poliacrilamida utilizando tampão denaturante. A papaína nativa apresentou peso molecular de 23,4 kDa, conforme descrito na literatura (Mitchel *et al.*, 1970). Na **figura 30** observa-se que as amostras foram retidas próxima a banda de 25 kDa e apresenta pequenos fragmentos entre 10 kDa, como resultado do processo de desnaturação e, não foram observados agregados superiores a 25 kDa.

Estes resultados indicaram que a natureza da reticulação das nanopartículas de papaína, como hipotetizado anteriormente, são de natureza intramolecular, uma vez que não foram observadas alterações no peso molecular das amostras, especificamente relacionada compostos de massa molar superior aos da enzima

nativa, capazes de serem detectadas pela técnica de eletroforese. Corroborando a análise de quantificação da sulfidril livre, no caso da nanopapaína, pontes de dissulfeto também estão envolvidas no processo de reticulação da papaína por radiação.

Figura 30 – Eletroforese com gel de poliacrilamida 12% obtida das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹, sendo **(M)** Marcador de proteína para amplo peso molecular (10-240 kDa), **(A1)** papaína nativa, **(A2)** papaína nativa sonicada, **(B1)** papaína irradiada, **(B2)** papaína irradiada sonicada, **(C1)** nanopapaína e **(C2)** nanopapaína sonicada. As amostras foram sonicadas por duas horas à 40 kHz e 135 watts

4.6 Esterilização simultânea

Um dos benefícios mais comumente citados sobre tecnologia da radiação, especificamente quando se trata de hidrogéis, refere-se a possibilidade de combinar simultaneamente esterilização e reticulação em uma única etapa, dependendo da

fonte e energia de radiação, podendo ser realizado na embalagem final. A eficácia da esterilização por radiação está diretamente ligada a dose, bem como nível inicial de contaminação do produto. Quando se refere a esterilização de dispositivos biomédicos, o nível de garantia de esterilidade (*sterility assurance level*, SAL) estabelecido é de 10^{-6} , e de acordo com a ISO 11137, e são geralmente utilizadas doses entre 15 e 25 kGy.

Como uma tentativa de demonstrar e fornecer evidências experimentais sobre a possibilidade de combinar reticulação de proteínas com esterilização simultânea, o ensaio de esterilidade das nanopartículas de papaína foi realizado em cada etapa e revelou presença de bactérias gram-positivas na amostra nativa (sem irradiação), identificadas como bactérias gram-positivas, mais especificamente a *Corynebacterium sp*, um bacilo da microbiota da pele e membranas mucosas (Wellington, 2011). Isso evidencia que nosso procedimento está sendo realizado em condições laboratoriais e não assépticas, conforme esperado, já que as amostras foram preparadas em laboratório de pesquisa.

A fim de determinar se a radiação a 10 kGy é suficiente para esterilização e reticulação simultânea, nas condições específicas do processo, as amostras foram previamente inoculadas com 10^6 UFC mL⁻¹ de *C. xerosis* de uma solução padronizada usando a cepa ATCC para as amostras. É relevante destacar que, embora a carga microbiana possa ser resolvida utilizando métodos assépticos, como fluxo laminar e materiais estéreis durante a síntese, foi utilizada como evidência experimental para detalhar a esterilização simultânea.

Conforme demonstrado na **tabela 7**, os resultados revelaram que após o processo de irradiação todas as amostras passaram no teste de esterilidade, inclusive as que foram inoculadas com bactéria previamente. Essa informação é

importante pois confirma a hipótese de que a reticulação e a esterilização ocorrem simultaneamente, conforme postulado previamente por alguns autores (Varca *et al.*, 2016 e Queiroz *et al.*, 2016).

Tabela 7 – Avaliação da esterilidade das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ e previamente inoculadas com 10⁶ UFC mL⁻¹ de *C. Xerosis* de acordo com as normas da USP 40, NF 35 (2017) e de acordo com a ISO 11737-2:2009.

Amostras	Cultura de bactérias	Cultura de fungos	Resultado
Papaína nativa (controle)	Positivo	Negativo	Reprovado
Papaína nativa (c/ bactéria)	Positivo	Negativo	Reprovado
Papaína irrad. (controle)	Negativa	Negativa	Aprovado
Papaína irrad. (c/ bactéria)	Negativa	Negativa	Aprovado
Nanopapaína (controle)	Negativa	Negativa	Aprovado
Nanopapaína (c/ bactéria)	Negativa	Negativa	Aprovado

*Teste preparado em acordo com a ISO 11737-2.

Em princípio, a esterilização por radiação é a única técnica capaz de permitir uma previsão da redução da carga microbiana, correspondente a carga de 10⁻¹ ou superior para cada 2,5 kGy aplicado à amostra, no caso de contaminantes conhecidos.

Com a dose de radiação aplicada, as amostras passaram no teste de esterilidade, fornecendo evidências claras de esterilização simultânea das nanopartículas. No entanto, quando produzidos em escala industrial, mais experimentos devem ser realizados para minimizar a carga inicial, se presente, bem como para validar a esterilização fornecida.

4.7 Estabilidade

A estabilidade foi analisada de acordo com o guia de estabilidade de medicamentos da ANVISA (Brasil, 2005) que propõe o estudo de amostras líquidas durante 180 dias, em estabilidade de acompanhamento e acelerada, essenciais para assegurar a eficácia do produto e a estabilidade necessária para armazenamento.

Estabilidade de acompanhamento

O lote de amostras para acompanhamento da estabilidade foi realizado em triplicata e nas mesmas condições, para evitar desvios quanto a parâmetros importantes como temperatura e dose de radiação. Os frascos fechados foram mantidos em geladeira com variação de temperatura entre 0 e 4°C e abertos somente no dia da análise.

Conforme demonstrado na **tabela 8**, os tamanhos das nanopartículas não sofreram alterações significativas após 180 dias, considerando o desvio padrão. As amostras de papaína nativa e irradiada apresentaram tamanhos médios de 3.7 e 3.6 nm, respectivamente, com desvio ≤ 1.0 nm. As amostras de papaína com etanol apresentaram tamanho de 6.6 ± 1.6 nm e as nanopapaína de 6.0 ± 1.6 nm.

O PDI indica, basicamente populações de tamanho distintos, ou seja, quanto mais próximo de 0, mais monodispersa é a amostra, e mais próximo de 1 mais polidispersa. Para o estudo de formação de nanopartículas, considera-se ideal que o PDI das amostras sejam $< 0,3$ (Shekunov *et al.*, 2007). Ao contrário do tamanho, o índice de polidispersividade (PDI) apresentou variações significativas durante o período de 180 dias. Observou-se que as amostras de papaína nativa apresentaram PDI acima de 0.3 em todos os tempos analisados, mostrando que há diferentes populações com tamanhos diferentes na papaína nativa.

A papaína com etanol apresentou PDI adequado até análise realizada em 60 dias, depois aumentou significativamente até chegar próximo de 1 após 180 dias. Já para a papaína irradiada, os resultados de polidispersividade foram considerados bons, com uma média de 0.27 ± 0.2 ao longo dos 180 dias. Assim como a papaína irradiada, a nanopapaína apresentou PDI satisfatório durante os 180 dias analisados, com uma média de 0.22 ± 0.8 , demonstrando grande potencial após seis meses estocada em geladeira. Ou seja, as amostras irradiadas apresentaram melhor distribuição e homogeneidade dos tamanhos, de acordo com o PDI.

Tabela 8 – Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} mantidas por 180 dias à 0°C para avaliar estabilidade de acompanhamento.

Dias	Papaína nativa		Papaína irradiada		Papaína c/ EtOH		Nanopapaína	
	Tamanho (d.nm)	PDI	Tamanho (d.nm)	PDI	Tamanho (d.nm)	PDI	Tamanho (d.nm)	PDI
0	3.1	0.31	4.1	0.27	6.5	0.16	6.1	0.11
15	3.7	0.33	3.8	0.28	7.3	0.14	5.9	0.16
30	4.3	0.34	3.2	0.27	7.7	0.14	6.9	0.24
60	3.6	0.35	3.5	0.24	5.6	0.26	5.8	0.18
90	3.7	0.40	3.7	0.27	5.7	0.44	5.6	0.21
120	4.0	0.71	4.2	0.25	6.3	0.94	5.7	0.28
180	3.5	0.83	3.0	0.28	7.3	0.95	6.5	0.30
Média	3.7	0.47	3.6	0.27	6.6	0.43	6.0	0.22
Desvio	0.8	0.2	1.0	0.02	1.6	0.3	1.6	0.08

Tamanho por número (d.nm). PDI: índice de polidispersividade

Outra propriedade físico-química avaliada foi o potencial zeta - medida das

cargas eletrostáticas na superfície da nanopartícula, constituindo ferramenta relevante para prever a estabilidade física de suspensões coloidais. Esta medida foi realizada nas amostras mantidas em geladeira e analisada no primeiro e último dia, ou seja, nos tempos 0 e 180 dias.

No tempo inicial, a papaína nativa e papaína com etanol, ambos controles sem irradiação, apresentaram potencial zeta de -10 ± 3.6 mV e -5.2 ± 1.4 mV, respectivamente, e passaram para -3 ± 4.8 mV e -2.5 ± 0.6 mV após o tempo total. As amostras irradiadas e nanopapaína apresentaram cargas de -14.1 ± 2.5 mV e -10.8 ± 2.5 mV, respectivamente. Após os 180 dias, as mesmas amostras tiveram resultado de -10.3 ± 2 mV e -8.5 ± 2.2 mV.

Estima-se que a estabilidade das nanopartículas é encontrada em amostras com potencial zeta menor que -30 mV e maior que +30 mV. Sendo assim, todas as amostras analisadas estão na faixa que se considera instável. Entretanto, apesar da instabilidade apresentada pelo potencial zeta, o tamanho da partícula é mantido e a atividade enzimática preservado por até 30 dias, conforme **figura 31**. É relevante destacar que proteínas tendem a sofrer agregação física em solução, sem necessariamente acarretar prejuízo ou perda de atividade biológica.

As atividades enzimáticas das amostras submetidas à estabilidade de acompanhamento foram analisadas durante 180 dias, visando estimar o prazo máximo de validade. De acordo com as normas vigentes, entende-se por prazo de validade o tempo necessário para a perda equivalente a 10% do fármaco. No entanto, destaca-se que a papaína, assim como outras enzimas, requerem necessidades especiais de armazenamento e produção, não necessariamente estando sujeitas as mesmas normas preconizadas para outros medicamentos ou compostos (Vehabovic *et al.*, 2003).

Figura 31 – Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ mantidas por 180 dias à 0°C para avaliar estabilidade de acompanhamento.

Levando em consideração a importância da atividade enzimática da papaína, entende-se nessas condições, as amostras seriam válidas para uso por até 30 dias, uma vez que após esta data, o uso já é comprometido e decorridos 180 dias, a atividade proteolítica atinge 30% dos valores iniciais. Destaca-se que a nanoestruturação, não contribuiu ou alterou a atividade proteolítica da enzima, tanto no aspecto atividade máxima quanto estabilidade.

Estabilidade acelerada

O estudo da estabilidade acelerada foi realizado no período de 180 dias em amostras armazenadas a 20 ± 2 °C, sendo, portanto, distinto da estabilidade de acompanhamento, realizada a 0 °C De acordo com a **tabela 9**, o tamanho das nanopartículas não foi afetado significativamente após 6 meses. As amostras de papaína nativa e irradiada apresentaram tamanho médio de 3.8 ± 0.9 nm e 4 ± 1 nm (diâmetro hidrodinâmico), respectivamente.

O índice de polidispersividade da papaína nativa não foi satisfatório durante

os 180 dias pois permanecem entre 0.41-0.68, quando o indicado não pode ultrapassar de 0.3 (Shekunov *et al.*, 2007). A papaína irradiada e papaína com etanol permaneceram com PDI satisfatório durante 60 e 15 dias, respectivamente. Após este período, a polidispersão aumentou significativamente e indicou muitas populações com tamanhos distintos nas amostras, mesmo que o tamanho médio (por número) não tenha sido alterado. A nanopapaína apresentou o melhor resultado entre todas as amostras, pois mesmo a 20°C, o PDI permaneceu ≤ 0.3 , indicando que nesta condição, há menos populações com tamanhos diferentes do apresentado.

Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL^{-1}) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h^{-1} mantidas por 180 dias à 20°C para avaliar estabilidade acelerada.

Dias	Papaína nativa		Papaína irradiada		Papaína c/ EtOH		Nanopapaína	
	Tamanho (d.nm)	PDI	Tamanho (d.nm)	PDI	Tamanho (d.nm)	PDI	Tamanho (d.nm)	PDI
0	4.0 ± 0.9	0.52	4.5 ± 1.1	0.30	5.7 ± 1.6	0.21	7.6 ± 1.9	0.21
15	3.7 ± 0.9	0.46	4.2 ± 1.1	0.28	7.0 ± 1.6	0.26	6.5 ± 1.7	0.30
30	4.3 ± 0.8	0.68	3.5 ± 0.9	0.29	6.8 ± 1.6	0.39	7.4 ± 1.8	0.29
60	4.1 ± 0.9	0.68	4.2 ± 1.1	0.29	6.0 ± 1.7	0.48	5.8 ± 1.7	0.18
90	3.9 ± 0.9	0.59	3.8 ± 1.1	0.32	5.4 ± 1.6	0.34	5.2 ± 1.6	0.19
120	2.9 ± 0.8	0.41	3.8 ± 0.8	0.31	6.8 ± 1.7	0.67	6.5 ± 1.7	0.20
180	3.7 ± 0.9	0.42	3.8 ± 1.1	0.35	6.7 ± 1.7	1.0	4.8 ± 1.5	0.30
Média	3.8	0.54	4.0	0.31	6.3	0.48	6.3	0.24
Desvio	0.9	0.12	1.0	0.02	1.6	0.28	1.7	0.06

Tamanho por número (d.nm). PDI: índice de polidispersividade

Em suma, o ensaio de estabilidade acelerada revelou que a nanopapaína foi a amostra mais adequada para armazenamento, conforme relevado pro comparação dos valores de PDI, desta forma, evidenciando que a nanoestruturação, embora não suficiente para alterar o prazo máximo de validade da enzima, foi capaz de manter a enzima mais preservada frente ao armazenamento, denotada por menor alteração sofrida no decorrer do experimento.

Em geral, enzimas como a papaína são sensíveis a mudanças radicais de temperatura e tendem a perder atividade após estes eventos. Na **figura 32**, observa-se que as atividades das amostras de papaína começam a cair radicalmente após 15 dias, quando armazenadas em temperatura ambiente. A papaína nativa, irradiada e controle com etanol permanecem com atividade superior a 80% até 60 dias. Já a nanopapaína, principalmente amostra deste estudo, é válida somente por 15 dias quando conservada nestas condições.

Figura 32 - Atividade enzimática relativa das amostras de nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ mantidas por 180 dias à 20°C para avaliar estabilidade acelerada.

Sendo assim, após o teste de estabilidade das amostras de acompanhamento e acelerada durante 180 dias, conclui-se que a nanopapaína conserva suas propriedades principais por até 30 dias, quando armazenada nas condições corretas (0-4°C) e 15 dias quando armazenada em até 20°C, sendo, portanto, necessário o armazenamento em condições específicas de temperatura.

4.8 Radiomarcagem

A conjugação da amostra de nanopapaína com o tecnécio-99m foi realizada através do protocolo de marcação direta. Este método se dá através da adição do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) a uma alíquota de nanopapaína e cloreto de estanho dihidratado e normalizado com ácido clorídrico (**Figura 33**).

Figura 33 - Esquema de radiomarcagem das nanopartículas de papaína (10 mg.mL⁻¹) irradiadas a 0°C com dose de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ com ^{99m}tecnécio.

Após radiomarcadas, as amostras foram analisadas através da corrida em cromatografia em camada fina (ITLC-SG) utilizando acetona e solução de piridina e ácido acético e água como solventes. Por fim, a fita foi cortada em 5 pedaços iguais

e analisadas quanto a sua radioatividade através de um contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) modelo D5002, cobra II, auto gama (Camberra). Durante todo o procedimento, utilizou-se um detector de radiação Raytest Gabi, (Agilent Technologies®). Em alguns casos, a ineficiência nos processos pode dar origem a impurezas radioquímicas, como o próprio pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4$), decorrente da sua não-redução e o óxido de tecnécio (TcO_2) (Marques *et al.*, 2011).

Na **figura 34**, o segmento 5 indica a presença de pertecnetato de sódio e no segmento 0, o tecnécio-99m. O objetivo desta técnica é verificar se a papaína e o tecnécio-99m se ligaram diretamente e correram do ponto 0 ao ponto 5. Na **figura 34a**, o solvente de corrida foi a acetona e observa-se que o conjugado não correu, permanecendo quase que em sua totalidade no ponto de partida. A **figura 34b** indica que na presença de piridina e ácido acético (3:5:1,5), o conjugado se moveu para o ponto 5, indicando alta radiação no final da fita.

Figura 34 - Contador de radiação da cromatografia em camada fina (ITLC-SG) utilizando solventes diferentes onde **(A)** acetona e **(B)** solução piridina, ácido acético e água (3:5:1,5).

O rendimento radioquímico das amostras analisadas foi de $92,8 \pm 1,1\%$ para as amostras de ^{99m}Tc -Papaína, $89,8 \pm 2,3\%$ para ^{99m}Tc -Papaína irradiada e $89,3 \pm 1,4\%$ para as ^{99m}Tc -Nanopapaína. Estatisticamente, a diferença dos resultados não

é significativa, e em geral apresenta rendimento de 90% para todas as amostras analisadas. No entanto, destaca-se altos níveis de ligação com baixíssima impureza, evidenciando e demonstrando experimentalmente a aplicação do sistema como nanocarreador de fármacos, com potencial emprego no diagnóstico, tratamento e teranóstica, em especial, para veiculação de radiofármacos.

5. CONCLUSÕES

Em suma, conclui-se que a síntese otimizada das nanopartículas de papaína ocorre na concentração proteica de 10 mg.mL⁻¹, tampão fosfato 50 Mm, pH 6-7, tempo de solvatação entre 1 e 6 horas, taxa de dose de 5 kGy.h⁻¹ e 0°C. Ao usar essas condições e manter as amostras armazenadas entre 0 e 4°C, a formação de nanopartículas ocorrerá mais rapidamente, com atividade proteolítica preservada e níveis consideráveis de reticulação intramolecular.

Como prova de conceito do emprego das nanopartículas como nanocarreadores – alternativa terapêutica para veiculação de fármacos, as amostras conjugadas com ^{99m}Tecnécio através da radiomarcagem direta apresentaram rendimento radioquímico elevado de 92,8 ± 1,1%, 89,8 ± 2,3% e 89,3 ± 1,4% para as amostras de ^{99m}Tc-Papaína, ^{99m}Tc-Papaína irradiada e ^{99m}Tc-Nanopapaína, respectivamente. Conclui-se que a nanopapaína é um nanocarreador promissor para o carregamento de radiofármaco.

No tangente à possibilidade de reticulação e esterilização simultânea, os resultados confirmaram que nas condições pré-estabelecidas de processo, a técnica permite a esterilização simultânea a formação da nanopartícula na dose de 10 kGy, dependendo é claro da natureza da contaminação e sua carga inicial.

6. BIBLIOGRAFIA

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. **Lippincott Williams Wilkins**. 9^a ed. p. 112, 2007.

ARAÚJO, E. B. A utilização do elemento tecnécio-99m no diagnóstico de patologias e disfunções dos seres vivos. **Cad. Temático Quim. Nov. Esc.** n. 6, 2005.

ARZENI, C.; MARTÍNEZ, K.; ZEMA, P.; ARIAS, A.; PÉREZ, O.E.; PILOSOFF, A.M.R. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. **J Food Eng.** v. 108, p. 463-472. 2012.

AVNIR, Y., TURJEMAN, K., TULCHNISKY, D., SIGAL, A., KIZELSZTEIN, P., TZEMACH, D., GABIZON, A., BARENHOLZ, Y., Fabrication principles and their contribution to the superior in vivo therapeutic efficacy of nano-liposomes remote loaded with glucocorticoids. **PLoS One** 6, 2011.

BABAPOOR, S., NEEF, T., MITTELHOLZER, C., GIRSHICK, T., GARMENDIA, A., SHANG, H., KHAN, M.I., BURKHARD, P., A Novel Vaccine Using Nanoparticle Platform to Present Immunogenic M2e against Avian Influenza Infection. **Influenza Res. Treat.** p. 1–12. 2011.

BANERJEE, T.; SINGH, A.K.; SHARMA, R.K.; MAITRA, A.N. Labeling efficiency and biodistribution of Technetium-99m labeled nanoparticles: interference by colloidal tin oxide particles. **Inter J Pharm**, v. 289, n. 1-2, p. 189-195, 2005.

BIAN, S.; CHOWDHURY, S.M. Profiling Protein-Protein interactions and protein structures using chemical cross-linking and mass spectrometry. **Austin Journal Biomedical Engineering**. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia de

estabilidade de Medicamentos. Brasília, 2005. Disponível em: www.anvisa.gov.br.

BORELLA J. C., PÁDUA M., STEVANATO M. C. B. Estudo comparativo para avaliação da qualidade de amostras de papaína comercializadas por empresas fornecedoras de insumos farmacêuticos do estado de São Paulo. **Rev. Eletrônica Farmácia**, v. 12, p. 24-31, 2015.

BORELLA, J.C.; SIMÕES, R.F.; PUGA, R.L.A.; STEVANATO, M.C.B. Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas. **Infarma**, v. 28, p. 179-184. 2016.

BOX, C.V.; LACOEUILLE, F.; BELLOCHE, C.; LEPAREUR, N.; LEMAIRE, L. LE JEUNE, J.J.; BENOIT, J.P.; MENEI, P.; COUTURIER, D.E.; GARCION, E.; HINDRE, F.; Tumor eradication in rat glioma and by-pass of immunosuppressive barriers using internal radiation with ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules. **Biomaterials**. v 32. p 6781-6790. 2011.

BRITO, R. A História da Produção de Radiofármacos no IPEN. **Centro de Radiofarmácia**. Disponível em: www.ipen.br. 2012.

CHANDRAPALA, J.; ZISU, B.; PALMER, M.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of protein in reconstituted whey protein concentrate. **Ultrason Sonochem**. v. 18, p. 951-957. 2011.

CHEN, Y-Y.; LU, Y-H.; MA, C-H.; TAO, W-W.; ZHU, J-J.; ZHANG, W. A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar. **Biomedic & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 82-91. 2017.

CHOI, H.; KANG, H.; PARK, H. Extended solvent-contact model for protein solvation:

test cases for dipeptides. **J Mol Graph Model.** 42, 50-59. (2013).

DA SILVA, R.C.; DA SILVA, R.M.; AQUINO, K.A.S. A interação da radiação gama com a matéria no processo de esterilização. **Rev. Virtual Quim.**, v. 6, p. 1624-1641, 2014.

DESAI, D.; KUMAR, A.; BOSE, D.; DATTA, M. Ultrasensitive sensor detection of early stage chronic kidney disease in human. **Biosens Bioelectron**, v. 105, p. 90-94. 2018.

DEVRAJ, K.M.; RAMANJANEVULU, K.; NARENDER, K.R.; RAVIKANTH, V.; SAISUPRAJA, B.; ALANKRITHARANI, P.; LAKSHMI, S.V.V.N.S.M. Evaluation of Papain Immobilization in Chitosan Nanoparticles using different crosslinking agents. **J Pharm Research**, v. 4, p. 8. 2011.

DJOULLAH, A., KRECHICHE, G., HUSSON, F., SAUREL, R. Size measuring techniques as tool to monitor pea proteins intramolecular crosslinking by transglutaminase treatment. **Food Chemistry**. v. 190, p. 197-200. 2016.

DRENTH, J.; JANSONIUS, B.G.; The crystal structure of papain: A three dimensional fourier synthesis at 4,5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**. v 24. p 449-459. 1967.

DZAUGIS, M.; SPIVACK, A.J.; D'HONDT, S. A quantitative model of water radiolysis and chemical production rates near radionuclide-containing solids. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 115. p. 127–134. 2015.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**. v. 82, p. 70-77. 1959.

ELSADEK B., KRATZ. F. Impact of albumin on drug delivery—new applications on the horizon. **J. Control. Release.** v.157. p. 4–28. 2012.

ESMAILI, M., GHAFFARI, S.M., MOOSAVI-MOVAHEDI, Z., ATRI, M.S., SHARIFIZADEH, A., FARHADI, M., YOUSEFI, R., CHOBERT, J.M., HAERTLÉ, T., MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Beta caseinmicelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. **LWT - Food Sci. Technol.** v. 44, p. 2166–2172. 2011.

FAINTUCH, B. L.; SANTOS, R. L. S. R.; SOUZA, A. L. F. M.; HOFFMAN, T. J.; GREELEY, M.; SMITH, C. J. 99mTc-HYNIC-Bombesin (7-14)NH₂: Radiochemical Evaluation with Co-ligands EDDA (EDDA 5 Ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid), Tricine, and Nicotinic Acid. **Synth React Inorg M** v. 35, p. 43-51, 2005.

FENG, H., BARBOSA-CANOVAS, G., WEISS, J. Ultrasound technologies for food and bioprocessing R. Mawson, M. Gamage, N.S. Terefe, K. Knoerzer (Eds.), Ultrasound in enzyme activation and inactivation, **Springer**, New York (2010), pp. 369-404.

FERRAZ, C. C.; VARCA, G.H.C.; VILA, M. M.D.C.; LOPES, P.; Validation of in vitro analytical method to measure papain activity in pharmaceutical formulations. **Int J of Pharm Sci.** v. 6; n 2. 2014.

FRENCH, J.T.; GOINS, B.; SAENZ, M.; LI, S.; GARCIA, X.R.; OTTO, R.A.; BAO, A.; Interventional therapy of head and neck cancer with lipid nanoparticle-carried rhenium 186 radionuclide. **J Vasc Interv** v 21. p 1271-1279. 2010.

GIULIVI, C.; TRAASETH, N.J.; DAVIES, J.K. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. **Amino Acids** n. 25. p. 227–232. 2003.

GRANDISHAR, W.J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. **Expert Opin. Pharmacother.** n. 7. p. 1041–1053. 2006.

GULSEREN, I.; GUZEY, D.; BRUCE, B. D.; WEISS, J. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. **Ultrason Sonochem.** 14, 173-183. 2007.

GUO, J-T.; XIANG, Y.; GUAN, Z.; HE, Y-H. Papain-catalyzed aldol reactions for the synthesis of trifluoromethyl carbinol derivatives. **J Mol Catal B Enzym**, v. 131, p. 55-64. 2016.

HALDER, K.K.; MANDAL, B.; DEBNATH, M.C.; BERA, H.; GHOSH, L. K.; GUPTA, B.K. Chloramphenicol-incorporated poly lactide-co-glycolide (PLDA) nanoparticles: Formulation, characterization, technetium-99m labeling and biodistribution studies. **J Drug Target**, v. 16, n. 4, p. 311-320, 2008.

HALLIWEEL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys.** v. 246, p. 501-512. 1986.

HESSLEWOOD SR, KEELING DH. Frequency of adverse reactions to radiopharmaceuticals in Europe. **Eur J Nucl Med** v.24, p.1179-1182. 1997.

HU, H.; LI-CHAN, E.C.Y.; ZHU, L.; ZHANG, F.; XU, X.; FAN, G.; WANG, L.; HUANG, X.; PAN, S. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. **Food Hydrocol.** v. 30, n. 2, p. 647-655. 2013.

HUANG, X.; KORÁNYI, T. I.; BOOT, M.S.; HENSE, E. J. M. Ethanol as capping agent and formaldehyde scavenger for efficient depolymerization of ligning to aromatics. **Green Chemistry.** v. 11. 2015

ISO 11737-2:2009 - Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process. **International Organization for Standardization**. 2009.

ISO 13321:1996. Particle size analysis - Photon correlation spectroscopy. **International Organization for Standardization**. 1996.

ISO 22412:2008. Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS). **International Organization for Standardization**. 2008.

ISO 11737-2:2009 - Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process. **International Organization for Standardization**. 2009.

KADLUBOWSKI, S. Radiation-induced synthesis of nanogels based on poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) – A review. **Rad Phys Chem**. v 102. p 29-39. 2014.

KAMPHUIS, I.G.; KALK, K.H.; SWARTE, M.B.A.; DRENTH, J.; Structure of Papain Refined at 1.65 Å Resolution. **J Mol Bio** v.179, p. 233 – 256. 1984.

KILARA, A.; SHAHANI, K.M. Preparation and properties of immobilized papain and lipase. **Biotechnol Bioeng**. v. 19, n. 11, p. 1703-1714. 1977.

LACAZ, C.S. PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Guia para identificação: fungos actinomicetos, algas de interesse médico. **Editores Sarvier**, 1st edition. 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v. 227, p. 680–685. 1970.

LAL, M.; RAO, R.; FANG, X.; SCHUCHMANN, H-P.; SONNTAG, C. Radical-Induced

Oxidation of Dithiothreitol in Acidic Oxygenated Aqueous Solution: A Chain Reaction.

J Am Chem Soc. v. 119, p. 5735-5739. 1997

LE CAËR, S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. **Water.** v 3. p. 235–253. 2011.

LEICHNER, C.; MENZEL, C.; LAFFLEUR, F.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Development and in vitro characterization of a papain loaded mucolytic self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). **Int J Pharm**, v. 530, p. 346-353. 2017.

LIGHT, A.; FRATER, I.; KIMMEL, J.R.; SMITH, E. Current status of the structure of papain: the linear sequence, active. **Proc Nat Acad Sci USA.** v. 62, p. 1276. 1964.

LIU, S.; HÖLDRICH, M.; SIEVERS-ENGLER, A.; HORAK, J.; LÄMMERHOFER, M. Papain-functionalized gold nanoparticles as heterogeneous biocatalyst for bioanalysis and biopharmaceuticals analysis. **Analytica Chimica Acta**, 963, 33-43. 2017.

LOPES, P.S.L.; PINTO, C.A.S.O.; BABY, A.R.; VELASCO, MARIA V.R.; MARIA, E.T., KANEKO. T.M. Evaluation of in vitro percutaneous enhancement effect of papain and pequi oil on diclofenac sodium permeation through human skin. **Rev Bras Cienc Farm.**, v. 44, n. 2, p. 225-231, 2008.

MALIK, M.A.; SHARMA, H.K.; SAINI, C.S. High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. **Ultras Sonochem.** v. 39, p. 511-519. 2017.

MARQUES, F.L.N.; OKAMOTO, M.R.Y.; BUCHPIGUEL, C.A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiol**

Brasil. v. 34, p. 233-239. 2001;

MITCHEL, R.E.; CHAIKEN, I.M.; SMITH, E.L. The complete amino acid sequence of papain. Additions and corrections. **J Biol Chem.** v. 245, n. 14, p. 3485-3492. 1970.

MIURA, D. Y. Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de géis de papaína destinados ao tratamento de feridas. **Universidade Federal Fluminense.** 2012.

MULLER, C.; LEITHNER, K.; HAUPTSTEIN, S.; HINTZEN, F.; SALVENMOSER, W.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Preparation and characterization of mucus-penetrating papain/poly (acrylic acid) nanoparticles for oral drug delivery applications. **J Nanopart Res**, v. 15, p. 1353. 2013.

MULLER, A.; BARAT, S.; CHEN, X.; BUI, K.C.; BOZKO, P.; MALEK, N.P.; PLENTZ, R.R. Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines. **Int J Oncol** v. 48, p. 2025-2034. 2016.

NELSON, D.; COX, M. Lehninger Principles of Biochemistry 4th Ed. **W.H. Freeman and Company.** Nova York. 2005.

O'NEIL, M.J.: The Merck Index, 13th edn. Merck Research Laboratories, **Whitehouse Station**, NJ (2001)

PINTO C. A. S. O. Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas contendo papaína livre e modificada. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.** 2005.

QUEIROZ, R. G.; VARCA, G.H.; KADLUBOWSKI, S.; ULANSKI, P.; LUGÃO, A.B. Radiation-synthesized protein-based drug carriers: Size-controlled BSA nanoparticles. **Int J Biol Macromol**, v. 85, p. 82-91, 2016.

SAHA, A.; MANDAL, P.C.; BHATTACHARYA, S.N.; Radiation-induced inactivation of enzymes—a review. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 46, p. 123-145. 1995.

SANTOS-CUEVAS, C.; DAVANZO, J.; FERRO-FLORES, G.; GARCIA-PEREZ, F.O.; OCAMPO-GARCIA, B.; IGNACIO-ALVAREZ, E.; GÓMEZ-ARGUMOSA, E. ^{99m}Tc-labeled PSMA inhibitor: Biokinetics and radiation dosimetry in healthy subjects and imaging of prostate cancer tumors in patients. **Nuclear Medicine and Biology**. v 52. p 1-6. 2017.

SHEKUNOV, B.Y.; CHATTOPADHYAY, P.; TONG, H.H.; CHOW, A.H. Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. **Pharm. Res.** v.24, p. 203–227. 2007.

SHELDON, R.A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Microbiol. Biotechnol.** n. 92. p. 467–477. 2011.

SHENG, W.; XI, Y.; ZHANG, L.; YE, T.; ZHAO, X. Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. **Int J Biol Macromol.** v. 114, p. 143-148. 2018.

SILVA, C.R.; OLIVEIRA, M.B.N.; MOTTA, E.S.; ALMEIDA, G.S.; VARANDA, L.L.; PÁDULA, M.; LEITÃO, A.C.; CALDEIRA DE ARAÚJO, A. Genotoxic and Cytotoxic Safety Evaluation of Papain (Carica papaya L.) Using In Vitro Assays. **J Biomed and Biotechnol.** 2010. doi.org/10.1155/2010/197898

SIM, Y.C.; NAM, Y.S.; SHIN, Y.H.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I.S.; RHEE, J.S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as an enzymatic transdermal drug penetration enhancer. **Pharmazie**, v. 58, n. 4, p. 252-6, 2003.

SINGH, H., MACRITCHIE, F. Use of sonication to probe wheat gluten structure. **Cereal Chem.** v. 78, p. 526-529. 2001.

SINGH, D. E SINGH, R. Papain incorporated chitin dressings for wound debridement sterilized by gamma radiation. **Radiat Phys Chem.** v 81. p 1781-1785. 2012.

SLUYTERMAN, L. A., AND DE GRAAF, M.J., The effect of salts upon the pH dependence of the activity of papain and succinyl-papain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 258, p. 554-561. 1972.

SOTO ESPINOZA, S.L.; SÁNCHEZ, M.L.; RISSO, V.; SMOLKO, E.E.; GRASSELLI, M. Radiation synthesis of seroalbumin nanoparticles. **Radiat Phys. Chem.** v. 81. p 1417-1421. 2012.

SZABÓ, A.; KOTORMÁN, M.; LACZKÓ, I.; SIMON, L.M.; Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents. **J Mol Catal B: Enzym.** v. 41, p 43-48. 2006.

TARHINI, M., GREIGE-GERGES, H., ELAISSARI, A., Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. **Int J Pharm.** 2017., <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.067>

TSAI, C.S.; LIU, W.C.; CHEN, H.Y.; HSU, W.C. Preparation and characterization of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles labeled with Technetium-99m pertechnetate. **Applied Mechanics and Materials**, v. 459, p. 51-59. 2014.

ULANSKI, P.; JANIK, I.; ROSIAK, J.M. Radiation formation of polymeric nanogels. **Radiat. Phys. Chem.** v 52. p 289-294. 1998.

ULANSKI, P.; ROSIAK, J.M. The use of radiation technique in the synthesis of

polymeric nanogels. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B**, v 151. p 356-360. 1999.

United States Pharmacopeia. 2017. <1113> Microbial characterization identification and strain typing. United States Pharmacopeia 40, NF 35, 1419.

VARCA, G.H.C.; FERRAZ, C.C.; LOPES, P.S.; MATHOR, M.B.; GRASSELLI, M.; LUGÃO, A.B.; Radio-synthesized protein-based nanoparticles for biomedical purposes. **Radiat Phys Chem.** p 181-185. 2014a.

VARCA, G. H. C.; PEROSI, G.G; GRASSELLI, M.; LUGÃO, A. B.; Radiation Synthesized Protein-Based Nanoparticles: A Technique Overview. **Radiat Phys Chem**, p 48-52. 2014b.

VARCA, G.H.C.; KADLUBOWSKI, S.; WOLSZCZAK, M.; LUGÃO, A.B.; ROSIAK, J.M.; ULANSKI, P.; Synthesis of papain nanoparticles by electron beam irradiation – A pathway for controlled enzyme crosslinking. **Int J Biol Macromol.** v. 92. p 654–659. 2016

VEHABOVIC M, HADZOVIC S, STAMBOLIC F, HADZIC A, VRANJES E, HARACIC E. Stability of ranitidine in injectable solutions. **Int J Pharm.** v. 256, p. 109–115, 2003.

WAHOME, N., PFEIFFER, T., AMBIEL, I., YANG, Y., KEPPLER, O.T., BOSCH, V., BURKHARD, P. Conformation-specific Display of 4E10 and 2F5 Epitopes on Self-assembling Protein Nanoparticles as a Potential HIV Vaccine. **Chem. Biol. Drug Des.** v. 80. p. 349–357. 2012.

WANG, G.; CHEN, Y.; YAN, C.; LU, YAN. Study on the interaction between gold nanoparticles and papain by spectroscopic methods. **J Lumin.** 157, 229-234. 2015.

WELLINGHAUSEN, N. Coryneform Gram-positive rods. 10th d.J. Versalovic, K.C. Carroll, G. Funke, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, D.W. Warnock(Eds.), Manual of clinical microbiology, vol. 1, **ASM Press**, Washington, DC. P 413-442. 2011.

YANJUN, S.; JIANHANG, C.; SHUWEN, Z.; HONGJUAN, L.; JING, L.; LU, L.; ULUKO, H.; YANLING, S.; WENMING, C.; WUPENG, G.; JIAPING, L. Effect of power ultrasound pretreatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. **J Food Eng.** v. 124, p. 11-18. 2014.

YU, Z-L., ZENG, W-C., ZHANG, W-H., LIAO, X-P., SHI, B. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. **Ultrason Sonochem.** v. 21, p. 930-936. 2014.

ZHANG, Q.T.; TU, Z.C.; XIAO, H.; WANG, H.; HUANG, X.Q.; LIU, G.X.; LIU, C.M.; SHI, Y.; FAN, L.L.; LIN, D.R.; Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate. **Food Bioprod Process.** v. 92, p. 30-37. 2014.