UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de concentração: Tecnologia Químico-Farmacêutica

Extração de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) por sistemas de duas fases aquosas e sua aplicação em hidrogel polimérico

Letícia Celia de Lencastre Novaes

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Co-orientadora:

Prof.^a Dr.^a Priscila Gava Mazzola

São Paulo

2013

LETÍCIA CELIA DE LENCASTRE NOVAES

Extração de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) por sistemas de duas fases aquosas e sua aplicação em hidrogel polimérico

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para
obtenção de Título de Doutor em Ciências:
Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Área de
Concentração Tecnologia Químico-Farmacêutica

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Priscila Gava Mazzola

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

N935e	<p>Novaes, Leticia Celia de Lencastre Extração de bromelina dos resíduos de abacaxi (<i>Ananas comosus</i>) por sistemas de duas fases aquosas e sua aplicação em hidrogel polimérico / Leticia Celia de Lencastre Novaes. -- São Paulo, 2013. 153p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Pessoa Junior, Adalberto Co-orientador: Mazzola, Priscila Gava</p> <p>1. Produtos biotecnológicos : Purificação 2. Tecnologia farmacêutica I. T. II. Pessoa Junior, Adalberto, orientador. III. Mazzola, Priscila Gava, co-orientador.</p> <p style="text-align: right;">620.8 CDD</p>
-------	--

NOVAES, L. C. L. **Extração de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) por sistemas de duas fases aquosas e sua aplicação em hidrogel polimérico.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais,
Célia Regina e José Antonio
por todo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior, pela atenção, apoio e orientação, que contribuíram para o meu crescimento científico.

À Prof.^a Dr.^a. Priscila Gava Mazzola, pela amizade, apoio, incentivo e orientação.

Ao Prof. Dr. Achim Göpferich, que me acolheu e me orientou em seu laboratório em Regensburg.

À recém Prof.^a Dr.^a Valéria de Carvalho Santos Ebinuma pela amizade, incentivo e auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

A todos os alunos de iniciação científica do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, em especial à Beatriz, que contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pelo apoio e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de disciplinas e dos laboratórios do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pelo apoio, sugestões, convívio e amizade.

Aos funcionários Alex, Elza, Juarez, Luiz, Mirian e Gledson, pelo apoio, convívio e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (DAAD) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de alemão e de doutorado sanduíche.

À querida “equipe alfa”, Angela e André, pela amizade, carinho, e companheirismo. Aos meus amigos que mesmo que a distância estavam presentes no meu dia a dia, em especial à Bonie e Carol. Ao Renan, que por um curto e intenso período de convivência, virou minha família.

Ich wünsche allen Freunden von dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie für die Momente, die wir gemeinsam teilen, zu danken. Ich danke Alexander auf mich aufzupassen, während ich in Regensburg war, und auch für die Freundschaft. Ich danke Borislava für die Unterhaltungen, Mittagessen, alle Gelächters, und natürlich, die Freundschaft. Ich vermisse euch sehr!

Aos meus pais, Célia Regina e José Antonio, e ao meu irmão, Helder, que sempre me apoiaram em todas minhas decisões.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram e participaram destes quatro anos de doutoramento.

RESUMO

DE LENCASTRE NOVAES, L. C. **Extração de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) por sistemas de duas fases aquosas e sua aplicação em hidrogel polimérico.** 2013. 153f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bromelina é um nome coletivo para enzimas proteolíticas encontradas no talo, fruto e folhas do abacaxi (*Ananas comosus* Merr). A bromelina possui propriedades anti-inflamatórias, de debridamento, entre outras. Para a produção da bromelina deve-se, preferencialmente, usar resíduos do abacaxi, visto que os produtos do fruto têm aplicação comercial. Este trabalho teve como objetivo a extração de bromelina a partir de cascas de abacaxi através de sistema de duas fases aquosas (SDFA), e sua aplicação em hidrogel polimérico. Foram realizados estudos de estabilidade da bromelina comercial, em que se observou maior estabilidade em pH 5,0 com menor perda da atividade relativa em todas as temperaturas estudadas (20, 30, 40 e 50°C). O estudo da extração da bromelina em SDFA formado por polietileno glicol (PEG) e ácido poliacrílico (PAA) (com auxílio da análise de variância de parâmetros como rendimento, fator de purificação e coeficiente de partição) proporcionou rendimento de 335% e fator de purificação de 25,8. Os hidrogéis poliméricos à base de PEG estudados apresentaram-se flexíveis, com pouca elasticidade e taxa de absorção superior a 1000%. Hidrogel carregado de bromelina pelo método de turgescência proporcionou a maior liberação da enzima, assim como a maior atividade (80% da bromelina liberada em 24 h e 278 ± 89 U/mL).

Palavras-chave: Bromelina, sistemas de duas fases aquosas, hidrogel.

ABSTRACT

DE LENCASTRE NOVAES, L. C. **Extraction of bromelain from pineapple waste (*Ananas comosus*) by aqueous two-phase systems and its application in polymeric hydrogels.** 2013. 153f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bromelain is a collective name for the proteolytic enzymes found in the stem, fruit and leaves of pineapple (*Ananas comosus* Merr.). Bromelain possesses anti-inflammatory properties, debridement, among others. For bromelain production one should preferably use the waste materials, whereas pineapple fruit products have commercial application. This study aimed to extract bromelain from pineapple peels using aqueous two-phase system (ATPS), and its application in polymeric hydrogels. Stability studies of commercial bromelain were performed, which found greater stability at pH 5.0 with minor loss of relative activity at all temperatures studied. The study of bromelain extraction in ATPS composed by polyethylene glycol (PEG) and poly acrylic acid (PAA) (with assistance of variance analysis of parameters such as yield, purification factor and partition coefficient) showed yield 335% and purification factor of 25.8. The PEG-based hydrogels studied presented flexibility, low elasticity and swelling ratio higher than 1000%. Hydrogel containing bromelain, loading by embedding (solvent sorption) method, yielded the highest enzyme release, as well as the highest activity (80% bromelain released over 24 h and 278 ± 89 U / mL).

Keywords: Bromelain, aqueous two-phase systems, hydrogel

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Ilustração do abacaxi.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 2: Modelagem “cartoon” da (A) bromelina e (B) papaína. Fonte: www.ebi.ac.uk/pdsum. Bromelina, modelo teórico, PDB id: 1w0q; papaína, PDB id: 1khp.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3: Sequência de aminoácidos da bromelina do talo.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 4: Sequência N terminal das endopeptidases provenientes do abacaxi e papaína.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 5: Representação da ligação peptídica clivada pela enzima.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 6: Curva padrão de tirosina obtida em leitor de microplaca.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 7: Gráfico de $\ln(k_{obs})$ em função do inverso da temperatura (empregado para o cálculo da energia de ativação).</i>	<i>46</i>
<i>Figura 8: Gráfico de $\ln(k/T)$ em função do inverso da temperatura (empregado para o cálculo de entropia e entalpia).</i>	<i>47</i>
<i>Figura 9: Estabilidade relativa da bromelina em pH 2,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 10: Estabilidade relativa da bromelina em pH 3,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 11: Estabilidade relativa da bromelina em pH 4,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 12: Estabilidade relativa da bromelina em pH 5,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>51</i>

<i>Figura 13: Estabilidade relativa da bromelina em pH 6,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 14: Estabilidade relativa da bromelina em pH 7,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 15: Estabilidade relativa da bromelina em pH 8,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 16: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em PEG 2000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 17: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em PEG 4000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 18: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em PEG 6000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 19: Estabilidade relativa da bromelina a 30 °C, em PEG 2000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 20: Estabilidade relativa da bromelina a 30 °C, em PEG 4000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 21: Estabilidade relativa da bromelina a 30 °C, em PEG 6000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>61</i>

<i>Figura 22: Estabilidade relativa da bromelina a 40°C, em PEG 2000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 23: Estabilidade relativa da bromelina a 40°C, em PEG 4000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 24: Estabilidade relativa da bromelina a 40° C, em PEG 6000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 25: Estabilidade relativa da bromelina a 50 °C, em PEG 2000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 26: Estabilidade relativa da bromelina a 50°C, em PEG 4000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 27: Estabilidade relativa da bromelina a 50°C, em PEG 6000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 28: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 29: estabilidade relativa da bromelina a 30°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 30: estabilidade relativa da bromelina a 40°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.....</i>	<i>69</i>

<i>Figura 31: estabilidade relativa da bromelina a 50°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 32: Curva padrão de tirosina obtida em leitor de microplaca.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 33: Curva padrão de albumina.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 34: Curva binodal obtida com PEG 2000 g/mol, PAA 8000 g/mol e 1,65% de Na₂SO₄, na presença e na ausência de bromelina comercial.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 35: Curva binodal obtida com PEG 4000 g/mol, PAA 8000 g/mol e 1,65% de Na₂SO₄, na presença e na ausência de bromelina.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 36: Curva binodal obtida com PEG 6000 g/mol, PAA 8000 g/mol e 1,65% de Na₂SO₄, na presença e na ausência de bromelina.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 37: Hidrogel formado com polietileno glicol 10kDa.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 38: Taxa de absorção versus tempo (h) do hidrogel com 12,5% de PEG-DA 10 kDa (formulação 4).....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 39: Taxa de absorção versus tempo (h) do hidrogel com 15% de PEG-DA 10 kDa (formulação 5).....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 40: Taxa de absorção versus tempo (h) do hidrogel com 17,5% PEG-DA 10 kDa (formulação 6).....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 41: Tensão à ruptura e tensão de tração em carga máxima para as formulações 4, 5 e 6.....</i>	<i>123</i>
<i>Figura 42: Massa remanescente após lavagem (PEG-DA: polietileno glicol diacrilato, PVA: polivinil álcool, PVA-MA: polivinil álcool metacrilato).....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 43: Taxa de absorção versus tempo (h) do hidrogel com 1,5% PEG-DA 10 kDa e 0,5% PVA-MA (formulação 7).....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 44: Tensão à ruptura e tensão de tração em carga máxima para as formulações 4 e 7.....</i>	<i>128</i>

<i>Figura 48: Massa remanescente dos hidrogéis após lavagem.</i>	<i>129</i>
<i>Figura 46: Massa remanescente dos hidrogéis após lavagem</i>	<i>131</i>
<i>Figura 47: Massa remanescente dos hidrogéis após lavagem.</i>	<i>132</i>
<i>Figura 48: Taxa de absorção das formulações 17, 18, 19, 22 e 23.....</i>	<i>133</i>
<i>Figura 49: Típico reograma do hidrogel 18, polimerizado a temperatura ambiente e 50°C.</i>	<i>134</i>
<i>Figura 50: Típico reograma do hidrogel 19, polimerizado a temperatura ambiente e 50°C.</i>	<i>134</i>
<i>Figura 51: Típico reograma do hidrogel 23, polimerizado a temperatura ambiente e 50°C.</i>	<i>135</i>
<i>Figura 52: Varredura de frequência do hidrogel gel 18 polimerizado a temperatura ambiente e a 50°C.</i>	<i>137</i>
<i>Figura 53: Varredura de frequência do hidrogel 19 polimerizado a temperatura ambiente e a 50°C.....</i>	<i>137</i>
<i>Figura 54: Varredura de frequência do hidrogel 23 polimerizado a temperatura ambiente e a 50°C.....</i>	<i>138</i>
<i>Figura 55: Carga máxima, tensão à ruptura e tensão de tração em carga máxima para as formulações 18, 19 e 23, polimerizadas em temperatura ambiente (TA) e a 50°C.....</i>	<i>139</i>
<i>Figura 56: Atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis 18; 19 e 21, carregado com bromelina através da metodologia de difusão por turgescência.....</i>	<i>140</i>
<i>Figura 57: Atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis 18; 19 e 23, carregado com bromelina através da metodologia de cross link.....</i>	<i>141</i>
<i>Figura 58: Gráfico de Pareto. Efeito das variáveis (A) formulação do hidrogel (18; 19 ou 21); (B) temperatura de polimerização; (C) forma de absorção da bromelina; (D) temperatura do ensaio.</i>	<i>142</i>

<i>Figura 59: Liberação acumulada de bromelina pelos hidrogéis 18; 19 e 21, carregado com bromelina através da metodologia de difusão por turgescência.</i>	<i>143</i>
<i>Figura 60: Atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis 18; 19 e 23, carregado com bromelina através da metodologia de cross link.....</i>	<i>143</i>
<i>Figura 61: Gráfico de Pareto. Efeito das variáveis (A) formulação do hidrogel (18; 19 ou 21); (B) temperatura de polimerização; (C) forma de absorção da bromelina; (D) temperatura do ensaio.</i>	<i>144</i>

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1: Propriedades físico-químicas das endopeptidases do abacaxi.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 2: Composição de aminoácidos da bromelina do fruto*.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 3: Valores de energia de ativação (Ea), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para os diferentes pHs estudados.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 4: Valores de energia de ativação (EA), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para as diferentes concentrações e massa molares de PEG estudadas.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 5: Valores de energia de ativação (Ea), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para as diferentes concentrações de PAA estudadas.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 6: Níveis dos fatores.....</i>	<i>84</i>
<i>Tabela 7: Valores obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 2000 g/mol e PAA 8000 g/mol e considerados para análise estatística.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 8: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação para os sistemas formados por PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 9: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do coeficiente de partição para o sistema formado por PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 10: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento para o sistema formado por PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 11: Valores obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 4000 g/mol e PAA 8000 g/mol e considerados para análise estatística.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 12: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) de coeficiente de partição para o sistema formado por PEG 4000 g/mol/PAA 8000 g/mol.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 13: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação para o sistema formado por PEG 4000 g/mol/PAA 8000 g/mol.....</i>	<i>89</i>

<i>Tabela 14. Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento para o sistema formado por PEG 4000 g/mol/PAA 8000 g/mol.</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 15: Valores obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 6000 g/mol e PAA 8000 g/mol e considerados para análise estatística.</i>	<i>91</i>
<i>Tabela 16 Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação para o sistema formado por PEG 6000 g/mol/PAA 8000 g/mol.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 17 Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do coeficiente de partição para o sistema formado por PEG 6000 g/mol/PAA 8000 g/mol.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 18. Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento para o sistema formado por PEG 6000 g/mol/PAA 8000 g/mol.</i>	<i>93</i>
<i>Tabela 19: Planejamento fatorial 2⁶⁻².</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 20: Resultados obtidos pela extração da bromelina por sdfa (PEG/PAA) para respostas de rendimento e fator de purificação (FP) de acordo com o planejamento fatorial 2⁶⁻².</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 21: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) para a variável rendimento.</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 22: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do coeficiente de partição ..</i>	<i>98</i>
<i>Tabela 23: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação.</i>	<i>99</i>
<i>Tabela 24: Planejamento fatorial 2⁵⁻¹.</i>	<i>101</i>
<i>Tabela 25: Resultados obtidos pela extração da bromelina por SDFA (PEG/PAA) para respostas de rendimento, fator de purificação (FP) e coeficiente de partição; de acordo com o planejamento fatorial 2⁵⁻¹.</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 26: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento.</i>	<i>104</i>
<i>Tabela 27: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação.</i>	<i>105</i>
<i>Tabela 28: Formulação dos hidrogéis a base de polietileno glicol diacrilato 5 kDa. ...</i>	<i>120</i>

<i>Tabela 29: Formulação dos hidrogéis a base de polietileno glicol diacrilato 10 kDa.</i>	<i>120</i>
<i>Tabela 30: Valores de carga máxima obtidos através do teste de tração para cada formulação estudada.</i>	<i>123</i>
<i>Tabela 31: Teste de solubilidade entre PEG e PVA. Concentrações dos polímeros apresentada em porcentagem (% p/v).</i>	<i>124</i>
<i>Tabela 32: Formulações utilizadas para observar possível reação entre PEG-DA e PVA ou PVA-MA.</i>	<i>125</i>
<i>Tabela 33: Formulação utilizada para estudo da taxa de absorção.</i>	<i>126</i>
<i>Tabela 34: Formulações estudadas visando aperfeiçoar a reação de crosslink</i>	<i>129</i>
<i>Tabela 35: Formulações estudadas visando aperfeiçoar a reação de cross link, utilizando ácido ascórbico.</i>	<i>130</i>
<i>Tabela 36: Formulações de hidrogel para polimerização a 50 °C</i>	<i>131</i>
<i>Tabela 37: Força do gel ($[G^*]$)</i>	<i>136</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Fator pré-exponencial (s^{-1})
AMG	$\alpha 2$ macroglobulina
ANOVA	Análise de variância
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico
BCA	Ácido bicincônico
CD	Dicroísmo circular
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
Ea	Energia de ativação ($kJ\ mol^{-1}$)
GL	Graus de liberdade
h	Constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}\ J.s$)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K_B	Constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}\ J.K^{-1}$)
K_{obs}	Constante condicional (s^{-1})
LD50	Dose letal 50
MG	<i>Molten globule</i>
PAA	Ácido poliacrílico
PEG	Polietileno glicol
PGE2	Prostaglandina E2
QM	Média quadrática
R	Constante universal dos gases ($8,314\ J.K^{-1}.mol^{-1}$)
R^2	Coeficiente de correlação

SDFA	Sistema de duas fases aquosas
SQ	Soma Quadrática
T	Temperatura absoluta (K)
TxA2	Tromboxano
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia (kJ/mol)
ΔS	Entropia (J/K mol)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO	27
JUSTIFICATIVA.....	38
OBJETIVOS	39
<i>Objetivo Geral</i>	39
<i>Objetivos Específicos</i>	39
CAPITULO I ESTABILIDADE DA BROMELINA	41
INTRODUÇÃO	41
OBJETIVOS	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
<i>Solução padrão de bromelina</i>	44
<i>Determinação da atividade da bromelina</i>	44
<i>Estudo da estabilidade da bromelina em diferentes valores de pH, temperaturas e</i> <i>polímeros, com análise termodinâmica</i>	45
<i>Metodologia da análise termodinâmica</i>	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
<i>Estabilidade da bromelina padrão frente a diferentes valores de pH e temperatura</i>	48
<i>Estabilidade da bromelina padrão frente a diferentes massas molares e</i> <i>concentração de polietileno glicol e temperatura</i>	57
<i>Estabilidade da bromelina padrão frente a diferentes concentrações de ácido</i> <i>poliacrílico e temperatura</i>	67
CONCLUSÃO PARCIAL	72
CAPITULO II SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	73
OBJETIVOS	76
MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
<i>Solução padrão de bromelina</i>	76
<i>Determinação da atividade da bromelina</i>	76

<i>Determinação da concentração de proteínas totais</i>	<i>77</i>
<i>Preparo da matéria prima.....</i>	<i>78</i>
<i>Estudo da curva binodal dos sistemas PEG/PAA</i>	<i>78</i>
<i>Estudo da partição da bromelina em sistemas PEG/PAA</i>	<i>79</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
<i>Estudo das curvas binodais dos sistemas PEG/PAA.....</i>	<i>82</i>
<i>Estudo da extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi</i>	<i>84</i>
CONCLUSÃO PARCIAL.....	107
CAPITULO III HIDROGEL	109
FERIMENTOS E CURATIVOS	109
HIDROGEL.....	112
OBJETIVOS.....	116
MATERIAIS E MÉTODOS	116
<i>Determinação de proteínas.....</i>	<i>116</i>
<i>Determinação da atividade da bromelina</i>	<i>116</i>
<i>Preparo do hidrogel.....</i>	<i>116</i>
<i>Absorção de água pelo hidrogel.....</i>	<i>117</i>
<i>Teste de tensão</i>	<i>117</i>
<i>Caracterização Reologica do hidrogel</i>	<i>117</i>
<i>Absorção e liberação da bromelina pelo hidrogel.....</i>	<i>118</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
CONCLUSÃO PARCIAL.....	145
CONCLUSÃO GERAL	146
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

INTRODUÇÃO

O abacaxi foi descrito por Colombo em 1493 na ilha Guadalupe, localizada no oceano Atlântico, departamento ultramarino francês no Caribe. Tem sido usado na medicina popular por índios da América Central e do Sul, e seu uso relatado por exploradores do século 17. A existência da bromelina foi provavelmente primeiramente estabelecida por Marcano em 1891, e também por Chittenden, que a extraiu do suco e estudou sua ação em detalhes (BALLS, THOMPSON, KIES, 1941; TAUSSIG, BATKIN, 1988). Peckold e colaboradores, em 1876, encontraram a enzima proteolítica no abacaxi brasileiro. Heinecke descobriu em 1957 que o talo do abacaxi contém mais bromelina que a fruta, e a enzima passou a ser produzida em escala comercial (TAUSSIG, BATKIN, 1988).

FIGURA 1: Ilustração do abacaxi.

(http://etc.usf.edu/clipart/25400/25450/pineapple_25450.htm)

O nome bromelina foi originalmente aplicado a qualquer protease de qualquer planta membro da família *Bromeliaceae* (ROWAN, BUTTLE, 1994). É, portanto, um nome coletivo para enzimas proteolíticas ou proteases encontradas em tecidos, incluindo: talo, fruto e folhas de plantas da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi, *Ananas comosus* é o mais conhecido (MURACHI, YAMAZAKI, 1970; HENNRICH *et al.*, 1969; TAUSSIG, BATKIN, 1988; DOKO *et al.*, 1991; MAURER, 2001). Constitui uma mistura incomum, complexa, de diferentes tiol-endopeptidases e outros

componentes não completamente caracterizados como: fosfatases, glicosidases, peroxidases, celulasas, glicoproteínas, ribonuclease, carboidratos, entre outros (HENNRICH *et al.*, 1969; TAUSSIG, BATKIN, 1988).

Compreende principalmente espécies enzimáticas múltiplas glicosiladas da superfamília da papaína, com diferentes atividades proteolíticas, massas molares entre 20 e 31 kDa e pontos isoelétricos entre 4,6 e 10 (MAURER, 2001). Uma família enzimática considera um grupo de enzimas que mostram uma relação evolutiva para, pelo menos, uma enzima. A maior família de cisteína-proteases identificada até o momento por sequencia homóloga é a família da papaína, dos quais seus membros incluem uma ampla gama de enzimas, tanto procariotas quanto eucariotas, abrangendo bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados (CYGLER, MORT, 1997).

A atividade enzimática da bromelina compreende largo espectro, com pH ótimo entre 5,5 e 8,0. A bromelina cliva, preferencialmente, ligações peptídicas glicil, alanil e leucil (MAURER, 2001). É inativada quando submetida a temperaturas comumente utilizadas em pasteurização, e sua desnaturação térmica é irreversível (BALLS, THOMPSON, KIES, 1941; RABELO, TAMBOURGI, PESSOA, 2004).

A fração proteolítica do talo do abacaxi tem sido chamada bromelina do talo, enquanto que a presente na fruta, bromelina da fruta. É evidente que existe considerável confusão, quanto à possibilidade das enzimas serem distintas proteínas ou representam duas formas de uma única enzima, e a confusão foi exacerbada pelo uso do mesmo nome, bromelina (ROWAN, BUTTLE, 1994).

A bromelina procedente do talo do abacaxi (EC 3.4.22.32, anteriormente designada como EC 3.4.22.4) apresenta ponto isoelétrico igual a 9,5 é a mais abundante protease entre as preparações derivadas do abacaxi. Já a bromelina do fruto do abacaxi (EC 3.4.22.33, anteriormente designada como EC 3.4.22.5) apresenta ponto isoelétrico igual a 4,6, e está presente em menor quantidade.

Muitos estudos contraditórios descreveram mais de seis componentes diferentes no talo, e pelo menos dois na fruta, dependendo da localização geográfica do abacaxi (ROWAN, BUTTLE, 1994). Recentemente, o abacaxi tem mostrado conter pelo menos quatro cisteína-endorpeptidases. As mais proeminentes são a bromelina do

talo e da fruta; e as duas adicionais são ananaína (EC 3.4.22.31), e a comosaína (ROWAN, BUTTLE, 1994; HALE *et al.*, 2005).

Algumas características físico-químicas das endopeptidases encontradas no abacaxi são resumidas na Tabela 1. A bromelina do talo é mais alcalina e maior que a papaína (massa molar 23,4 kDa e pI 8,75 ~ 9,55). Já bromelina do fruto é uma proteína ácida, ao contrário da bromelina do talo.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas das endopeptidases do abacaxi.

Endopeptidase	Massa Molar (kDa)	pI	A ^{1%} _{280 nm}	Presença de Glicoproteínas
Bromelina do talo	23,8 a 27	9,5	20,1	Sim
Bromelina do fruto	25 a 31	4,6	19,2	Sim
Ananaína	23,4 a 25	> 10	16,5	Não
Comosaína	24,5	> 10		Sim

pI: ponto isoelétrico, A^{1%}_{280 nm}: absorbância, adaptado de (ROWAN, BUTTLE, 1994).

FIGURA 2: Modelagem “cartoon” da (A) bromelina e (B) papaína. Fonte: www.ebi.ac.uk/pdsum. Bromelina, modelo teórico, PDB id: 1w0q; papaína, PDB id: 1khp.

A sequência de aminoácidos da bromelina do talo foi determinada por Ritonja e colaboradores, em 1989, demonstrando que esta enzima é membro da família da papaína (Figura 3). As composições de aminoácidos da bromelina do fruto, de frutos maduros e verdes são mostradas na Tabela 2. A bromelina do talo possui somente um resíduo de histidina por molécula, enquanto que a papaína possui dois resíduos de histidina. Também a bromelina contém um resíduo de metionina e a papaína não o possui (MURACHI, 1976).

A bromelina do talo possui um grupamento sulfidril reativo por molécula, sendo essencial para a atividade catalítica (MURACHI, 1976).

```

1      10      20      30      40      50      60      70
AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNPCGACWAFAAIATVESIYKIKKGILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGWEFR

{Intact protein}
AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNPCGACWAFAAIATVESIYKIKK-->

{CN1}
AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNPCGACWAFAAIATVESIYKIKKGIL-->

{CNA}                                {CNC}                                {CND}
AVPQSIDX          {CNB}          AFAAIATVESIYKIKKGILEPLSEQQVLDCAKGYGCKGGX
          RDYGAVTSVKNQNPCGACX                                     EFR

{K1}                                {K3}                                {K4}  {K5}
AVPQSIDWRDYGAVTSVK          {K2}          KGILEPLSEQQVLDCAK          GGWEFR
          NQNPCGACWAFAAIATVESIYK          GYGCK

{E1}                                {E3}                                {E4} {E5}  {E6}
AVPQSIK          {E2}          SIYKIKKGILEPLSE          CAKGYGCKGGWE          FR
          WRDYGAVTSVKNQNPCGACWAFAAIATVE          QQVLX

80      90      100      110      * 120      130      140
APEFIISNKGVASGAIYPYKAAKGTCKTDGVPNSAYITGYARVPRNNESSMMYAVSKQPITVAVDANANF

{CND}                                {CN2}
APEFIISNKGVASGAIYPYKAAKGTCKTDGV-->          NYAVSKQPITVAVDANANF

{K5}                                {K7}                                {K8}
APEFIISNK          {K6}          GTCK          TDGVPNSAYITGYARVPRNXESSX
          GVASGAIYPYK

{E6}                                {E8}                                {E10}
APE          {E7}          GVPNSAYITGYARVPRNXX          {E9}          ANANF
          FIISNKGVASGAIYPYKAAKGTCKTX          SSMYAVSKQPITVAVX

150      160      170      180      190      200      210
QYYKSGVFNPGCGTSLNHAVTAIGTGQDSIIYPKKWGAKEAGYIRHARDVSSSSGICGIAIDPLYPTLEE

{CN2}                                {CNE} {CNF}                                {DP}
QYYKSGVFNPGCGTSLNHAVTAIGTGQDSI-->          GEAGYIRX          {CN3}          PLYPTLEE
          GAKX          ARDVSSSSGICGIAIDPLYPTLEE

{R10}                                {E11}  {E12}                                {E13}
QYYKSGVFNPGCGTSLNHAVTAIGTGQX          SIIYPKKWG          AKWGE          AGYIRHARDVSSSSGICGIAIDPLYPTLE

Ala A  25      Gln Q  7      Leu L  6      Ser S  17
Arg R  6      Glu E  9      Lys K  15      Thr T  9
Asn N  10     Gly G  22     Met M  3      Trp W  5
Asp D  8      His H  1      Phe F  6      Tyr Y  14
Cys C  7      Ile I  17     Pro P  11     Val V  14

Total: 212 residues; Mr: 22,828.

```

FIGURA 3: Sequência de aminoácidos da bromelina do talo.

(RITONJA *et al.*, 1989)

TABELA 2: Composição de aminoácidos da bromelina do fruto*.

	Fruto verde	Fruto maduro
Lisina	7,8	8,3
Histidina	1,4	1,3
Arginina	8,6	9,1
Ácido aspártico	29,8	29,8
Treonina	13,8	13,8
Serina	32,2	32
Ácido glutâmico	23,2	23,4
Prolina	11,6	12
Glicina	32,6	32,2
Alanina	23,8	24,4
Cisteína	10,0	10,0
Valina	19,8	20,1
Metionina	6,0	5,8
Isoleucina	16,4	16,2
Leucina	10,0	10,0
Tirosina	22,4	22,2
Fenilalanina	7,6	8,0
Triptofano	5,6	-
Amônia (amida)	43,0	43,4
Glucosamina	<0,2	<0,2
Carboidratos (%)	3,2	3,3

*Razões molares com leucina definido como 10.
Adaptado de (MURACHI, YAMAZAKI, 1970).

A bromelina do talo, proveniente de *Ananas cosmosus*, como outras cisteína proteinases, pertence à classe das proteínas $\alpha + \beta$, e possui uma alta similaridade

com as sequências de aminoácidos da papaína, actinidina, proteinase Ω , quimiopapaína (AHMAD *et al.*, 2006).

A sequência N-terminal das endopeptidases provenientes do abacaxi, juntamente com a da papaína é apresentada na figura abaixo (Figura 4). As endopeptidases do abacaxi estão relacionadas tanto no sentido evolucionário quanto estrutural (ROWAN, BUTTLE, 1994).

FIGURA 4: Sequência N terminal das endopeptidases provenientes do abacaxi e papaína.
(ROWAN, BUTTLE, 1994).

A bromelina do talo existe como uma única cadeia polipeptídica, com 211 ou 212 aminoácidos. A massa molar é estimada em 22.828 Da. A estrutura de um oligossacarídeo de preparações de bromelina tem sido reportada e, portanto, sua massa molar está ao redor de 23,8 kDa (RITONJA *et al.*, 1989).

A atividade da bromelina do talo é descrita como sendo ampla, visto que vários substratos sintéticos são hidrolisados por esta enzima (MURACHI, 1976). Em termos de especificidade para hidrólise de ligações amida, a ananaina e a bromelina do fruto são membros típicos da família da papaína, preferindo resíduos hidrofóbicos na posição 2 (P2 – Figura 5). Já a bromelina do talo é incomum, aparentemente requer uma arginina tanto na posição 1 (P1) quanto na posição 2 (P2) para uma clivagem eficiente em substratos pequenos (ROWAN, BUTTLE, 1994).

Substrato: - P3 - P2 - P1 † P1' - P2' - P3' -
--

FIGURA 5: Representação da ligação peptídica clivada pela enzima.

† indica o local de clivagem.

A bromelina do talo é comumente extraída a partir do suco do talo, por precipitação com acetona. Posteriormente pode ser purificada através de coluna cromatográfica de troca iônica, filtração em gel, e fracionamento por sulfato de amônio. A bromelina do fruto pode ser extraída por precipitação com acetona, e purificada por cromatografia de troca iônica (MURACHI, 1976).

A bromelina do talo é reversivelmente inibida por íons de mercúrio inorgânico, orgânicos mercuriais e tetrationato. Inibição irreversível ocorre quando a bromelina do talo reage com N-etilmaleimida, N-(4-dimetil-3,5-dinitrofenil) maleimida, ácido monoiodoacético e 1,3-dibromoacetona. Estes reagentes alquilam o grupo sulfidril essencial da enzima. Derivados de clorometil acetona também alquilam o grupamento sulfidrílico. Diisopropilfosfluoridato não inibe a bromelina do talo, mas alquilfosforila a enzima em pH 8,2 sem inibição da atividade protease. A alquilfosforilação ocorre nos grupamentos hidroxilas fenólicos dos resíduos de tirosina (MURACHI, 1976).

Os resíduos de tirosina na bromelina do talo podem ser acetilados com N-acetilimidazol a pH 7,5, ou nitrado com tetranitrometano a pH 8,0, sem alterações da atividade catalítica. Oxidação fotossensível da bromelina na presença de azul de metileno resulta na perda parcial da atividade enzimática, mesmo se o grupamento sulfidril essencial for protegido da oxidação. A fotoxidação envolve os resíduos de histidina, metionina e triptofano. O plasma humano inibe a hidrólise da caseína pela bromelina do talo, assim como a α 2-macroglobulina (MURACHI, 1976).

A partir do estudo de Seligman que mostrou, em 1962, sua ação como agente anti-inflamatório, vários estudos clínicos sustentam o uso de extratos de bromelina (SALAS *et al.*, 2008). Bromelina tem sido utilizada no tratamento de: artrite

reumatoide, tromboflebitas, hematomas, inflamações orais, úlceras diabéticas, inflamações retais e perirretais, ferimentos gerais e orais. Em todos os casos, a bromelina administrada por via oral causa redução significativa da dor e inchaço, e reduz o tempo de cicatrização pela metade do tempo comparado ao tratamento convencional (TAUSSIG, BATKIN, 1988).

A bromelina também tem sido usada como medicamento (via oral) para tratamento sistêmico de doenças relacionadas à coagulação sanguínea (MAURER, 2001). Deste modo, sua administração por via oral pode reduzir o risco de problemas relacionados com coágulos, como ataque cardíaco ou derrame, por dois prováveis mecanismos: (1) diminuição da prostaglandina E2 (PGE2) e/ou tromboxano (TxA2), aumento da concentração relativa de prostaciclina (PGI2) e prevenção da formação de coágulo; ou (2) hidrólise da placa de colesterol, limpando as paredes das artérias e minimizando a probabilidade de um vaso sanguíneo ser obstruído por um coágulo circulante (TAUSSIG, BATKIN, 1988). A atividade fibrinolítica e ação anti-agregação plaquetária são ações relevantes a se considerar, interferindo na fibrina e nas características coagulatórias de células tumorais, influenciando no crescimento tumoral. A bromelina pode, também, aumentar a defesa imunológica e diminuir as metástases (TAUSSIG, BATKIN, 1988).

Resultados obtidos, através de um estudo clínico, apoiam a ideia de que a bromelina possui um perfil de atividade de alvo múltiplo em sua ação anti-inflamatória. Esta ação é postulada de ter vantagens frente à inibição de alvos individuais, especialmente no tratamento de doenças complexas, como a inflamação múltipla (MÜLLER *et al.*, 2013).

Bromelina possui propriedade de debridamento de queimaduras (CHOBOTOVA, VERNALLIS, MAJID, 2010; MAURER, 2001). A bromelina hidrolisa o tecido desvitalizado de feridas *in vitro* e *in vivo* sem lesões evidentes ao tecido circundante normal, e melhora a cicatrização de feridas de arma de fogo (WU *et al.*, 2012). Debridamento enzimático, usando bromelina tópica em feridas incisais, melhora o microambiente da ferida para a reparação tecidual. Este debridamento enzimático poderia simplificar os procedimentos cirúrgicos, e pode servir como um

complemento útil para o debridamento cirúrgico convencional no futuro (WU *et al.*, 2012).

Bromelina também mostrou eficácia anti-helmíntica de 93% comparada ao tartarato de pirantel. Em um recente estudo (DOMINGUES *et al.*, 2013), os resultados obtidos *in vitro* mostraram que a bromelina apresentou atividade anti-helmíntica dose dependente.

Bromelina aumenta a imunidade dependente de células T *in vivo* e bloqueia a resposta de células T *in vitro*, além de aumentar a ligação antígeno-dependente de células T a monócitos *in vitro* (SALAS *et al.*, 2008).

Um estudo mostra a possibilidade da aplicação biotecnológica da bromelina na vinificação, para a prevenção de precipitados de proteínas indesejados após o engarrafamento do vinho (BENUCCI *et al.*, 2011).

Bromelina é absorvida pelo intestino, sendo rapidamente complexada com anti-proteases, principalmente α 2-macroglobulina (AMG) e α 1-tripsina. Este fato cria dificuldades para a determinação quantitativa da bromelina no soro. De qualquer modo, a molécula protetora AMG deixa a atividade proteolítica da bromelina intacta, porém reduzida (MAURER, 2001). É possível que bromelina penetre intacta na lamina própria e então afete a expressão de moléculas de superfície das células que não são diretamente expostas ao conteúdo do lúmen intestinal (HALE, *et al.* 2005).

De acordo com Moss e colaboradores (MOSS, FRAZIER, MARTIN, 1963), não foi possível determinar a LD50, dosagem (mg/kg de peso corporal) que causa morte em cinquenta por cento dos animais expostos a uma dada substância (LD – *Lethal dose* - dose letal) da bromelina com doses orais acima de 10 g/kg em ratos, camundongos ou coelhos. Para administração intraperitoneal (i.p.), a LD50 encontrada foi: 37 mg/kg para camundongos e 85 mg/kg para ratos. Após administração intravenosa (i.v.), a LD50 encontrada foi: 30 mg/kg para camundongo e 20 mg/kg para coelhos. Nenhuma reação tóxica imediata foi observada. Estas doses relativamente altas excedem as normalmente administradas a humanos.

Doses de 500 mg/kg por dia via oral, não provocam alteração na ingestão de alimentos, crescimento, histologia do coração, rim e baço, ou parâmetros

hematológicos em ratos. Bromelina é considerada não tóxica e sem efeitos colaterais, portanto pode ser usada em doses diárias de 200 a 2000 mg por longos períodos de tempo (MAURER, 2001).

Diferentemente da bromelina do talo, que é largamente usada na indústria, a bromelina do fruto não se encontra disponível comercialmente, apesar das grandes quantidades de fruta descartadas nas fábricas de conservas de abacaxi (DEVAKATE *et al.*, 2009).

Para a obtenção da bromelina deve-se, preferencialmente, usar os resíduos industriais, visto que os produtos principais do abacaxi são valiosos, e que ao contrário da papaína, a bromelina não desaparece quando o fruto amadurece (BALLS, THOMPSON, KIES, 1941).

O presente trabalho encontra-se dividido em capítulos, sendo que cada etapa do trabalho consiste em uma técnica distinta; trazendo, assim, maior compreensão ao leitor.

JUSTIFICATIVA

A área plantada de abacaxi no Brasil, para a safra de 2013, segundo o IBGE, é de 61349 hectares, com rendimento médio de 26520 frutos/hectare. Do abacaxizeiro, apenas o fruto é comercializado, sendo as cascas, talos, coroa e folhas considerados resíduos pelas indústrias de sucos e conservas. Estes resíduos constituem fontes importantes de bromelina, enzima que vem despertando expressiva atenção científica, devido suas ações anti-inflamatórias, anti-agregação plaquetária, anticancerígeno e antimetástase.

Reconhecendo a qualidade destes resíduos como fonte de bromelina e os baixos custos de sua aquisição, torna-se vantajoso estudar novos métodos de extração da bromelina a partir destes resíduos. Além disso, o aproveitamento dos resíduos das indústrias alimentícias é de suma importância para a diminuição do impacto que estes resíduos causam no meio ambiente.

A extração por sistema de duas fases aquosas é uma técnica que viabiliza a obtenção da bromelina de maneira rápida e fácil, não utiliza solventes orgânicos, empregando polímeros e tendo em média 70% de água, causando menos danos ao meio ambiente comparado aos sistemas de extração com solventes orgânicos.

Os hidrogéis exibem muitas propriedades funcionais que têm sido propostas para aplicações biomédicas e farmacêuticas. Entre essas aplicações, o hidrogel como sistema carreador de medicamentos (*drug delivery*) são objeto de maior interesse nas pesquisas científicas. Tem sido demonstrado que os hidrogéis são excelentes candidatos para encapsulação de biomoléculas, como peptídeos e proteínas, podendo fornecer um sistema de liberação controlada e sustentável para medicamentos.

Portanto, estudos que objetivam extrair a bromelina a partir de resíduos de abacaxi das indústrias alimentícias, com utilização de métodos não convencionais, como o sistema de duas fases aquosas a base de PEG/PAA, e posterior aplicação da fase que contém a bromelina diretamente no hidrogéis obtido em paralelo, são altamente promissores do ponto de vista científico e tecnológico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Extração de bromelina dos resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) por sistemas de duas fases aquosas e sua aplicação em hidrogel polimérico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da estabilidade da bromelina comercial frente à variação de pH, de temperatura e concentração dos polímeros polietileno glicol e ácido poliacrílico, com análise termodinâmica;
- Determinação das curvas binodais do sistema PEG/PAA em diferentes massas molares dos polímeros;
- Extração da bromelina por sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/PAA;
- Preparo e otimização das condições de formação do hidrogel;
- Caracterização físico-química do hidrogel produzido;
- Estudo da absorção e liberação da bromelina pelo hidrogel produzido.

CAPITULO I

ESTABILIDADE DA BROMELINA

INTRODUÇÃO

A estabilidade térmica enzimas, em sua maioria, diminui com o aumento da temperatura. Em geral, acima de 65 °C, as atividades enzimáticas são severamente inibidas (XUE *et al.*, 2010).

A bromelina é notavelmente estável em relação ao calor, visto que na produção do suco de abacaxi ocorre um aquecimento a 60 °C e que posteriormente detecta-se uma grande proporção da enzima no estado nativo (BALLS, THOMPSON, KIES, 1941).

Winnick, Davis e Greenberg (WINNICK, DAVIS, GREENBERG, 1940) observaram que a taxa de inativação da bromelina segue uma reação de primeira ordem a 55 °C e em 60 °C, mas a altas temperaturas a destruição da enzima foi maior que a reação de primeira ordem.

A inativação térmica da bromelina segue uma reação de primeira ordem e a constante de inativação depende da temperatura e segue a equação de Arrhenius. A energia de ativação encontrada no estudo de Sriwatanapongse, Balaban e Teixeira foi $3,26 \times 10^5$ J/mol (SRIWATANAPONGSE, BALABAN, TEIXEIRA, 2000).

O processo da desnaturação térmica da bromelina, estudada por dicroísmo circular (CD) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), é completamente irreversível e aparentemente segue um mecanismo simples de dois estágios do tipo $N \rightarrow D$ (naturado $\rightarrow$ desnaturado) (AHMAD *et al.*, 2006).

A forma glicosilada da bromelina mostra atividade máxima a 30 °C em pH 7, diminuindo 17% na faixa de temperatura de 40 a 60 °C (KHAN, RASHEEDI, HAQ,

2003). Sob temperaturas elevadas a atividade enzimática decresce rapidamente. A forma deglicosilada é mais sensível a mudanças de pH, tanto na faixa ácida quanto na básica. No estudo de Khan, Rasheedi e Hag (2003), não foram detectadas diferenças de atividade entre a forma glicosilada e a deglicosilada (KHAN, RASHEEDI, HAQ, 2003).

Pouco mais da metade da atividade proteolítica original permaneceu após 30 minutos de incubação a 60 °C, no estudo de Hale e colaboradores (HALE *et al.*, 2005). A atividade variou de 9 a 22% do original após 15 minutos a 70 °C. A atividade proteolítica foi perdida quando as soluções de bromelina foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos. Dados obtidos a partir de géis de eletroforese mostraram que o aquecimento a 70 °C ou superior resultou em degradação total da bromelina, sendo confirmado por *Western-blotting* (HALE *et al.*, 2005).

Em pH abaixo de 0,8, a proteína é encontrada em agregados. Segundo o estudo de Ahmad e Kahn (AHMAD, KHAN, 2006), a bromelina do talo existe em um estado desnaturado ácido a pH 2,0, em que perde cerca de 80% da estrutura nativa secundária e totalmente a estrutura terciária. Porém a pH 0,8 a bromelina exibe características de *molten globule*, ou seja, nativa estrutura secundária, aumento da habilidade de se ligar a tintas hidrofóbicas como o ácido 8-anilino-1-sulfônico (ANS), e ausência de contato terciário específico. A desnaturação é um processo irreversível para todas as transições estudadas. Neste estudo a bromelina do talo adquire estado *molten globule* a pH 0,8 do estado nativo através de um estado desnaturado ocorrendo a pH 2,0. A estrutura desnaturada pode ser diferente dependendo dos estados modificadores, mas não são notadas diferenças significativas na estabilidade da estrutura dos estados *molten globule*. Portanto estas observações nos levam a acreditar que o estado *molten globule* é essencial intermediário na desnaturação da bromelina (AHMAD, KHAN, 2006).

De acordo com os dados obtidos por Silveira *et al.*, 2009, a atividade relativa da bromelina aumentou com o aumento do pH, até atingir um máximo a pH 7,0, após esse valor, a atividade apresentou uma pequena diminuição. A enzima foi estável nos valores de pH estudados (de 4,0 a 8,0), apesar de entre pH 4,0 e 5,0 ter havido menor perda da atividade relativa durante o estudo, tal comportamento pode ser

justificado pela similaridade entre estes valores e aqueles encontrados na fruta do abacaxi *in natura*: pH 3,6 (SILVEIRA *et al.*, 2009). Neste mesmo estudo, a enzima mostrou-se estável após 150 minutos em todas as temperaturas estudadas, exceto a 55 °C. Foi observado que a bromelina mostrou um máximo de atividade em pH neutro, a 45 °C, em que reteve mais de 75% de sua atividade inicial (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Em um estudo recente (ANWAR, AHMAD, YOUNUS, 2007), todas as preparações perderam gradualmente suas atividades após 3 h de incubação a 60 °C. A atividade remanescente após a incubação a 60 °C por 3 h foi 18% para a bromelina não modificada, e 32% para a preparação *cross linked* com glutaraldeído. Portanto, a preparação *cross linked* foi mais termicamente estável.

No estudo de Godoi (GODOI, 2007) concluiu-se que preparações de solução de bromelina com pH mais próximo de 4, apresentaram-se mais estáveis tanto em relação ao tempo de armazenamento quanto à temperatura de exposição. Quanto mais próximo do pH 8, mais susceptível à desnaturação ficou a bromelina, ou seja, menor a sua estabilidade enzimática. Temperaturas altas, acima de 45 °C desnaturam rapidamente a bromelina em solução a pH 8, anulando toda a sua atividade enzimática, já quando em pH 4 mais de 50% da atividade catalítica é mantida quando a solução da enzima é exposta à temperatura de 55 °C (GODOI, 2007).

Segundo Fatima e Khan (FATIMA, KHAN, 2007), a ordem de atividade de bromelina em diferentes soluções foi: bromelina (pH 4,5) > bromelina + 10% (m/v) PEG 400 g/mol > bromelina + 10% (m/v) PEG 6000 g/mol > bromelina + 10% (m/v) PEG 20000 g/mol, na faixa de temperatura de 30 a 70 °C. A conclusão geral é que as três massas de PEG utilizadas levam à desestabilização da bromelina.

Fatima e Khan (FATIMA, KHAN, 2007) propõem que PEG ligam-se aos sítios hidrofóbicos das tiol proteases (papaína, bromelina e quimopapaína) e, por conseguinte levam a sua desestabilização. Porém, a extensão da desestabilização por diferentes massas molares de PEG é diferente para as 3 proteases estudadas. Efeitos desestabilizantes do PEG sugerem que se deve ter cuidado quando utilizar PEG

mesmo à temperatura ambiente, para *salting-out*, para cristalização, ou para aplicações industriais, para tiol proteases e para proteínas hidrofóbicas em geral.

OBJETIVOS

Avaliar a estabilidade da bromelina comercial frente à variação de pH, temperatura e concentração dos polímeros polietileno glicol e ácido poliacrílico, com análise termodinâmica.

MATERIAIS E MÉTODOS

SOLUÇÃO PADRÃO DE BROMELINA

Como solução padrão de bromelina foi utilizado a bromelina da Sigma® (bromelina do talo do abacaxi). Para solução de 3 mg/mL de bromelina padrão, a bromelina foi diluída em tampão *McIlvaine*, sendo em seguida centrifugada a 13.000 *g* por 10 minutos (Jouan, BR4i).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA BROMELINA

A determinação da atividade da bromelina foi realizada pelo método de KUNITZ (KUNITZ, 1947) e WALTER (WALTER, 1986) modificado, usando 2% (m/v) caseína como substrato e a tirosina como padrão. Resumidamente o método consiste na clivagem da caseína pela bromelina por 10 min. a 37 °C, pH 7,5, sendo adicionado em seguida ácido tricloroacético. A clivagem da caseína libera resíduos de tirosina, que são detectados por espectroscopia (absorbância a 280 nm, SpectraMax Plus 384).

A curva padrão de tirosina obtida foi a seguinte:

FIGURA 6: Curva padrão de tirosina obtida em leitor de microplaca.

As barras de erro referem-se ao desvio padrão encontrado.

ESTUDO DA ESTABILIDADE DA BROMELINA EM DIFERENTES VALORES DE pH, TEMPERATURAS E POLÍMEROS, COM ANÁLISE TERMODINÂMICA

Foram realizados estudos de estabilidade da bromelina, comercial, em tampão Mcllvaine, composto por fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico, nos pHs 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; e 8,0 em diferentes temperaturas (20, 30, 40 e 50 °C). Também foram realizados estudos de estabilidade em diferentes massas molares do polietileno glicol (2000, 4000 e 6000 g/mol), e em ácido poliacrílico (8000 g/mol); em diferentes concentrações: 5, 10 e 15% (m/m).

Em todos os ensaios de estabilidade foram preparadas soluções contendo 3 mg/mL de bromelina padrão e tampão nas condições desejadas em tubos de ensaio. As soluções foram posteriormente mantidas em banho termorregulável (Nova Ética, 521-2D) nas temperaturas desejadas durante 7 horas. Foram retiradas alíquotas nos intervalos 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0 e 7,0 horas para a análise da atividade e avaliação de estabilidade. A atividade de bromelina remanescente foi determinada conforme descrito anteriormente (DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA BROMELINA).

METODOLOGIA DA ANÁLISE TERMODINÂMICA

A energia de ativação da desnaturação da bromelina foi calculada segundo a equação de Arrhenius (Equação 1):

$$k_{obs} = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (\text{Equação 1})$$

em que k_{obs} (s^{-1}): constante condicional; A (s^{-1}): fator pré-exponencial; E_a ($kJ\ mol^{-1}$): energia de ativação; R : constante universal dos gases; e T (K): temperatura absoluta.

Colocando em gráfico os valores de $\ln(k_{obs})$ *versus* T^{-1} , obtemos uma curva na qual a inclinação é igual a $-E_a/R$, conforme apresentado na Figura 7.

FIGURA 7: Gráfico de $\ln(k_{obs})$ em função do inverso da temperatura (empregado para o cálculo da energia de ativação).

A entalpia e entropia foram determinadas usando a equação de Eyring (Equação 2) e colocando-se em gráfico $\ln(k_{obs}/T)$ contra T^{-1} , conforme apresentado pela Figura 8.

$$k_{obs} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta H + T\Delta S}{RT}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

em que k_B e h são as constantes de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}$ J/K) e Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s), respectivamente.

FIGURA 8: Gráfico de $\ln(k/T)$ em função do inverso da temperatura (empregado para o cálculo de entropia e entalpia).

A entalpia, ΔH , foi calculada a partir da inclinação da curva, representada pela Figura 8, e a entropia, ΔS , foi calculada por extrapolação no eixo das ordenadas, segundo a Equação 3.

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_b}{h}\right) + \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (\text{Equação 3})$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTABILIDADE DA BROMELINA PADRÃO FRENTE A DIFERENTES VALORES DE pH E TEMPERATURA

A bromelina padrão foi avaliada em diferentes valores de pH, de 2,0 a 8,0, nas temperaturas de 20, 30, 40 e 50 °C. Em pH 2,0, na temperatura de 20 °C, observou-se a maior estabilidade comparada com as outras temperaturas estudadas, neste mesmo pH. A 20 °C, após 7 h, a bromelina perdeu somente 4% de sua atividade inicial relativa; a 30 °C perdeu 71%, enquanto que a 40 e 50 °C perdeu toda sua atividade inicial, após 7 h (Figura 9).

Segundo o estudo de Ahmad e Khan (AHMAD, KHAN, 2006), a bromelina do talo existe em um estado desnaturado ácido a pH 2,0, a 25 °C, condição em que perde cerca de 80% da estrutura nativa secundária e totalmente da estrutura terciária. Porém no presente estudo, atividade de bromelina foi detectada em todos os pontos de amostragem a 20 e 30 °C.

FIGURA 9: Estabilidade relativa da bromelina em pH 2,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Em pH 3,0, a maior estabilidade foi obtida na temperatura de 20 °C, a bromelina manteve 65% de sua atividade inicial, após 7 h. Na temperatura de 30 °C, após 7 h, a atividade relativa remanescente foi 32%, em 40 °C, 48% e a 50 °C, 6% (Figura 10).

FIGURA 10: Estabilidade relativa da bromelina em pH 3,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Em pH 4,0, observou-se a maior estabilidade na temperatura de 40 °C, a bromelina apenas perdeu 11% de sua atividade inicial, após 7 h. Nas temperaturas de 20, 30 e 50 °C, a perda de atividade foi, respectivamente: 25%, 24% e 50%, após 7 h (Figura 11).

No estudo de Godoi (GODOI, 2007), em pH 4 a bromelina apresentou queda de 59% de sua atividade proteolítica após 25 dias de armazenamento a 2 °C. A 35 °C, a bromelina em pH 4 perde apenas 14% de sua atividade e quando submetida à temperatura de 55 °C perde 37% de sua atividade.

FIGURA 11: Estabilidade relativa da bromelina em pH 4,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

No estudo da estabilidade da bromelina comercial em pH 5,0, apresentado na Figura 12, obteve-se o melhor resultado na temperatura de 40 °C. Nesta temperatura, a bromelina comercial manteve 99% de sua atividade inicial relativa, enquanto que a 30 °C reduziu para 84%. Nas temperaturas de 20 °C e 50 °C, a bromelina perdeu 25% e 22% de sua atividade inicial relativa, respectivamente.

Para pH 5,0 a queda na atividade proteolítica após 25 dias de armazenamento a 2 °C foi de 68%, no estudo de Godoi (2007). Isto pode ter ocorrido devido à autodigestão da protease, devido ao longo período de estudo.

FIGURA 12: Estabilidade relativa da bromelina em pH 5,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Em pH 6,0, observou-se a maior estabilidade nas temperaturas de 20 e 30 °C. Nessas temperaturas, a bromelina perdeu 34% e 41% de sua atividade inicial relativa, após 7 h, enquanto que nas temperaturas de 40 e 50 °C, a perda foi respectivamente de 43% e 58%, após 7 h (Figura 13).

No estudo de Godoi (GODOI, 2007), a queda na atividade proteolítica após 25 dias de armazenamento a 2 °C na amostra de bromelina em pH 6 foi de 63%. Novamente este fato pode ter ocorrido devido à autodigestão da protease, devido ao longo período de estudo.

FIGURA 13: Estabilidade relativa da bromelina em pH 6,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Já em pH 7,0, a maior estabilidade obtida foi na temperatura de 20 °C, em que a bromelina manteve 72%, de sua atividade inicial relativa, após 7 h de estudo. Nas outras temperaturas estudadas, obteve-se, 69%, 47% e 15%, de atividade relativa da bromelina comercial, a 30, 40 e 50 °C, respectivamente, após 7 h de estudo (Figura 14).

De acordo com os dados obtidos por Silveira (SILVEIRA, 2007) a atividade relativa da bromelina, a 25 °C, aumentou com o aumento do pH, até atingir um máximo a pH 7,0. Isto ocorre, provavelmente, devido às cargas e ao sítio de atividade tornar-se mais aberto, e mais similar ao estado de transição de reação. Xue e colaboradores (XUE *et al.*, 2010), demonstraram que para a determinação de atividade proteolítica da bromelina o melhor pH encontra-se em 7,0. Deve-se, porém, ressaltar que o melhor pH para detecção da atividade proteolítica não indica o pH onde a enzima se encontraria em estado de maior estabilidade.

No estudo de Godoi (2007), em pH 7, a queda na atividade proteolítica após 25 dias de armazenamento em geladeira foi 71%. Novamente este fato deve-se a autodigestão da protease, devido ao longo período de estudo; e também pelo fato de

que quanto mais próximo do pH 8, a bromelina torna-se mais susceptível à desnaturação, ou seja, menor a sua estabilidade enzimática.

No estudo de Khan, Rasheedi e Haq (KHAN, RASHEEDI, HAQ, 2003), a forma glicosilada da bromelina em pH 7,0 mostra atividade máxima a 30 °C, diminuindo 17% na faixa de temperatura de 40 a 60 °C. A enzima glicosilada mostra perfil similar de atividade térmica a pH 7 e 9, com temperatura ótima ao redor de 40 °C, porém a pH 3, a temperatura ótima diminui.

FIGURA 14: Estabilidade relativa da bromelina em pH 7,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Em pH 8,0, apresentado na Figura 15, obteve-se a maior estabilidade da bromelina comercial na temperatura de 20 °C. Nesta temperatura, a bromelina comercial manteve 80%, de sua atividade inicial relativa, enquanto que após 7 h, nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, os valores obtidos foram de 46%, 24% e 6%, respectivamente.

No estudo de Godoi (2007), a atividade inicial da bromelina em pH 4 é maior que em pH 8 e a queda de atividade proteolítica com o tempo é maior em pH 8 que em pH 4. Em pH 4 a bromelina apresentou queda total de 59% de sua atividade proteolítica

após 25 dias de armazenamento a 2 °C, enquanto que em pH 8 a queda de atividade enzimática nestas mesmas condições foi de 80%. A 35 °C, a bromelina quando estocada em pH 8, perde 34% da atividade proteolítica. Quando submetida à temperatura de 55 °C, a bromelina em pH 8 praticamente perde toda sua atividade enzimática. Quanto mais próximo do pH 8, a bromelina ficou mais susceptível à desnaturação, ou seja, menor a sua estabilidade enzimática (GODOI, 2007).

FIGURA 15: Estabilidade relativa da bromelina em pH 8,0 a diferentes temperaturas. As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Analisando todos os pHs estudados, podemos observar que a 20 °C, a bromelina comercial manteve-se mais estável em pH 2,0, com 95% de atividade relativa, seguido do pH 8,0, com 80%, após 7 h. Os outros pHs estudados mantiveram a atividade relativa entre 65% e 75%, após 7 h de estudo.

Na temperatura de 30 °C, a bromelina manteve-se mais estável em pH 5,0, com 84% de atividade relativa, seguido do pH 4,0, onde obteve-se 75% de atividade relativa, após 7 horas. Em pH 5,0 os valores obtidos em todas as amostragens foram superiores ao obtido em pH 4,0.

Após 7 h de estudo, a 40 °C, a bromelina comercial apresentou-se mais estável em pH 5,0, com 99% de atividade relativa. Em pH 4,0, obteve-se 89% da atividade relativa, após 7 h, e em pH 6,0 obteve-se 57%.

Em 50 °C, o pH 5,0, forneceu a melhor estabilidade da bromelina comercial, com 78% de atividade relativa, após 7 h. Em pH 4,0 e 6,0 obteve-se os seguintes valores de atividade relativa: 50% e 42%, após 7 h de estudo. Nesta temperatura, também se obteve o mesmo comportamento obtido em 30 °C: em pH 5 os valores obtidos em todas as amostragens foram superiores aos obtidos nos outros pH estudados.

TABELA 3: Valores de energia de ativação (E_a), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para os diferentes pHs estudados.

pH	E_a (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K mol)
2,0	138,85	136,33	117,62
3,0	64,43	61,88	-135,30
4,0	8,67	6,11	-326,20
5,0	5,20	2,65	-333,09
6,0	123,60	120,99	44,75
7,0	62,13	59,57	-140,32
8,0	62,13	59,57	-140,32

O maior valor de energia de ativação foi encontrado em pH 2,0 (138,85 kJ/mol), enquanto o menor valor foi encontrado em pH 5,0; 5,2 kJ/mol, sendo o mesmo observado para os valores de entalpia (ΔH): maior em pH 2,0 (136,33 kJ/mol) e menor em pH 5,0 (2,65 kJ/mol). Quanto menores as energias de ativação, mais estável encontra-se a bromelina. Já para os valores de entropia (ΔS), temos o maior valor em pH 2,0, com 117,62 J/K.mol, e o menor em pH 5,0, com -333,09 J/K.mol.

Estabilidade térmica de enzimas é muitas vezes acompanhada por uma diminuição na entropia (ΔS) e um aumento na energia livre de Gibbs (ΔG). Portanto, um

aumento na entropia (ΔS), indica que há um aumento do número de proteínas no estado de transição ativado (XUE *et al.*, 2010).

Segundo Hale e colaboradores (HALE *et al.*, 2005), pouco mais da metade da atividade proteolítica original permaneceu após 30 minutos de incubação a 60 °C. A atividade variou de 9 a 22% do original após 15 minutos a 70 °C. A atividade proteolítica foi perdida quando as soluções de bromelina foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos. Dados obtidos a partir de géis de eletroforese mostraram que o aquecimento a 70 °C ou superior resultou em degradação total da bromelina, sendo confirmado por *Western-blotting* (HALE *et al.*, 2005).

A enzima foi estável a todos os valores de pH (pH 4,0 a 8,0) estudados por Silveira (2007), apesar de nos valores de pH menores (entre 4,0 e 5,0) houve menor decréscimo da atividade relativa durante o período de estudo. Este fato se deve a estes valores de pH serem próximos ao pH encontrado na fruta do abacaxi *in natura*, pH 3,6. Neste mesmo estudo também foi observado que a bromelina mostrou máximo de atividade a pH neutro, 45 °C, em que reteve mais de 75% de sua atividade inicial (SILVEIRA, 2007).

A desnaturação térmica da bromelina é completamente irreversível e aparentemente segue um mecanismo simples de dois estados. Segundo Anwar, Ahmad & Younus (ANWAR, AHMAD, YOUNUS, 2007), a bromelina gradualmente perdeu sua atividade após 3 h de incubação a 60 °C, pH 7,0, com atividade remanescente após este período de 18%. Isso significa que, aumentando a temperatura de 50 °C para 60 °C, bromelina perde 1,6 vezes sua atividade; uma vez que no presente estudo, a 50 °C, pH 7,0, após 3 h de incubação, a atividade remanescente era cerca de 29%.

Bhattacharya & Bhattacharyya (BHATTACHARYA, BHATTACHARYYA, 2009) observaram que após o armazenamento a 30 e 4 °C por 30 e 60 dias, respectivamente, 22±2% e 44±2% da atividade enzimática foi mantida. A taxa de inativação enzimática foi 3,3 vezes mais lenta a 4 °C quando comparada com a temperatura de 30 °C.

Apesar de a exposição a altas temperaturas ser um fator de desnaturação para uma variedade grande de enzimas, no caso da bromelina foi possível verificar que a exposição a valores de pH mais altos potencializa o efeito da temperatura (GODOI, 2007).

Godoi (2007) concluiu que preparações de solução de bromelina em pH mais próximo de 4, apresentaram-se mais estáveis tanto em relação ao tempo de armazenamento quanto à temperatura de exposição. Também observou que, quanto mais próximo do pH 8, mais susceptível ficou a bromelina à desnaturação, ou seja, menor a sua estabilidade enzimática.

ESTABILIDADE DA BROMELINA PADRÃO FRENTE A DIFERENTES MASSAS MOLARES E CONCENTRAÇÃO DE POLIETILENO GLICOL E TEMPERATURA

A bromelina padrão foi avaliada em diferentes massas molares de polietileno glicol (PEG), nas concentrações de 5, 10 e 15%, nas temperaturas de 20, 30, 40 e 50 °C.

PEG é um polímero hidrofílico, não iônico e não tóxico, utilizado em várias aplicações bioquímicas e industriais, como cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos.

PEG também é utilizado em extrações líquido-líquido e precipitações de biomoléculas para cristalografia de proteínas. Devido ao extensivo uso prático do PEG é de importância fundamental saber de sua influência na estabilidade de proteínas.

Neste estudo, a 20 °C (Figuras 16 a 18), a bromelina manteve-se estável, em todas as concentrações estudadas de PEG 4000 g/mol nas 7 h avaliadas, mantendo a atividade relativa em 100%. Em PEG 6000 g/mol, observamos um pequeno declínio da atividade relativa da bromelina em relação ao tempo estudado, obtendo valores de 99; 98 e 84%, após 7 h, em 5, 10 e 15%, respectivamente. Já em PEG 2000 g/mol, a atividade relativa da bromelina sofreu um maior declínio, chegando aos seguintes valores após 7 h de estudo: 68; 51 e 65%, em 5, 10 e 15%, respectivamente.

FIGURA 16: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em PEG 2000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 17: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em PEG 4000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 18: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em PEG 6000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Já em 30 °C, a bromelina manteve-se estável em 10% PEG 4000 g/mol e em 5% PEG 6000 g/mol, durante as 7 h estudadas. Em 5% PEG 4000 g/mol, ao final das 7 h, a bromelina perdeu apenas 7% de sua atividade relativa, enquanto que para 15% esse valor foi de 29% (Figura 20). Em 10% e 15% PEG 6000 g/mol, a bromelina perdeu 13% e 22% respectivamente, de sua atividade relativa após 7 h (Figura 21). Na presença de PEG 2000 g/mol, obteve-se o menor valores de atividade relativa de bromelina nesta temperatura, em 10%, com 57% de atividade residual relativa (Figura 19).

FIGURA 19: Estabilidade relativa da bromelina a 30 °C, em PEG 2000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 20: Estabilidade relativa da bromelina a 30 °C, em PEG 4000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 21: Estabilidade relativa da bromelina a 30 °C, em PEG 6000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Os dados obtidos em 40 °C mostram comportamento inverso ao obtido em 20 e 30 °C na presença de todas as concentrações de PEG 2000 g/mol estudadas: obteve-se a melhor estabilidade da bromelina, com valores de atividade relativa em 100% durante as 7 h do estudo (Figura 22). Em PEG 4000 g/mol, a perda da atividade relativa de bromelina, após 7 h foi de 6 a 24% (5 e 15%), apresentado na Figura 23. Já em PEG 6000 g/mol, a perda foi de 21 a 62% (5 e 15%) (Figura 24).

FIGURA 22: Estabilidade relativa da bromelina a 40°C, em PEG 2000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 23: Estabilidade relativa da bromelina a 40°C, em PEG 4000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 24: Estabilidade relativa da bromelina a 40° C, em PEG 6000 g/mol, a diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Já em 50 °C, somente 5% de PEG 2000 g/mol favoreceu a manutenção da atividade relativa da bromelina, nas 7 h estudadas (Figura 25). Para as outras concentrações, houve uma perda de 6 e 29% da atividade (10 e 15% respectivamente). Nas outras massas molares estudadas, a perda da atividade relativa da bromelina foi maior, chegando até 86% (valor obtido em 15% PEG 6000 g/mol), conforme apresentado nas Figuras 26 e 27.

FIGURA 25: Estabilidade relativa da bromelina a 50 °C, em PEG 2000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 26: Estabilidade relativa da bromelina a 50°C, em PEG 4000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 27: Estabilidade relativa da bromelina a 50°C, em PEG 6000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

TABELA 4: Valores de energia de ativação (EA), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para as diferentes concentrações e massa molares de PEG estudadas.

	% (m/m)	Ea (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K mol)
PEG 2000 g/mol	5	-110,58	-113,06	-727,71
	10	-82,35	-84,91	-619,16
	15	-10,62	-13,17	-379,65
PEG 4000 g/mol	5	41,16	38,56	-221,13
	10	88,88	86,23	-68,98
	15	76,01	54,26	-162,18
PEG 6000 g/mol	5	53,91	53,91	-181,62
	10	47,16	44,60	-198,73
	15	61,24	6,31	-144,32

O maior valor de energia de ativação foi encontrado em 10% PEG 4000 g/mol (88,88 kJ/mol), enquanto o menor valor foi encontrado em 5% PEG 2000 g/mol, -110,58

kJ/mol, conforme apresentado na Tabela 4. Quanto menores as energias de ativação, mais estável encontra-se a bromelina.

Para os valores de entalpia (ΔH), foi observado o maior em 10% PEG 4000 g/mol (86,23 kJ/mol) e o menor em 5% PEG 2000 g/mol (-113,06 kJ/mol). Já para os valores de entropia (ΔS), temos o maior valor em 10% PEG 4000 g/mol, com -68,98 J/K.mol, e o menor em 5% PEG 2000 g/mol, com -727,71 J/K.mol.

Interação preferencial é uma medida termodinâmica de como o soluto e solvente redistribuem ao redor de uma proteína em solução. Se água é mais abundante perto da superfície relativa à sua composição total, existe uma hidratação preferencial da proteína. Se for esta a situação, conclui-se que se a água encontra-se mais abundantemente perto da superfície, então o soluto ficará em déficit, de modo que a hidratação preferencial é também uma exclusão preferencial do soluto. Exclusão do PEG da superfície da proteína é bastante grande, e até excede o nível de exclusão alcançada por estabilizantes conhecidos. Porém, PEG é um desestabilizante proteico fraco, e tem sido reportado com diminuidor da temperatura de fusão de proteínas (FATIMA, KHAN, 2007).

Os resultados de Fatima e Khan (FATIMA, KHAN, 2007) indicam que PEG (400, 6000 e 20000 g/mol) levam a desestabilização de tiol proteases, como a bromelina. No presente estudo, PEG 6000 g/mol também não promoveu a estabilidade da bromelina.

É possível explicar este efeito baseado na proposta que PEG de alta massa molar assumem estruturas compactas estabilizadas por interações hidrofóbicas intramoleculares, portanto tendo baixa interação PEG solvente que os não compactados. Portanto, diminuições na exclusão preferencial do PEG (6000 e 20000 g/mol) podem levar ao aumento da interação do PEG com a superfície proteica.

PEG de baixa massa molar (400 g/mol) pode mostrar interação preferencial com proteínas deslocando o equilíbrio natural-desnaturado para a forma desnaturada, que é manifestada como perda significativa na estrutura secundária e diminuição do ponto de fusão de uma proteína. Portanto a desestabilização de proteínas por PEG pode ser explicada por duas maneiras: devido a pequenas moléculas, PEG de baixa

massa molar mostram interação positiva com o estado desnaturado da proteína, enquanto PEG de alta massa molar adquirem uma forma compacta que permite a interação com a proteína (FATIMA, KHAN, 2007).

Ahmad e colaboradores (AHMAD *et al.*, 2006) investigaram o efeito de diferentes massas molares de PEG na estrutura da bromelina em pH 2,0, onde exibe uma completa perda das α -hélices, comparada com o estado nativo em pH 7,0. Os autores concluíram que PEG 6000 e 20000 g/mol, que geralmente estabilizam proteínas pelo mecanismo de hidratação preferencial, tiveram um efeito desestabilizante na bromelina desnaturada por ácido (AHMAD *et al.*, 2006).

O aumento da estabilidade das proteínas por PEG e outros polímeros neutros tem sido atribuído à exclusão estérica do polímero da vizinhança da proteína, promovendo uma hidratação preferencial da proteína, apesar do PEG poder interagir e, possivelmente, ligar com os resíduos não polares da superfície da proteína (AZEVEDO *et al.*, 2004; HANCOCK, HSU, 1996).

Apesar da habilidade do PEG de diminuir a polaridade de um solvente, estabilizando o estado desnaturado de uma proteína, também é esperado que o PEG pudesse favorecer o estado compacto, nativo da proteína devido ao grande volume de exclusão do estado desnaturado (ZIELENKIEWICZ *et al.*, 2006). Moléculas de PEG de baixa massa molar são excluídas da superfície da proteína, estabilizando a conformação nativa desta por um fenômeno de hidratação, enquanto moléculas de PEG de alta massa molar interagem com os muitos sítios hidrofóbicos das proteínas, levando assim a estabilização do estado desnaturado da proteína (NOEL, COMBES, 2003).

ESTABILIDADE DA BROMELINA PADRÃO FRENTE A DIFERENTES

CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO POLIACRÍLICO E TEMPERATURA

A bromelina padrão foi avaliada em diferentes concentrações de ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, 5, 10 e 15% (m/m), nas temperaturas de 20, 30, 40 e 50 °C.

Na temperatura de 20 °C, a bromelina manteve sua atividade relativa próxima a 100% na presença de 10% de PAA 8000 g/mol, nas outras concentrações estudadas, a atividade relativa diminui 12 e 24% para 5 e 15% de PAA 8000 g/mol, respectivamente (Figura 28).

FIGURA 28: Estabilidade relativa da bromelina a 20°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Em 30 °C (Figura 29), a atividade relativa da bromelina manteve-se 100% até 1,5 h, em 10% PAA 8000 g/mol, decaindo para 87% ao final das 7 h de estudo. Nas outras concentrações estudadas, a atividade relativa foi decaindo conforme o tempo, resultando nos valores finais de 81% para 5%, e de 77% para 15% PAA 8000 g/mol, após 7 h.

FIGURA 29: Estabilidade relativa da bromelina a 30°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Na temperatura de 40 °C, as três concentrações estudadas tiveram comportamento semelhante entre si, e após 7 h de estudo, a atividade relativa resultante foi de 54; 44 e 46% em 5, 10 e 15% de PAA 8000 g/mol, respectivamente (Figura 30).

FIGURA 30: Estabilidade relativa da bromelina a 40°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

Em 50 °C, novamente observamos que as diferentes concentrações de PAA resultaram em um efeito similar na atividade relativa da bromelina, conforme observado em 40 °C. Após 7 h de estudo, a atividade relativa da bromelina foi abaixo de 20%, sendo a menor observada em presença de 10% PAA 8000 g/mol, 13% (Figura 31).

FIGURA 31: Estabilidade relativa da bromelina a 50°C, em ácido poliacrílico (PAA) 8000 g/mol, em diferentes concentrações (% m/m). As barras de erros referem-se ao desvio padrão encontrado.

TABELA 5: Valores de energia de ativação (E_a), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para as diferentes concentrações de PAA estudadas.

	% (m/m)	E_a (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K mol)
PAA 8000 g/mol	5	61,15	58,60	-145,58
	10	52,64	50,09	-169,49
	15	61,43	58,87	-143,24

O maior valor de energia de ativação foi encontrado em 15% PAA 8000 g/mol (61,43 kJ/mol), enquanto o menor valor foi encontrado em 10%, 52,64 kJ/mol, conforme apresentado na Tabela 5. Quanto menores as energias de ativação, mais estável encontra-se a bromelina.

Para os valores de entalpia (ΔH), foi observado o maior em 15% PAA 8000 g/mol (58,87 kJ/mol) e o menor em 10% (50,09 kJ/mol). Já para os valores de entropia (ΔS), temos o maior valor em 15% PAA 8000 g/mol, com -143,24 J/K mol, e o menor em 10%, com -169,49 J/K mol.

A presença de PAA não aumentou a estabilidade da bromelina, nas condições avaliadas. Aos 40 e 50 °C, a estabilidade foi reduzida, quando comparado com os resultados encontrados em apenas tampão.

Polímeros carregados estabilizam ou inativam proteínas dependendo do seu modo de interação. Visto que as proteínas são moléculas polianfólicas, elas podem interagir com polímeros ou polieletrólitos, via forças Coulombianas (OHTAKE, KITA, ARAKAWA, 2011). O efeito de polímeros carregados, como o PAA, sobre a estabilidade de proteínas é preferencialmente proteico-específico. Provavelmente, as forças eletrostáticas e hidrofóbicas são mais intensas nas temperaturas estudadas, desfavorecendo a manutenção da atividade da bromelina.

CONCLUSÃO PARCIAL

A partir dos dados obtidos, a bromelina comercial apresentou maior estabilidade em pH 5,0, em todas as temperaturas estudadas, pois apresentou menor decréscimo da atividade relativa. Também pode concluir-se que a temperatura em que a bromelina é mais estável, dentre os valores estudados, é 20 °C, apresentando os maiores valores de atividade relativa.

No estudo da estabilidade frente a diferentes massas molares e concentrações de PEG, temos que a condição que proporcionou a melhor manutenção da atividade relativa da bromelina foi 5% PEG 2000 g/mol, e a que menos favoreceu foi a 10% PEG 4000 g/mol.

No estudo da estabilidade da bromelina em diferentes concentrações de PAA 8000 g/mol, os melhores resultados foram obtidos com 10% deste polímero, o que forneceu as melhores condições para a manutenção da atividade da bromelina.

CAPITULO II

SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Separação de fases em soluções contendo uma mistura de polímeros é um fenômeno comum. Pares de polímeros hidrofílicos são incompatíveis em soluções aquosas, levando à coexistência de duas fases em equilíbrio entre si, com cada uma das fases contendo predominantemente água e um dos polímeros (HATTI-KAUL, 2000).

A separação de fases de uma mistura de polímeros é atribuída à alta massa molar dos polímeros combinado com a interação entre os segmentos dos polímeros. Devido às interações aumentarem com o aumento das moléculas, a separação de fases ocorre a baixas concentrações de polímero (HATTI-KAUL, 2000).

O comportamento das fases de soluções aquosas de polímeros é também influenciado pela presença de sais, o efeito dependente tanto do tipo quanto da concentração do sal. Frequentemente, concentração de sal alta suficiente em sistema com um único polímero pode induzir à separação de fase, o que resulta em uma fase rica em sal e pobre em polímero e outra pobre em sal e rica em polímero (HATTI-KAUL, 2000).

Sistemas de duas fases aquosas (SDFA) possuem vantagens frente à extração com solventes orgânicos, visto que as duas fases possuem grande quantidade de água e, portanto, os SDFA formam ambiente apropriado para biomateriais (HATTI-KAUL, 2000), sendo indicados para purificação de material biológico (de peptídeos a até mesmo organelas), visto que as fases contêm de 70 a 90% de água (JOHANSSON, 1998; RABELO, TAMBOURGI, PESSOA, 2004). Outras vantagens são: redução de volume, alta capacidade e tempo de processamento curto (RABELO, TAMBOURGI, PESSOA, 2004).

O potencial dos sistemas de polímero-polímero ou polímero-sal foi primeiramente observado pelo bioquímico sueco P. Å. Albertsson, para separação de células, partículas celulares e proteínas, há mais de 40 anos (HATTI-KAUL, 2000). Também é

possível fracionar, por estes sistemas, várias formas de microrganismos (JOHANSSON, 1998).

O valor de pH e a presença de eletrólitos no sistema possuem efeito pronunciado na partição de proteínas entre as duas fases. Sais comumente usados em procedimentos bioquímicos, como fosfatos, cloretos ou Tris-HCl podem influenciar na partição da biomolécula alvo.

Hoje os SDFA são estudados na separação e purificação de bioprodutos, incluindo células animais e vegetais, microrganismos, fungos e seus esporos, vírus, cloroplastos, mitocôndrias, vesículas de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (HATTI-KAUL, 2000). A base da separação em um sistema de duas fases é a distribuição seletiva das substâncias entre as duas fases. Esta distribuição é governada por parâmetros relacionados às propriedades das fases e à substância que se deseja separar (HATTI-KAUL, 2000).

A partição pode ser modulada por pH, concentração de sal e tipo, concentração e tamanho do polímero utilizado (JOHANSSON *et al.*, 2008a).

Os SDFA mais comuns baseados em polímero-polímero são aqueles formados por polietileno glicol (PEG) e dextrano. O uso industrial de sistemas PEG-dextrano é limitado devido ao alto custo do dextrano (100–200 \$/ kg) (SARAVANAN *et al.*, 2006).

O ácido poliacrílico (PAA), hidrofílico e de baixo custo (1-10 \$/kg), é um substituinte adequado para o dextrano na formação de SDFA com PEG para a separação de biomoléculas (SARAVANAN *et al.*, 2006). PEG é um polímero neutro enquanto que o PAA é carregado negativamente. Para a formação de SDFA entre o PEG e PAA, concentrações 1 a 10% de polímero e mínima concentração de sal são necessárias (JOHANSSON *et al.*, 2008a).

Os dois polímeros PEG e PAA são inócuos, relativamente de baixo custo e de fácil manejo. Ambos podem ser reciclados: PEG por *salting-out* e PAA por precipitação a pH abaixo de 3. A partição em sistemas de duas fases aquosas em PEG/PAA pode ser modulada pela adição de sal e mudança de pH (JOHANSSON *et al.*, 2008b).

Johansson e colaboradores, 2008a, obtiveram um bom sistema de extração para a proteína verde fluorescente (GFP) utilizando PEG 3000 g/mol e PAA 8000 g/mol, com uma recuperação total de 74%. A GFP manteve sua fluorescência, o que indicou que não houve mudanças conformacionais da proteína durante a separação das fases (JOHANSSON *et al.*, 2008). Em outro estudo, Johansson e colaboradores, (2008b) demonstraram que a partição da hemoglobina em SDFA de PEG/PAA pode ser modulada pela adição de sais e alterações de pH, obtendo maiores coeficientes de partição para a fase PEG em pH 7, com adição de NaCl, ou em pH superiores a 9, com a adição de Na₂SO₄. Também demonstraram que a lisozima particiona para a fase PEG, enquanto que a glicose-6-fosfato desidrogenase particiona para a fase PAA.

Babu, Rastogi e Raghavarao (2008) estudaram a extração e purificação da bromelina em sistemas PEG/sal, sendo o sistema PEG 1500 g/mol e fosfato de potássio, o que ofereceu a maior recuperação (228%) e pureza para a bromelina.

Já no estudo de Rabelo, Tambourgi e Pessoa (2004), a bromelina foi purificada através de SDFA contendo copolímeros PEO-PPO-PEO, e o melhor resultado obtido foi com recuperação de 79%, o fator de purificação em torno de 1,25 e coeficiente de partição atividade cerca de 1,4, com copolímero com 10% de óxido de etileno e de massa molar de 2000 g / mol, temperatura de 25 °C, concentração de copolímero de 5% (m/m), pH 6,0 e concentração de sal de 15 mM.

Coelho e colaboradores (2013), utilizaram um sistema de duas fases aquosas não tradicional em que a extração líquido-líquido é integrada ao processo de precipitação fracionada e obtiveram fator de purificação de 11,80 e recuperação da atividade de 66,4% usando 10,86% (m/m) PEG 4000 g/mol e 36,21% de saturação de sulfato de amônio.

OBJETIVOS

Extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi por sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/PAA.

MATERIAIS E MÉTODOS

SOLUÇÃO PADRÃO DE BROMELINA

Como solução padrão de bromelina foi utilizado a bromelina da Sigma® (bromelina do talo do abacaxi). Para solução de 3 mg/mL de bromelina padrão, a bromelina foi diluída em tampão McIlvaine pH 5,0. Após a solubilização, a solução foi centrifugada a 13.000 *g* por 10 minutos (Centrífuga Jouan, BR4i).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA BROMELINA

A determinação da atividade da bromelina foi realizada pelo método de KUNITZ (KUNITZ, 1947) e WALTER (WALTER, 1986) modificado, usando 2% (m/v) caseína como substrato e a tirosina como padrão. Resumidamente o método consiste na clivagem da caseína pela bromelina por 10 min. a 37°C, pH 7,5, sendo adicionado em seguida ácido tricloroacético. A clivagem da caseína libera resíduos de tirosina, que foram detectados por espectroscopia (absorbância a 280 nm, SpectraMax Plus 384).

A curva padrão de tirosina obtida foi a seguinte:

FIGURA 32: Curva padrão de tirosina obtida em leitor de microplaca. As barras de erro referem-se ao desvio padrão encontrado.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para a determinação de proteínas foi realizado o ensaio com ácido bicincônico (BCA). O ácido bicincônico foi misturado com sulfato de cobre 4% na proporção de 50:1 (Reagente BCA). Adicionou-se 25 µL de amostra em 200 µL do Reagente BCA (proporção Amostra: Reagente - 1:8) em microplaca de 96 poços. Em seguida foi feita a homogeneização e a microplaca foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Mediu-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 562 nm (SpectraMax Plus 384). A curva padrão foi realizada com albumina de soro bovino (BSA) (Figura 32).

FIGURA 33: Curva padrão de albumina.
As barras de erro referem-se ao desvio padrão encontrado.

PREPARO DA MATÉRIA PRIMA

Os resíduos de abacaxi, doados pela empresa Conge Frutas, fabricante de polpas, constitui-se de cascas do abacaxi. Estas cascas foram cortadas em pequenos pedaços e processadas em liquidificador. Em seguida, o extrato obtido foi centrifugado, a 10000 *g* por 20 minutos para a remoção de matérias insolúveis. O sobrenadante límpido foi coletado e armazenado em freezer, até o momento de sua utilização.

ESTUDO DA CURVA BINODAL DOS SISTEMAS PEG/PAA

Soluções estoques de PEG 2000, 4000 e 6000 g/mol, foram preparadas separadamente, a 40% (m/m), e a solução estoque de sulfato de sódio foi preparada a 17,74% (m/m). O PAA 8000 g/mol é comercializado em solução aquosa de seu sal sódico a 45% (m/m). As quantidades calculadas para a determinação da curva binodal foram misturadas em tubos de vidro cônicos graduados de 15 mL para formar sistemas de 5 g. Os tubos foram tampados, e a mistura foi homogeneizada em homogeneizador orbital (Fanen, modelo 270) por 5 min. Após esse período os tubos

foram transferidos para um banho termorregulado a 30 °C, em que após 30 min. foi verificada a formação ou não das duas fases.

ESTUDO DA PARTIÇÃO DA BROMELINA EM SISTEMAS PEG/PAA

Soluções estoques de PEG 1000, 1500, 2000, 4000 e 6000 g/mol foram preparadas separadamente, a 40% (m/m), e a solução estoque de sulfato de sódio (Na₂SO₄) foi preparada a 17,74% (m/m). O PAA 1200 e 8000 g/mol são comercializados em soluções aquosas de seus sais sódicos, a 45% (m/m). O PAA 15000 g/mol é comercializado em solução aquosa, de seu sal sódico, a 35% (m/m).

Uma alíquota do extrato de abacaxi proveniente de resíduos foi descongelada. As quantidades calculadas para a extração foram misturadas em tubos de vidro cônicos graduados de 15 mL, para formar sistemas de 5 g. Os tubos foram tampados, e a mistura foi homogeneizada em homogeneizador orbital (Fanen, modelo 270) por 5 min. Após esse período os tubos foram transferidos para um banho termostático a 30 °C, em que após 30 min. foram lidos os volumes de cada fase, e foram coletados, cuidadosamente, amostras das fases superiores e inferiores. A fase superior é a fase rica em PEG e a fase inferior é a fase rica em PAA (JOHANSSON *et al.*, 2008).

O comportamento de partição da bromelina em SDFA foi quantificado em termos de coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento. Coeficiente de partição (K) é definido como:

$$K = \frac{[bromelina]_t}{[bromelina]_b} \quad \text{(Equação 4)}$$

em que [bromelina]_t representa a atividade da bromelina na fase superior e [bromelina]_b representa a atividade da bromelina na fase inferior. O coeficiente de partição, K, é muitas vezes utilizado para avaliar a extensão da separação biomolécula nos sistemas poliméricos de duas fases aquosas. Quando K é significativamente diferente para a biomolécula alvo e outras biomoléculas presentes no sistema, a extração é mais eficaz. Em outras palavras, valores de K extremos indicam a eficácia de partição no SDFA (MAZZOLA *et al.*, 2008).

Fator de purificação (FP) é definido como:

$$PF = \frac{[bromelina]_{fase}}{[bromelina]_{inicial}} \quad (\text{Equação 5})$$

em que $[bromelina]_{fase}$ representa a atividade específica bromelina numa fase e $[bromelina]_{inicial}$ representa a atividade específica bromelina antes da partição.

O rendimento é definido como:

$$Y = \frac{([bromelina]_{fase} \times Vol_{fase})}{([bromelina]_{inicial} \times Vol_{inicial})} \quad (\text{Equação 6})$$

em que $[bromelina]_{fase}$ é a atividade de bromelina em uma fase, Vol_{fase} é o volume da fase correspondente, $[bromelina]_{inicial}$ é a atividade de bromelina antes da partição e $Vol_{inicial}$ é o volume inicial correspondente da bromelina.

Para a elaboração de análise estatística, os valores reais de cada uma das variáveis independentes foram codificados para dar -1, 0, +1 níveis codificados, de acordo com a equação:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (\text{Equação 7})$$

em que x_i representa os valores correspondentes codificados, X_0 os valores reais no ponto central, e ΔX_i o valor de mudança de passo.

Para identificar as melhores condições para a extração da bromelina, foram utilizados modelos lineares expressos pela seguinte equação:

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (\text{Equação 8})$$

em que $\hat{y}_i$ são os valores previstos para cada resposta, b_0 e b_i o intercepto e coeficiente linear, respectivamente, e b_{ij} os valores de interação.

O Software *Statistica* Versão 10 (StatSoft Incorporation, EUA) foi utilizado para a regressão e análise gráfica dos dados. A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste de Fischer para a análise de variância (ANOVA) a um nível de significância $(p) \leq 0,05$, e a extensão da variância explicada por cada modelo foi dada pelo coeficiente de determinação, R^2 . Para minimizar o erro da

análise de variância, os ensaios correspondentes ao ponto central foram repetidos três vezes. Os valores experimentais e previstos foram comparados para determinar a validade do modelo. Uma vez que o ANOVA evidenciou os efeitos e interações mais significativas em cada resposta, somente estas foram mantidas na Equação 8, proporcionando assim o modelo final descrevendo as condições capazes de maximizar a cada um deles.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDO DAS CURVAS BINODAIS DOS SISTEMAS PEG/PAA

As curvas binodais foram obtidas experimentalmente para os seguintes sistemas: PEG 2000 g/mol com PAA 8000 g/mol; PEG 4000 g/mol com PAA 8000 g/mol, PEG 6000 g/mol com PAA 8000 g/mol, todas com 1,65% de Na_2SO_4 , e tampão McIlvaine pH 5,0. As curvas foram estudadas na presença e na ausência da bromelina comercial.

No sistema PEG 2000 g/mol com PAA 8000 g/mol não há diferença entre as curvas obtidas na presença e na ausência da bromelina comercial, havendo sobreposição dos pontos e das curvas binodais obtidas (Figura 34).

FIGURA 34: Curva binodal obtida com PEG 2000 g/mol, PAA 8000 g/mol e 1,65% de Na_2SO_4 , na presença e na ausência de bromelina comercial.

No sistema PEG 4000 g/mol com PAA 8000 g/mol, também não se observa diferença entre as curvas obtidas na presença e na ausência da bromelina comercial, havendo sobreposição dos pontos e das curvas binodais obtidas (Figura 35).

FIGURA 35: Curva binodal obtida com PEG 4000 g/mol, PAA 8000 g/mol e 1,65% de Na_2SO_4 , na presença e na ausência de bromelina.

No sistema PEG 6000 g/mol com PAA 8000 g/mol, nota-se uma sutil diferença entre as curvas obtidas na presença e na ausência da bromelina comercial. Ocorre sobreposição dos pontos e das curvas binodais obtidas na região central da curva, e um distanciamento das curvas nas regiões periféricas (Figura 36). Provavelmente a adição de bromelina causa uma leve alteração no perfil da curva binodal.

FIGURA 36: Curva binodal obtida com PEG 6000 g/mol, PAA 8000 g/mol e 1,65% de Na_2SO_4 , na presença e na ausência de bromelina.

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE ABACAXI

O estudo da extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi foi realizado empregando-se o planejamento estatístico 2^2 , para cada massa molar de PEG estudada, segundo a Tabela 6:

TABELA 6: Níveis dos fatores.

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
PEG (%p/p)	12	14	16
PAA (%p/p)	8	13	18

EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE ABACAXI UTILIZANDO
SDFA COMPOSTO POR PEG 2000 G/MOL E PAA 8000 G/MOL

Os resultados obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 2000 g/mol e PAA 8000 g/mol são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7: Valores obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 2000 g/mol e PAA 8000 g/mol e considerados para análise estatística

Ensaio	PEG (%)	PAA (%)	Fator de Purificação	Coeficiente Partição	Rendimento (%)
1	12	8	2,1	265,3	10
2	12	18	2,8	32,1	7
3	16	8	2,5	14,4	13
4	16	18	1,9	13,2	8
5	14	13	3,1	6,2	14
6	14	13	3,3	13,9	15
7	14	13	4,1	28,9	17

O maior rendimento foi obtido no ensaio 7; 17%, e embora esse valor seja pequeno, obteve um fator de purificação elevado de 4,1, um coeficiente de partição de 28,9. Através do fator de purificação obtido para as extrações realizadas com PEG 2000 g/mol e PAA 8000 g/mol, na presença de Na_2SO_4 , obteve-se os seguintes parâmetros da análise de variância (ANOVA):

TABELA 8: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação para os sistemas formados por PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - <i>f</i>	Valor - <i>p</i>
PEG	0,0441	1	0,0441	0,1554	0,7314
PAA	0,0081	1	0,0081	0,0285	0,8813
PEG*PAA	0,4096	1	0,4096	1,4441	0,3524
Falta de ajuste	2,3735	1	2,3735	8,3682	0,1016
Erro	0,5672	2	0,2836		
Erro Total	3,4025	6			

SQ = Soma quadrática, GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,1357; Erro puro: 0,2836.

Nenhuma das duas variáveis (PEG e PAA) foi significativa ao processo de extração da bromelina. O coeficiente de correlação obtido foi baixo (0,1357). Já para o coeficiente de partição os parâmetros de ANOVA obtidos são os seguintes:

TABELA 9: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do coeficiente de partição para o sistema formado por PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - <i>f</i>	Valor - <i>p</i>
PEG	18195,58	1	18195,58	134,5701	0,0013♦
PAA	13737,23	1	13737,23	101,5972	0,0020♦
PEG*PAA	13463,23	1	13463,23	99,5708	0,0021♦
Falta de ajuste	9326,34	1	9326,34	68,9753	0,0036♦
Erro	405,64	3	135,21		
Erro Total	55128,02	7			

♦ Significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,8234; Erro puro: 135,2127.

Para este parâmetro todos os fatores foram significativos ao processo. Além disso, o modelo apresentou falta de ajuste significativo. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,8234.

A análise de variância do rendimento não apresentou bom coeficiente de correlação e o único fator significativo foi a falta de ajuste, conforme apresentado na Tabela abaixo (Tabela 10).

TABELA 10: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento para o sistema formado por PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - <i>f</i>	Valor - <i>p</i>
PEG	3,3124	1	3,3124	1,7465	0,3172
PAA	11,0224	1	11,0224	5,8118	0,1374
PEG*PAA	1,1881	1	1,1881	0,6264	0,5116
Falta de ajuste	54,4985	1	54,4985	28,7358	0,0330
Erro	3,7930	2	1,8965		
Erro Total	73,8144	6			

SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,2103; Erro puro: 1,8965.

EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE ABACAXI, UTILIZANDO SDFA COMPOSTO POR PEG 4000 G/MOL E PAA 8000 G/MOL.

Os resultados obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 4000 g/mol e PAA 8000 g/mol são apresentados na Tabela 11.

TABELA 11: Valores obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 4000 g/mol e PAA 8000 g/mol e considerados para análise estatística.

Ensaio	PEG (%)	PAA (%)	Fator de Purificação	Coeficiente de Partição	Rendimento (%)
1	12	8	4,1	6,9	17
2	12	18	1,0	3,9	2
3	16	8	2,6	8,5	10
4	16	18	1,6	2,3	6
5	14	13	1,5	1,5	6
6	14	13	1,7	2,2	7
7	14	13	1,8	1,1	8

O maior rendimento foi obtido no ensaio 1; 17%, com fator de purificação de 4,1, valores muito próximos ao melhor resultado obtido com a partir do SDFA PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol (17% e 4,1, respectivamente). Porém o coeficiente de partição (6,9) foi bem inferior ao sistema anterior (28,9).

Através da análise de variância dos dados de coeficiente de partição da atividade específica, obtidos com a extração da bromelina através do SDFA com PEG 4000 g/mol e PAA 8000 g/mol, encontramos que nenhuma variável foi significativa para essa resposta, com o coeficiente de partição (R) de 0,698. Não encontramos diferenças significativas entre as variáveis analisadas para esta resposta.

TABELA 12: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) de coeficiente de partição para o sistema formado por PEG 4000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - f	Valor - p
PEG	102,910	1	102,910	0,6049	0,4933
PAA	1010,910	1	1010,910	5,9429	0,0926
PEG*PAA	68,471	1	68,471	0,4025	0,5708
Erro	510,310	3	170,103		
Erro Total	1692,601	6	102,910		

SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,698.

Para o parâmetro de fator de purificação, a concentração de PAA foi significativa no nível inferior. Apesar de o coeficiente correlação ter sido baixo (0,6231), este experimento não apresentou falta de ajuste significativo.

TABELA 13: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação para o sistema formado por PEG 4000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - f	Valor - P
PEG	0,0663	1	0,0663	0,2700	0,6391
PAA	3,4507	1	3,4507	14,0434	0,0331♦
PEG*PAA	1,5815	1	1,5815	6,4366	0,0848
Falta de ajuste	2,3468	1	2,3468	9,5511	0,0536
Erro	0,7371	3	0,2457		
Erro Total	8,1826	7			

♦ Significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,6231; Erro puro: 0,2457.

A ANOVA do rendimento apresentou ótimos resultados com um coeficiente de correlação de 0,9596 e um erro puro de 0,4799. Além disso, para este parâmetro não houve falta de ajuste.

TABELA 14. Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento para o sistema formado por PEG 4000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - <i>f</i>	Valor - <i>p</i>
PEG	2,9806	1	2,9805	6,2097	0,1302
PAA	88,8628	1	88,8627	185,1367	0,0053♦
PEG*PAA	30,2874	1	30,2874	63,1008	0,0154♦
Falta de ajuste	4,1797	1	4,1797	8,7080	0,0982
Erro	0,9600	2	0,4799		
Erro Total	127,2704	6			

♦significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,9596; Erro puro: 0,4799.

Para esta variável, a concentração de PAA e a interação entre o PEG e o PAA foram significativas, o primeiro no nível inferior e o segundo no nível positivo, ou seja, nas menores concentrações de PEG e PAA podemos obter melhores resultados, obtendo assim a melhor extração da bromelina.

EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE ABACAXI,

UTILIZANDO SDFA COMPOSTO POR PEG 6000 G/MOL E PAA 8000 G/MOL.

Os resultados obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 6000 g/mol e PAA 8000 g/mol são apresentados na Tabela 15.

TABELA 15: Valores obtidos pela extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi utilizando SDFA composto por PEG 6000 g/mol e PAA 8000 g/mol e considerados para análise estatística.

Ensaio	PEG (%)	PAA (%)	Fator de purificação	Coefficiente de Partição	Rendimento (%)
1	12	8	9,8	14,6	37
2	12	18	2,8	3,9	5
3	16	8	2,1	1,9	9
4	16	18	2,6	2,4	7
5	14	13	5,6	2,5	4
6	14	13	4,3	2,1	5
7	14	13	1,7	1,7	5

Neste SDFA obteve-se rendimento aproximadamente 2,2 vezes maior que os sistemas anteriores: 37% no ensaio 1; o mesmo ocorrendo com o fator de purificação. Porém o coeficiente de partição apresentou efeito diverso: foi aproximadamente 2 vezes menor que o obtido no SDFA PEG 2000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Através da análise de variância do fator de purificação nas extrações realizadas com PEG 6000 g/mol e PAA 8000 g/mol, obtivemos um coeficiente de correlação de 0,7432 e nenhuma das variáveis estudadas foi significativa para este parâmetro.

TABELA 16 Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação para o sistema formado por PEG 6000 g/mol/PAA 8000 g/mol

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - <i>f</i>	Valor - <i>p</i>
PEG	15,6785	1	15,6785	3,9597	0,1406
PAA	10,6893	1	10,6893	2,6997	0,1989
PEG*PAA	13,9712	1	13,9712	3,5285	0,1569
Falta de ajuste	2,0540	1	2,0540	0,5187	0,5234
Erro	11,8783	3	3,9594		
Erro Total	54,2715	7			

SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,7432; Erro puro: 3,9594.

Já a ANOVA, realizada com o coeficiente de partição da atividade específica, apresentou todos os fatores significativos, inclusive a falta de ajuste. O coeficiente de correlação de 0,8273.

TABELA 17 Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do coeficiente de partição para o sistema formado por PEG 6000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - <i>f</i>	Valor - <i>p</i>
PEG	50,5710	1	50,5710	349,7355	0,0028♦
PAA	25,6171	1	25,6170	177,1607	0,0055♦
PEG*PAA	31,5994	1	31,5993	218,5326	0,0045♦
Falta de ajuste	22,2031	1	22,2031	153,5509	0,0064♦
Erro	0,2892	2	0,1446		
Erro Total	130,2798	6			

♦significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,8273; Erro puro: 0,1445.

Analisando a variância (ANOVA) do rendimento da atividade específica, temos que todas as variáveis foram significativas ao processo. O coeficiente de correlação foi de 0,7965, e o erro puro foi 0,4202.

TABELA 18. Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento para o sistema formado por PEG 6000 g/mol/PAA 8000 g/mol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fator - <i>f</i>	Valor - <i>p</i>
PEG	171,3335	1	171,3335	407,6696	0,0024♦
PAA	289,7676	1	289,7676	689,4708	0,0014♦
PEG*PAA	224,3611	1	224,3611	533,8430	0,0018♦
Falta de ajuste	174,0132	1	174,0132	414,0457	0,0024♦
Erro	0,8406	2	0,4203		
Erro Total	860,3159	6			

♦ significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R = 0,7965; Erro puro: 0,4202.

Devido à obtenção de baixos coeficientes de correlação e elevados erros puros em todos os parâmetros analisados para todas as massas de PEG estudadas, os experimentos foram repetidos. Porém os resultados continuaram insatisfatórios. Isto pode ter ocorrido devido à interação entre a bromelina e o PAA.

O PAA pertence à classe dos polieletrólitos, que são utilizados com eficiência para separação seletiva de proteínas por precipitação. Essa precipitação é baseada na interação eletrostática entre um polímero carregado e proteínas carregadas com carga oposta (ZHANG *et al.*, 2005; MORAWETZ, HUGHES, 1952; JIANG, PRAUSNITZ, 1999). Zhang e colaboradores, 2005, observaram que o PAA precipitou eficientemente a lisozima (pI 11), com grande enriquecimento da enzima.

Johansson e colaboradores, 2008b, observaram que a lisozima precipitou na presença de PAA em condições com baixas concentrações de sais. Altas concentrações de sal causam em geral uma diminuição na interação eletrostática

através do efeito Debye (JOHANSSON *et al.*, 2008b). Deste modo, optou-se por um novo planejamento, utilizando maiores concentrações de sal.

EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE ABACAXI, UTILIZANDO SDFA ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{6-2}

O novo planejamento realizado incluiu outras massas molares do PAA, além da anteriormente utilizada, 8000 g/mol, utilizou-se 1200 e 15000 g/mol. Incluiu-se também variação de temperatura, e concentrações de sal. A Tabela 19 apresenta os níveis utilizados neste novo planejamento.

TABELA 19: Planejamento fatorial 2^{6-2} .

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
%PEG	6	7	8
%PAA	6	7	8
PEG	2000	4000	6000
PAA	1200	8000	15000
%Sal	6	6,5	7
Temperatura (°C)	20	25	30

Os experimentos forneceram os resultados apresentados na tabela 20.

TABELA 20: Resultados obtidos pela extração da bromelina por SDFA (PEG/PAA) para respostas de rendimento e fator de purificação (FP) de acordo com o planejamento fatorial 2^{6-2} .

Ensaio	PEG (%)	PAA (%)	PEG (g/mol)	PAA (g/mol)	Sal (%)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)	FP	K
1	6	6	2000	1200	6	20	37	1,9	11,0
2	6	6	2000	15000	6	30	20	0,6	n.c.**
3	6	6	6000	1200	7	20	17	1,9	69,1
4	6	6	6000	15000	7	30	18	1,1	2,9
5	6	8	2000	1200	7	30	46	4,2	2,3
6	6	8	2000	15000	7	20	n.c.**	n.c.**	n.c.**
7	6	8	6000	1200	6	30	11	1,3	5,5
8	6	8	6000	15000	6	20	1	1,2	n.c.**
9	8	6	2000	1200	7	30	50	8,2	1,8
10	8	6	2000	15000	7	20	132	6,6	n.c.**
11	8	6	6000	1200	6	30	16	0,9	2,7
12	8	6	6000	15000	6	20	n.c.**	n.c.**	n.c.**
13	8	8	2000	1200	6	20	85	8,8	23,7
14	8	8	2000	15000	6	30	335	25,8	n.c.**
15	8	8	6000	1200	7	20	20	7,6	n.c.**
16	8	8	6000	15000	7	30	6	0,7	0,1
17*(C)	7	7	4000	8000	6,5	25	13	0,9	2,6
18*(C)	7	7	4000	8000	6,5	25	13	0,9	2,6
19*(C)	7	7	4000	8000	6,5	25	13	0,9	1,2

* ponto central; ** não calculado (devido a não detecção da atividade de bromelina em uma ou ambas as fases).

De acordo com a Tabela 20, o valor mais elevado, não só para o rendimento (335%), mas também para o fator de purificação de (25,8) foi obtido no ensaio 14. O

rendimento foi calculado com base na atividade de bromelina e, portanto, o rendimento, superior a 100%, pode ser devido à migração de outras proteínas para a fase inferior, que provavelmente inibiam da atividade da bromelina. Além disso, não foi observada atividade de bromelina na fase inferior, e qualquer influência que os componentes da fase superior possam ter na determinação da atividade de bromelina foram considerados. Na literatura, vários trabalhos apresentam rendimento superior a 100% para a extração de enzimas usando SDFA (MAYERHOFF, ROBERTO, FRANCO, 2004; KIRSCH *et al.*, 2012; CAVALCANTI *et al.*, 2006; CAVALCANTI *et al.*, 2008). Nos ensaios 6 e 12, não foi possível calcular os dois parâmetros, uma vez que não foi observada atividade de bromelina. O mais alto coeficiente de partição (69.1) foi obtido no ensaio 3, sendo três vezes mais elevada do que a obtida na segunda melhor condição (23,7, no ensaio 13).

Através desse novo planejamento obteve-se para a variável rendimento, a seguinte análise de variância (Tabela 21).

TABELA 21: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) para a variável rendimento.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fator - f	Valor - p
(1) %PEG	15271,5	1	15271,51	1744136	0,000482♦
(2)%PAA	2848,3	1	2848,32	325303	0,001116♦
(3)PEG (g/mol)	23764,9	1	23764,85	2714149	0,000386♦
(4)PAA (g/mol)	3344,1	1	3344,10	381925	0,001030♦
(5)%Sal	2918,2	1	2918,21	333285	0,001103♦
(6)Temperatura (°C)	2792,6	1	2792,58	318936	0,001127♦
1 por 2	4924,6	1	4924,59	562430	0,000849♦
1 por 3	15840,0	1	15840,00	1809063	0,000473♦
1 por 4	8757,5	1	8757,49	1000180	0,000637♦
1 por 5	3578,0	1	3577,98	408636	0,000996♦
1 por 6	1089,5	1	1089,46	124425	0,001805♦
3 por 4	5884,3	1	5884,29	672036	0,000777♦
3 por 6	2121,9	1	2121,93	242342	0,001293♦
Falta de ajuste	14610,6	3	4870,21	556219	0,000986♦
Erro puro	0,0	1	0,01		
Erro total	107746,0	17			

♦significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; $R^2 = 0,8644$, Erro puro = 0,0088.

Para a análise de variância do rendimento, todas as variáveis foram significativas. Houve falta de ajuste nos experimentos, porém o erro puro foi baixo. A partir deste resultado não é possível retirar nenhuma variável.

A ANOVA realizada para o coeficiente de partição resultou na seguinte Tabela 22.

TABELA 22: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do coeficiente de partição

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fator - f	Valor - p
(1)%PEG	243,499	1	243,4988	380,371	0,002619♦
(2)%PAA	195,315	1	195,3152	305,103	0,003262♦
(3)PEG (g/mol)	108,065	1	108,0649	168,809	0,005872♦
(4)PAA (g/mol)	796,718	1	796,7175	1244,556	0,000803♦
(5)%Sal	69,225	1	69,2251	108,137	0,009121♦
(6)Temperatura (°C)	488,984	1	488,9837	763,844	0,001307♦
1 por 2	559,002	1	559,0017	873,219	0,001143♦
1 por 3	470,660	1	470,6598	735,220	0,001357♦
1 por 4	202,284	1	202,2841	315,989	0,003150♦
1 por 5	424,051	1	424,0506	662,412	0,001506♦
1 por 6	158,602	1	158,6021	247,753	0,004012♦
3 por 4	78,591	1	78,5915	122,768	0,008047♦
3 por 6	46,103	1	46,1030	72,018	0,013603♦
Falta de ajuste	854,959	3	284,9863	445,179	0,002242♦
Erro puro	1,280	2	0,6402		
Erro total	4697,337	18			

♦significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; R² = 0,8177, Erro = 0,6402.

Segundo a ANOVA para o coeficiente de partição, novamente todas as variáveis foram significativas.

Para a análise de variância do fator de purificação obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 23.

TABELA 23: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fator - f	Valor - p
(1)%PEG	134,3111	1	134,3111	377,1259	0,002641♦
(2)%PAA	50,2086	1	50,2086	140,9784	0,007019♦
(3)PEG (g/mol)	107,7996	1	107,7996	302,6856	0,003287♦
(4)PAA (g/mol)	0,0688	1	0,0688	0,1933	0,703147
(5)%Sal	6,8071	1	6,8071	19,1132	0,048542♦
(6)Temperatura (°C)	13,7283	1	13,7283	38,5470	0,024975♦
1 por 2	42,0714	1	42,0714	118,1303	0,008359♦
1 por 3	93,4572	1	93,4572	262,4141	0,003789♦
1 por 4	12,2952	1	12,2952	34,5230	0,027765♦
1 por 5	13,5336	1	13,5336	38,0003	0,025320♦
1 por 6	6,8299	1	6,8299	19,1775	0,048391♦
3 por 4	21,4438	1	21,4438	60,2111	0,016206♦
3 por 6	49,1104	1	49,1104	137,8947	0,007174♦
Falta de ajuste	102,1984	3	34,0661	95,6527	0,010364♦
Erro puro	0,7123	2	0,3561		
Erro Total	654,5757	18			

♦significativo ao nível de 95% de confiança; SQ = Soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = Média quadrática; $R^2 = 0,8427$, Erro = 0,3561.

Através da ANOVA do fator de purificação, a massa molar do PAA não foi significativo, sendo todos os demais parâmetros significativos. O erro puro foi baixo, porém apresentou falta de ajuste.

Avaliando todas as respostas obtidas através desse planejamento fatorial 2^{6-2} , todas as variáveis avaliadas apresentaram um efeito significativo para o rendimento e coeficiente de partição para a separação da bromelina a partir de resíduos de abacaxi. Por outro lado, a massa molar do PAA teve um efeito significativo sobre o

fator de purificação, e a concentração de sal foi muito próximo da linha de significância. As variáveis concentrações de PAA PEG e temperatura mostraram efeito positivo significativo, o que sugere que um aumento nestes parâmetros iria melhorar a extração bromelina por SDFA (PEG/PAA). A massa molar do PEG teve um efeito negativo, o que significa que trabalhar com menores massas molares de PEG pode melhorar ambas as respostas (rendimento e fator de purificação).

Embora a massa molar PAA não apresentasse um efeito significativo no fator de purificação, ele mostrou um efeito positivo sobre o rendimento. Sob a maior massa molar de PAA, o efeito do volume de exclusão pode ter ocorrido, excluindo a bromelina da fase PEG (superior), bem como as forças eletrostáticas e hidrofóbicas podem ter atuado de modo a fazer a bromelina migrar à fase de PEG. Como o PAA é um polímero carregado negativamente, ela teria uma forte interação eletrostática repulsiva com biomoléculas aniônicas. Assim, a partição da bromelina em PEG/PAA ATPS pode ser conduzida pelas forças entálpica e entrópica.

A concentração de sal apresentou um efeito negativo para as respostas avaliadas, por exemplo, um decréscimo na concentração de sal pode melhorar os resultados para estes parâmetros de extração, mas resultariam em precipitação bromelina, impedindo a extração, como se referiu anteriormente.

Babu, Rastogi e Raghavarao (2008) estudaram a partição da bromelina por sistema PEG/fosfato de potássio, e esta enzima particionou preferencialmente para a fase superior (PEG), o que sugere uma interação hidrófoba entre a bromelina e PEG. Este tipo de interação pode ser também responsável pela partição da bromelina na fase PEG do sistema PEG / PAA.

Deste modo, optou-se por continuar os experimentos realizando um novo planejamento fatorial, com outros níveis de variáveis, e com a concentração de sal Na_2SO_4 fixada em 6% (m/m), visto que neste valor foram obtidos os melhores rendimentos.

EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE ABACAXI,
UTILIZANDO SDFA COM PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{5-1}

O novo planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} realizado incluiu outras massas molares do PEG (1000; 1500 e 2000 g/mol), utilizou mesmas temperaturas e massa molares do PAA, porém as concentrações dos polímeros são diferentes, quando comparados ao planejamento anterior (Tabela 19). O sal, Na_2SO_4 , foi mantido a 6%. A Tabela 24 apresenta os níveis utilizados neste novo planejamento, e a Tabela 25 os resultados obtidos.

TABELA 24: Planejamento fatorial 2^{5-1} .

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
%PEG	8,5	9	9,5
%PAA	8,5	9	9,5
PEG	1000	1500	2000
PAA	1200	8000	15000
Temperatura (°C)	20	25	30

TABELA 25: Resultados obtidos pela extração da bromelina por SDFA (PEG/PAA) para respostas de rendimento, fator de purificação (FP) e coeficiente de partição; de acordo com o planejamento fatorial 2^{5-1} .

Ensaio	PEG (%)	PAA (%)	PEG (g/mol)	PAA (g/mol)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)	FP	Coeficiente de Partição
1	8,5	8,5	1000	1200	30	37	1,0	1,3
2	8,5	8,5	1000	15000	20	56	1,6	n.c.**
3	8,5	8,5	2000	1200	20	48	2,9	n.c.**
4	8,5	8,5	2000	15000	30	9	0,2	n.c.**
5	8,5	9,5	1000	1200	20	40	31,6	n.c.**
6	8,5	9,5	1000	15000	30	n.c.**	n.c.**	0,1
7	8,5	9,5	2000	1200	30	28	1,1	n.c.**
8	8,5	9,5	2000	15000	20	0,2	0,1	n.c.**
9	9,5	8,5	1000	1200	20	50	1,9	n.c.**
10	9,5	8,5	1000	15000	30	n.c.**	n.c.**	0,1
11	9,5	8,5	2000	1200	30	43	1,6	30,2
12	9,5	8,5	2000	15000	20	4	0,2	n.c.**
13	9,5	9,5	1000	1200	30	40	1,1	n.c.**
14	9,5	9,5	1000	15000	20	4	0,1	n.c.**
15	9,5	9,5	2000	1200	20	51	2,2	n.c.**
16	9,5	9,5	2000	15000	30	n.c.**	n.c.**	0,3
17	9	9	1500	8000	25	20	0,5	n.c.**
18	9	9	1500	8000	25	45	1,5	n.c.**
19	9	9	1500	8000	25	35	1,2	n.c.**
20	9	9	1500	8000	25	39	1,2	n.c.**

n.c.** = não calculado (devido a não detecção da atividade de bromelina em uma ou ambas as fases).

O maior rendimento (56%) foi observado no ensaio 2, com as menores concentrações de PEG e PAA (8,5%), menor massa molar de PEG (1000 g/mol) e maior massa molar de PAA (15000 g/mol) a 20 °C. O fator de purificação teve valores de 0,1 (ensaio 8) a 31,6 (ensaio 5). Comparando os ensaios com o maior rendimento e fator de purificação, os seguintes parâmetros foram em comum: a concentração de PEG (8,5%), a massa molar de PEG (1200 g/mol) e temperatura (20 °C).

Ketnawa, Rawdkuen e Chaiwut (2010) verificaram que a massa molar inferior de PEG era preferível para o particionamento da bromelina no sistema formado por PEG e MgSO₄. Navapara, Avhad e Rathod (2011), observaram que o coeficiente de partição e rendimento decrescem com o aumento da massa molar de PEG, num SDFA formado por PEG e fosfato de potássio. Provavelmente devido ao efeito de exclusão estérico e da natureza hidrofóbica do polímero na fase superior que aumenta o particionamento da enzima na fase inferior. No mesmo trabalho, os autores encontraram um coeficiente de partição da bromelina de 12,6 com 90% de rendimento.

Para a análise de variância do rendimento obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 26.

TABELA 26: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do rendimento.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fator - f	Valor - P
(1)%PEG	40,167	1	40,167	1,3575	0,3641
(2)%PAA	429,552	1	429,552	14,5175	0,0624
(3)PEG (g/mol)	112,873	1	112,873	3,8148	0,1900
(4)PAA (g/mol)	4392,452	1	4392,452	148,4511	0,0066♦
(5)Temperatura (°C)	580,804	1	580,804	19,6294	0,0473♦
1 por 2	388,609	1	388,609	13,1338	0,0684
1 por 3	169,342	1	169,342	5,7232	0,1391
1 por 4	493,778	1	493,778	16,6881	0,0550
1 por 5	119,674	1	119,674	4,0446	0,1819
2 por 3	78,006	1	78,006	2,6364	0,2459
2 por 4	131,257	1	131,257	4,4361	0,1697
2 por 5	107,787	1	107,787	3,6429	0,1965
3 por 4	157,140	1	157,140	5,3108	0,1476
3 por 5	149,664	1	149,664	5,0582	0,1534
4 por 5	9,860	1	9,860	0,3332	0,6220
Falta de ajuste	488,606	1	488,606	16,5133	0,0555
Erro puro	59,177	2	29,589		
Erro total	7908,750	18			

♦significativo ao nível de 95% de confiança; GL = graus de liberdade; SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; R² = 0,9307, Erro puro = 29,5885.

Através da ANOVA do rendimento, a massa molar do PAA e a temperatura foram significativos, sendo todos os demais parâmetros não significativos. O erro puro foi baixo, porém apresentou falta de ajuste.

Pode se observar que o efeito mais forte no rendimento ao nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) foi exercido pela massa molar do PAA (0,007) e temperatura (0,047).

Ambos os efeitos foram negativos, o que significa que uma redução em ambas as variáveis podem gerar melhores resultados para extração da bromelina por SDFA (PEG/PAA). O modelo obtido não exibiu uma falta de ajuste, bem como o coeficiente ($R^2 = 93\%$) mostrou que 93% das variações nos resultados do rendimento podem ser explicados pelo modelo.

TABELA 27: Parâmetros da análise de variância (ANOVA) do fator de purificação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fator - f	Valor - P
(1)%PEG	61,5383	1	61,5383	1732,280	0,000577♦
(2)%PAA	44,2477	1	44,2477	1245,556	0,000802♦
(3)PEG (g/mol)	53,2305	1	53,2305	1498,419	0,000667♦
(4)PAA (g/mol)	106,9316	1	106,9316	3010,084	0,000332♦
(5)Temperatura (°C)	79,3611	1	79,3611	2233,985	0,000447♦
1 por 2	45,8307	1	45,8307	1290,116	0,000774♦
1 por 3	59,9262	1	59,9262	1686,900	0,000592♦
1 por 4	49,7825	1	49,7825	1401,359	0,000713♦
1 por 5	64,6608	1	64,6608	1820,177	0,000549♦
2 por 3	55,8784	1	55,8784	1572,956	0,000635♦
2 por 4	57,7190	1	57,7190	1624,768	0,000615♦
2 por 5	49,2629	1	49,2629	1386,731	0,000720♦
3 por 4	43,7296	1	43,7296	1230,971	0,000811♦
3 por 5	58,9192	1	58,9192	1658,553	0,000602♦
4 por 5	64,7427	1	64,7427	1822,483	0,000548♦
Falta de ajuste	6,3853	1	6,3853	179,743	0,005517♦
Erro puro	0,0710	2	0,0355		
Erro total	902,2176	18			

♦significativo ao nível de 95% de confiança; GL = graus de liberdade; SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; $R^2 = 0,9928$, Erro = 0,0355.

Os resultados obtidos para o fator de purificação apresentaram ótimo coeficiente de correlação (0,9928) e um erro puro baixo. Porém, todas as variáveis foram significativas. Enquanto a concentração de PAA teve um efeito positivo, as outras variáveis apresentaram um negativo. Como todas as variáveis foram significativas, não foi possível excluir qualquer variável independente. Tanto para o rendimento quanto para o fator de purificação, a massa molar do PAA e a temperatura foram os fatores que mais influenciaram na partição.

Embora a análise estatística 2^{6-2} tenha apresentado algumas condições para melhorar a resposta de rendimentos e fator de purificação, a análise 2^{5-1} não proporcionou melhores resultados. Foi possível obter um ótimo rendimento (335%) com um bom fator de purificação (25,8) no ensaio 14, do design experimental 2^{6-2} , que tinha as seguintes condições: 8% m/m de PEG e PAA, PEG 2000 g / mol, PAA 15000 g / mol, de 6% m/m de Na_2SO_4 a 30 °C.

Dependendo da formulação farmacêutica, pode-se utilizar bromelina diretamente a partir da partição, em uma solução rica de PEG. Além disso, se necessário, a bromelina pode ser removida a partir da fase PEG usando um simples SDFA de PEG/sal, conforme indicado por (JOHANSSON *et al.*, 2008b) à uma extração reversa de lisozima a partir de sistemas de PEG/PAA.

Babu, Rastogi e Raghavarao (2008) relataram rendimento de 228% e aumento de 4,0 vezes na pureza da bromelina em SDFA de PEG/fosfato. Já Umesh Hebbar, Sumana e Raghavarao (2008) estudaram a extração da bromelina por sistemas micelares reversos e obtiveram os seguintes melhores resultados: 106% de rendimento e fator de purificação de 5,2. No estudo de Soares e colaboradores (2012) obteve-se fator de purificação de 2,28 e rendimento de aproximadamente 98% na extração da bromelina usando por precipitação com etanol. Assim, SDFA PEG/PAA promoveu valores mais elevados para rendimento e fator de purificação quando comparado com outras técnicas de extração.

CONCLUSÃO PARCIAL

No estudo da extração da bromelina em sistemas de duas fases aquosas, formado por diferentes massas molares de PEG e PAA 8000 g/mol, através da análise de variância dos parâmetros, do primeiro planejamento fatorial, como rendimento, fator de purificação e coeficiente de partição, obtiveram-se coeficientes de correlação baixos e erros puros elevados. Deste modo, realizou-se um segundo planejamento fatorial, em que se incluíram novas variáveis, tais como concentração de sal, massa molar do PAA e temperatura. Neste segundo planejamento, todas as variáveis estudadas foram significantes. Deste modo, optou-se por um terceiro planejamento, em que se fixou a concentração de sal, onde os resultados obtidos foram inferiores aos encontrados no segundo planejamento, e novamente todas as variáveis estudadas foram significantes.

Sistemas PEG/PAA proporcionaram bons resultados dos os parâmetros estudados – rendimento, fator de purificação e coeficiente de partição -, em comparação com outros métodos disponíveis na literatura, o que demonstra o potencial deste sistema como um método alternativo para a extração de bromelina a partir de resíduos do abacaxi. Considerando-se os rendimentos obtidos (132 – 335%), bromelina extraída tem o potencial para ser incorporada em formulações farmacêuticas ou cosméticas, após o processo de purificação.

CAPITULO III

HIDROGEL

FERIMENTOS E CURATIVOS

Uma ferida pode ser descrita como um defeito ou uma quebra na pele, originado de dano físico ou térmico, ou como resultado de uma doença ou condição fisiológica, destruindo a estrutura anatômica e sua função (HERMANS, TREADWELL, 2010). As feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas.

Feridas agudas são definidas como resultado de um trauma, ou operação, e que prosseguem normalmente na linha temporal juntamente com o processo de cura (HERMANS, TREADWELL, 2010).

Feridas crônicas são definidas como aquelas que falham ao prosseguir o processo ordenado de cura, e não seguem o tempo previsto para cada etapa do processo (HERMANS, TREADWELL, 2010; WOLCOTT *et al.*, 2010). São consideradas feridas crônicas as úlceras em pé diabético, úlceras venosas de perna e úlceras por pressão (WOLCOTT *et al.*, 2010). Feridas também são classificadas de acordo com suas características: exsudado, maceração, bordas da ferida, infecção, bem como fatores complicadores, como isquemia crítica, resposta imune e diabetes (WOLCOTT *et al.*, 2010).

Cura é um processo complexo, mas em princípio, todas as feridas seguem similarmente os mesmos passos celulares e humorais (HERMANS, TREADWELL, 2010). Espécies reativas de oxigênio, proteases e muitos outros mediadores são cruciais para a cura de necroses, debris e invasão microbiana (HERMANS, TREADWELL, 2010). O processo de cura envolve vários processos sobrepostos:

coagulação, inflamação, digestão do coágulo, contração da ferida, formação da matriz celular, remodelamento e epitelização (FALABELLA, 2006).

Queimaduras resultam da ação direta ou indireta do calor sobre o organismo (VALE, 2005). Estão entre os mais comuns tipos de traumas em qualquer sociedade. Apesar do reconhecimento da importância do debridamento precoce e ao uso de substitutos biológicos de peles, as queimaduras ainda são causa de mortalidade, devido principalmente a infecções que evoluem com septicemia (VALE, 2005).

Mesmo queimaduras menores podem causar morbidade, porque a lesão é muito dolorosa e pode conduzir ao desenvolvimento de sequelas, como incapacidade funcional, cicatrizes desfigurantes, e também de sequelas de ordem psicossocial (HERMANS, TREADWELL, 2010; VALE, 2005).

As causas mais frequentes das queimaduras são a chama de fogo, o contato com água fervente ou outros líquidos quentes e o contato com objetos aquecidos. Menos comuns são as queimaduras provocadas pela corrente elétrica, transformada em calor ao contato com o corpo (VALE, 2005).

Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, no Brasil acontecem um milhão de casos de queimaduras a cada ano, 200 mil são atendidos em serviços de emergência, e 40 mil demandam hospitalização. As queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no Brasil, perdendo apenas para outras causas violentas, que incluem acidentes de transporte e homicídios (VALE, 2005).

A injúria térmica provoca no organismo uma resposta local, traduzida por necrose de coagulação tecidual e progressiva trombose dos vasos adjacentes num período de 12 a 48 horas. A ferida da queimadura a princípio é estéril, porém o tecido necrótico rapidamente se torna colonizado por bactérias endógenas e exógenas (VALE, 2005).

As queimaduras são caracterizadas por uma zona central de necrose irreversível rodeada por uma zona potencialmente aproveitável de estase vascular ou isquemia que tende a progredir ao longo do tempo; com progressiva trombose dos vasos adjacentes e isquemia num período de 12 a 48 horas (SINGER *et al.*, 2010; VALE, 2005). Uma das condições para a cicatrização da queimadura é a remoção da escara necrótica, seguida da reepitelização espontânea sob derme limpa, cura e formação

de cicatrizes (cura por intenção secundária), ou por enxerto com um auto-enxerto (cura por intenção primária) (SINGER *et al.*, 2010).

Debridamento é uma ferramenta largamente utilizada nos cuidados de feridas. Auxilia na remoção de tecido necrosado, não viável ou infectado. Existem vários métodos de debridamento de feridas: autolítica, química, mecânica, cirúrgica e biológica. Na teoria, os métodos autolítico, químico e cirúrgico são considerados os mais seletivos, enquanto que os métodos mecânicos são considerados não seletivos. Modalidades seletivas removem principalmente o tecido necrótico, enquanto as modalidades não seletivas removem tecido necrótico e viável (FALABELLA, 2006).

O método ideal de debridamento deve ser precoce, rápido, seguro, eficaz e seletivo para a escara e inócuo para o tecido não lesado (SINGER *et al.*, 2010).

Debridamento enzimático é considerado o mais efetivo durante vários dias ou até semanas. Porém as enzimas são afetadas pelo pH na ferida, podendo ficar inativas. É um método sem dor, e pode ser utilizado em conjunto com outros métodos de debridamento. Possíveis efeitos colaterais incluem dano ao tecido viável dentro ou ao redor da ferida, e hipersensibilidade ao produto (FALABELLA, 2006). O debridamento enzimático pode ser realizado por protease como papaína, bromelina, collagenase, estreptoquinase e tripsina.

Curativos formam um segmento importante do mercado mundial de cuidados de feridas. A sua função principal era manter a ferida seca, permitindo evaporação dos exsudados da ferida e evitar a entrada de bactérias nocivas na ferida. No entanto, foi demonstrado que, tendo um ambiente de ferida quente e úmido ao processo de cura torna-se mais rápido e eficaz (BOATENG *et al.*, 2008).

Os curativos são classificados em diversas maneiras, dependendo da sua função na ferida (debridamento, antibacteriano, oclusivo, adesão, absorventes), do tipo de material utilizado para produzi-lo (por exemplo: hidrocoloide, alginato, colágeno, hidrogel) e/ou característica física (pomada, película, espuma, gel). Os curativos são ainda classificados em primários, secundários e “ilha”. Curativos que fazem o contato físico com a superfície da ferida são denominados curativos primários, enquanto que curativos secundários revestem o curativo primário, não fazendo contato físico com

a ferida. Curativos “ilha” possuem uma região central absorvente rodeada por uma porção adesiva. Outros critérios de classificação incluem curativos tradicionais, curativos modernos e avançados, produtos de substituição da pele e dispositivos de cura de feridas (BOATENG *et al.*, 2008).

Curativos modernos são baseados no conceito de criação de um ambiente ideal para permitir que as células epiteliais movam-se sem impedimentos, para o tratamento de feridas. Tais condições ótimas incluem um ambiente úmido em torno do ferimento, a eficaz circulação do oxigênio para ajudar a regeneração de células e tecidos, e uma baixa carga bacteriana (BOATENG *et al.*, 2008).

HIDROGEL

A definição mais simples de um hidrogel é: uma rede polimérica, com configurações tridimensionais que intumescce em meio aquoso. Também pode ser definido como um material polimérico que possui a habilidade de absorver e reter uma fração significativa da água em sua estrutura, mas não se dissolve (KÁLAL, 1983).

A capacidade dos hidrogéis em absorver água é atribuída à presença de grupos hidrofílicos, tais como: -OH, -CONH-, -CONH₂-, -SO₃H, nos polímeros que formam as estruturas dos hidrogéis. O polímero é deste modo hidratado em diferentes graus (às vezes mais de 90%), dependendo da natureza e composição polimérica (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008). Os hidrogéis não se dissolvem em ambiente aquoso, como consequência da presença de *crosslinks* críticos, presentes em sua estrutura do hidrogel. Estes *crosslinks* da rede polimérica são ligações covalentes, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals ou emaranhados físicos (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008).

Em uma visão geral, os hidrogéis podem ser classificados baseando-se em uma variedade de características, incluindo: natureza de grupos laterais (neutros ou iônicos), características estruturais e mecânicas (linear ou aparente), método de preparação (homo ou co-polimérica), estrutura física (amorfa, semicristalina, ligações de hidrogênio, super molecular e hidrocoloidal) e resposta a estímulos

fisiológicos do ambiente (pH, força iônica, temperatura, radiação eletromagnética) (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008).

Originalmente, Wichterle e Lim (1960) introduziram um tipo de gel hidrofóbico para uso biológico no início dos anos 1960. Desde então, uma grande soma de esforços e estudos foram dedicados ao avanço e extensão dos potenciais atribuídos ao hidrogel (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008).

Hidrogéis têm sido estudados para uma grande variedade de aplicações biomédicas e biológicas como: membranas de separação, biossensores, músculos artificiais, válvulas mecânicas, suportes ou nano-partículas para liberação controlada de medicamentos (LEE, LEE, KOH, 2007). As estruturas dos hidrogéis possuem algumas propriedades físicas mais parecidas com tecidos vivos do que qualquer outra classe de biomateriais sintéticos, sendo atribuída a sua grande quantidade de água, sua consistência macia e elástica, e sua baixa tensão interfacial frente à água ou fluidos biológicos (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008).

Polímeros comumente usados na preparação de hidrogéis com aplicações farmacêuticas e biológicas são de origem natural ou sintética. A estrutura bem definida dos polímeros sintéticos pode levar à formação de hidrogéis com degradação cinética bem definida e ajustada, assim como suas propriedades mecânicas (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008).

Hidrogéis, particularmente aqueles indicados para o desenvolvimento de propósitos farmacêuticos ou biomédicos, como a liberação controlada de medicamentos, devem ter biodegradabilidade e biocompatibilidade aceitáveis, sendo necessário o desenvolvimento de novas sínteses e métodos de *crosslink* para obtenção do hidrogel com as características desejadas (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008).

Entre a variedade de hidrogéis, os baseados em polietileno glicol (PEG) têm sido largamente utilizados na biologia e medicina, visto que são não tóxicos, não imunogênicos, e aprovados pela agência reguladora de alimentos e medicamentos americana (FDA-*Food and Drug Administration*) para várias aplicações clínicas (LEE, LEE, KOH, 2007). Os hidrogéis têm atraído muita atenção devido a sua estrutura e suas propriedades em resposta a estímulos externos: pH, temperatura, força iônica,

campos elétricos, etc., que são observados na transição do volume do hidrogel (TANG *et al.*, 2009).

Visto que o mecanismo mais comum de liberação de medicamentos em hidrogéis é a difusão passiva, moléculas de diferentes tamanhos e características poderiam difundir livremente na matriz do hidrogel durante os períodos de preenchimento e estocagem. A difusão da droga fora da matriz do hidrogel é inicialmente dependente do tamanho do poro dentro da matriz do gel, o qual por sua vez é afetado por diversos parâmetros, incluindo, principalmente, o grau de *crosslink*, a estrutura química dos monômeros componentes e, quando aplicado, tipo ou intensidade do estímulo externo.

O tamanho característico dos poros, reportado para hidrogéis biomédicos, variam de 5 a 10 nm (em estado intumescido), que são muito maiores do que a maioria das moléculas de medicamentos. Como resultado, as moléculas de medicamentos não são consideravelmente retidas. Já as macromoléculas, como oligonucleotídeos, peptídeos e proteínas, devido ao seu raio hidrodinâmico (15,8 a 29,7 Å, segundo estudo de WILKINS *et al.*, 1999), podem ser retidas na estrutura destes hidrogéis, resultando em uma liberação mais controlada. Para obter as proporções desejadas de difusão macromolecular, deve-se sintetizar o hidrogel de modo que sua estrutura e o tamanho do poro sejam apropriados (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008).

As propriedades físicas de hidrogéis à base de PEG, como permeabilidade, força mecânica e biocompatibilidade podem ser facilmente controladas para uma aplicação em particular pela variação da massa molar do PEG utilizado (LEE, LEE, KOH, 2007).

Hidrogéis à base de PEG possuem alto equilíbrio de conteúdo de água, o que deve fornecer transporte rápido de moléculas pequenas através do gel. O ambiente aquoso dos hidrogéis à base de PEG é apropriado para a imobilização de várias biomoléculas, tais como: proteínas, ácidos nucleicos, e até células inteiras. Além disso, hidrogéis a base de PEG têm demonstrado serem biocompatíveis (LEE, LEE, KOH, 2007).

Curativos de hidrogéis podem ser aplicados quer como um gel amorfo ou como folha, ou película sólida elástica. Para preparar as folhas, os componentes poliméricos retêm fisicamente água. As folhas podem absorver e reter grandes volumes de água em contato com feridas supuradas (BOATENG *et al.*, 2008).

Quando aplicado à ferida, como um gel, curativos de hidrogel requerem geralmente uma cobertura secundária tal como gaze e necessitam de ser mudados frequentemente. As folhas, no entanto, não necessitam de um curativo secundário; além disso, podem ser cortadas para se ajustar em torno da ferida, devido à sua natureza flexível. Curativos de hidrogel contêm quantidades significativas de água (70-90%) e, como resultado, não podem absorver o muito exsudado, assim, eles são utilizados para feridas com pouco a moderado exsudado. Acúmulo de líquido pode levar a maceração da pele e proliferação bacteriana que produz um mau cheiro em feridas infectadas. Além disso, os hidrogéis possuem resistência mecânica baixa e, portanto, são difíceis de manusear (BOATENG *et al.*, 2008).

Hidrogéis possuem a maior parte das características desejáveis de um "curativo ideal". Eles são adequados para a limpeza de feridas secas, com crosta ou necróticas por reidratação dos tecidos mortos e aumentam o debridamento autolítico. Curativos de hidrogel são não reativos com o tecido biológico, permeável aos metabólitos e são não irritantes. Hidrogéis também promovem a cicatrização, são não aderentes e arrefecem a superfície da ferida, o que pode levar a uma redução significativa na dor e, portanto, têm elevada aceitabilidade do paciente. Também não deixam nenhum resíduo, são maleáveis e melhoram a re-epitelização de feridas. (BOATENG *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Preparação de hidrogel a base de polietileno glicol carregado de bromelina, com sua caracterização físico-química.

MATERIAIS E MÉTODOS

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a determinação de proteínas realizou-se o ensaio com ácido bicínico (BCA *Kit Assay* e QuantiPro BCA *Kit Assay*, ambos Sigma®), segundo as instruções dos kits. A curva padrão foi realizada com albumina.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA BROMELINA

A determinação da atividade da bromelina foi realizada pelo método da caseína, de acordo com o método de KUNITZ (1947) e WALTER (1984) modificado. Resumidamente, a caseína foi clivada na presença da bromelina, durante 10 min a 37°C, sendo a reação interrompida pela adição de ácido tricloroacético. A solução foi centrifugada, e uma alíquota do sobrenadante posto a reagir com o reagente *Folin-Ciocalteu*, na presença de carbonato de sódio. A absorbância da solução obtida foi medida a 660 nm. A curva padrão foi realizada utilizando-se L-tirosina como padrão.

PREPARO DO HIDROGEL

O hidrogel foi preparado através da mistura de polietileno glicol diacrilato, polivinil álcool metacrilato, amônio persulfato e tetrametiletilendiamina (TEMED).

ABSORÇÃO DE ÁGUA PELO HIDROGEL

O hidrogel foi imerso a temperatura ambiente em tampão fosfato (PBS, 10 mM) pH 7,4, suplementado com 0,1% de NaN_3 para prevenir contaminação por bactérias ou fungos. Em intervalos de tempo, as amostras foram retiradas e pesadas. As amostras pesadas foram comparadas com a massa das amostras no início do experimento. A mudança de massa com o passar do tempo foi utilizada para estimar a absorção de água do hidrogel no tampão.

A taxa de absorção foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{TAXA DE ABSORÇÃO} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100\% \quad (\text{Equação 9})$$

onde, W_2 é a massa do hidrogel após turgescência, e W_1 é a massa do hidrogel seco.

TESTE DE TENSÃO

Os testes de tensão foram realizados baseados no padrão *ASTM D638-10 Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*, metodologia para teste padrão para propriedades tração de plásticos (ASTM sigla em inglês para Sociedade Americana para Testes e Materiais - *American Society for Testing and Materials*). Os testes foram realizados com hidrogéis preparados em moldes, retirados, e cortados em tiras de 1 cm de largura, sendo cada tira testada no equipamento específico para este fim (INSTRON, Illinois, Estados Unidos).

CARACTERIZAÇÃO REOLOGICA DO HIDROGEL

As propriedades reológicas dos hidrogéis foram medidas utilizando um reômetro AR2000 (TA Instruments, Eschborn, Alemanha). Cinética de gelatinização e varredura de frequência foram realizadas a 25°C, utilizando pratos de geometria paralela de 20 mm com armadilha para solvente para minimizar a perda por evaporação. Para cinética de gelatinização a frequência foi de 1 Hz. Para a varredura de frequência, a faixa de estudada foi 0,01 a 30 rad/s.

ABSORÇÃO E LIBERAÇÃO DA BROMELINA PELO HIDROGEL

A absorção da bromelina pelo hidrogel foi realizada por dois métodos: por *cross link* e pela metodologia de difusão por turgescência. Por *cross link*, adicionou-se solução de bromelina durante o preparo do hidrogel, antes da polimerização, de forma que a quantidade final de bromelina presente no hidrogel fosse aproximadamente de 5 mg/mL. De forma geral a metodologia de difusão por turgescência, 200 mg do hidrogel seco foi colocado em 3 mL de solução de bromelina a 30 mg/mL, em tampão McIlvaine pH 5,0, a 4 °C overnight. Após este período, o hidrogel foi retirado da solução. A quantidade de bromelina absorvida foi estimada pela mudança de atividade da solução.

A liberação da bromelina pelo hidrogel foi estudada, colocando-se o hidrogel carregado com bromelina, por ambas as metodologias, em tampão McIlvaine pH 5,0. Em intervalos de tempo, o hidrogel foi removido, suavemente seco em papel absorvente, e colocado em uma nova solução tampão. A atividade de bromelina na solução foi mensurada como descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados hidrogéis a base de polietileno glicol diacrilato (PEG-DA) 5 kDa e 10 kDa, segundo as formulações abaixo (Tabela 28 e 29). O persulfato de amônio (APS) tem função de iniciador, e o N,N,N',N''-tetrametiletileno diamina (TEMED) tem função de catalisar a formação de radicais, para a reação de *cross link* entre os polímeros. Os géis foram preparados em tampão PBS, pH 7,4; e a formação destes ocorre rapidamente. Todos os hidrogéis formados apresentaram características organolépticas satisfatórias, em termos de odor, cor e aparência. Estas propriedades são muito importantes para a obtenção da aceitação do produto por pacientes (ALMEIDA *et al.*, 2012). O hidrogel formado apresentou aspecto transparente.

FIGURA 37: Hidrogel formado com polietileno glicol 10kDa.

TABELA 28: Formulação dos hidrogéis a base de polietileno glicol diacrilato 5 kDa.

	Hidrogel 1	Hidrogel 2	Hidrogel 3
PEG-DA 5kDa (mg)	200	150	100
APS (mg)	6	3	3
TEMED (mg)	3	1,5	1,5
% PEG 5kDa	17	14	9

TABELA 29: Formulação dos hidrogéis a base de polietileno glicol diacrilato 10 kDa.

	Hidrogel 4	Hidrogel 5	Hidrogel 6
PEG-DA 10kDa (mg)	125	150	175
APS (mg)	6,1	6,1	6,1
TEMED (mg)	3	3	3
% PEG 10kDa	12,5	15	17,50

Os hidrogéis a base PEG-DA 5 kDa foram submetidos ao teste de absorção de água, e no final de 5 dias, as taxas de absorção obtidas foram de 500% a 729% (formulação de 1 a 3). Já com os hidrogéis a base PEG-DA 10 kDa, o teste de absorção foi realizado em água e em tampão PBS pH 7,4, visto que a presença de sais pode influenciar a absorção de água pelo hidrogel. A taxa de absorção foi calculada em intervalos de tempo de 1, 5, 24, 50, 120 e 288 horas, e os resultados obtidos são apresentados nas figuras 38 a 40.

FIGURA 38: Taxa de absorção *versus* tempo (h) do hidrogel com 12,5% de PEG-DA 10 kDa (formulação 4).
As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

FIGURA 39: Taxa de absorção *versus* tempo (h) do hidrogel com 15% de PEG-DA 10 kDa (formulação 5).
As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Figura 40: Taxa de absorção *versus* tempo (h) do hidrogel com 17,5% PEG-DA 10 kDa (formulação 6).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Conforme pode se observar, a taxa de absorção aumenta com o passar do tempo. A diferença de absorção na presença de água e PBS é evidente na primeira hora, cerca de 60% menor, e esta diferença diminui com o decorrer do tempo, conforme podemos observar nas figuras acima. A taxa de absorção indica a habilidade do hidrogel, como curativo, de absorver o exsudado das feridas. Uma elevada taxa de absorção superior torna o hidrogel ideal para curativos de remover fluidos de feridas altamente exsudativas e auxilia a resistir a contaminação indesejável (LALANI, LIU, 2012). Deste modo, optou-se por prosseguir os experimentos somente com os hidrogéis formulados com PEG-DA 10 kDa, visto que estes apresentaram taxa de absorção superior aos formados com PEG-DA 5 kDa.

Estudos de tração foram realizados com as formulações 4 a 6, e os resultados obtidos pelo são apresentados na Tabela 30, e na Figura 41.

TABELA 30: Valores de carga máxima obtidos através do teste de tração para cada formulação estudada.

Formulação	Carga máxima (N)
4	0,01±0,00
5	0,02±0,01
6	0,09±0,02

Figura 41: Tensão à ruptura e tensão de tração em carga máxima para as formulações 4, 5 e 6.
As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

A formulação 6, que possui maior concentração de PEG-DA, apresentou o maior valor de carga máxima, porém seus valores de tensão não foram os maiores. As três formulações demonstram baixa tração mecânica, sendo facilmente quebrados, embora fossem capazes de alongar 80% a mais de seu tamanho original.

Buscando aumentar a elasticidade do hidrogel obtido, optou-se por adicionar na formulação polivinil álcool (PVA), visto que hidrogéis a base de PVA oferecem muitas vantagens, como teor de água elevado e alta elasticidade, e biocompatibilidade (PARK *et al.*, 2012).

PVA é um polímero não tóxico, biocompatível, possui alta hidrofiliicidade, capacidade de formar fibras/filmes, e resistência mecânica e química (KIM *et al.*, 2008). Hidrogéis formados com o PVA possuem excelente transparência, são biologicamente inativos e biocompatíveis. Tem atraído atenção por ser largamente usado como um bom material para peles temporárias e para curativos de queimaduras (KIM *et al.*, 2008).

Neste trabalho, primeiramente realizou-se um teste de solubilidade entre o PEG e o PVA, visto que, como regra, uma solução de dois polímeros quimicamente diferentes num mesmo solvente não são mutuamente compatíveis (separação de fases pode ocorrer imediatamente ou após a mistura de polímeros ser deixada em repouso) (HATTI-KAUL, 2000). A compatibilidade pode ser alcançada usando um dos polímeros em quantidades inferiores que o outro. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 31.

TABELA 31: Teste de solubilidade entre PEG e PVA. Concentrações dos polímeros apresentada em porcentagem (% p/v).

PEG 10 kDa	PVA 125 kDa		
	0,5%	1%	5%
1%	1	1	1
5%	2	3	3
10%	3	3	4
15%	4	5	5
20%	5	5	5

Legenda: 1) solução límpida; 2) solução ligeiramente límpida, 3) solução turva, 4) solução turva, separação de fases após repouso, 5) separação de fases.

Visto que soluções com concentrações igual ou acima de 15% (p/v) PEG 10 kDa apresentaram separação de fase, optou-se por trabalhar com PEG 10 kDa abaixo desta concentração. e com PVA em concentração de 0,5% (p/v).

Primeiramente foi observado se havia a necessidade de utilizar um PVA modificado, com o grupamento acrílico, para a formação de hidrogel *crosslink*, ou se o PVA conseguiria reagir com o PEG-DA sem a necessidade de modificação. Os resultados deste teste são apresentados na Figura 42, sendo que as formulações utilizadas são apresentadas na Tabela 32. O teste consistiu em produzir hidrogéis a partir destas formulações, secá-los em estufa a 50°C por 8 horas, sendo em seguida pesados, e colocado em água *overnight*. Após este período, os géis foram novamente secos em estufas, nas mesmas condições, sendo por fim novamente pesados. A diferença de massa entre as pesagens significa que na lavagem ocorre perda de polímero que não reagiu, não fazendo parte, portanto da malha do hidrogel.

TABELA 32: Formulações utilizadas para observar possível reação entre PEG-DA e PVA ou PVA-MA.

PEG-DA		PEG-DA + PVA		PEG-DA + PVA-MA	
PEG -Da	12,50%	PEG -Da	12,50%	PEG -Da	12,50%
TEMED	3 mg/mL	PVA	0,50%	PVA-Ma	0,50%
APS	6 mg/mL	TEMED	3 mg/mL	TEMED	3 mg/mL
		APS	6 mg/mL	APS	6 mg/mL

FIGURA 42: Massa remanescente após lavagem (PEG-DA: polietileno glicol diacrilato, PVA: polivinil álcool, PVA-MA: polivinil álcool metacrilato). As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Conforme podemos observar através da Figura 42, há necessidade da utilização do PVA modificado, contendo grupamento acrílico. A presença do PVA-MA, inclusive aumenta a quantidade de polímero que reage para a formação do hidrogel.

Em seguida estudou-se a taxa de absorção do hidrogel formado com 12,5% PEG-Da 10 kDa e 0,5% PVA-MA 125 kDa, segundo a formulação apresentada na Tabela 33. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 43.

TABELA 33: Formulação utilizada para estudo da taxa de absorção.

Hidrogel 7	
PEG-DA 10kDa (% p/v)	12,5
PVA-MA 125kDa (% p/v)	0,5
APS (mg)	6,1
TEMED (mg)	3

FIGURA 43: Taxa de absorção *versus* tempo (h) do hidrogel com 1,5% PEG-DA 10 kDa e 0,5% PVA-MA (formulação 7).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Conforme se pode observar na Figura 43, a taxa de absorção torna-se equilibrada após 4,5 h, e comparando-se com a formulação 4, onde não há presença de PVA-MA, a taxa de absorção na formulação 7 é 1,25 vezes maior, e é alcançada em menor tempo. Porém, apesar da diferença de absorção entre as formulações 4 e 7 (sem e com PVA-MA), não houve mudança significativa no comportamento dos hidrogéis frente aos testes de tensão, conforme apresentado na Figura 44.

FIGURA 44: Tensão à ruptura e tensão de tração em carga máxima para as formulações 4 e 7.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Optou-se por estudar outras formulações, alterando a concentração de APS e TEMED, buscando uma formulação em que todo o polímero presente reagisse. As formulações estudadas são apresentadas na Tabela 34. O teste consistiu em produzir hidrogéis a partir destas formulações, secá-los em estufa a 50°C por 8 horas, sendo em seguida pesados, e colocado em água *overnight*. Em seguida, os géis foram novamente secos em estufas, nas mesmas condições, sendo por fim novamente pesados. A diferença de massa entre as pesagens significa na lavagem ocorre perda de polímero que não reagiu, não fazendo parte, portanto da malha do hidrogel.

TABELA 34: Formulações estudadas visando aperfeiçoar a reação de *crosslink*

Formulação	APS (mg/mL)	TEMED (mg/mL)	PEG-DA (%)	PVA-MA (%)
8	6	3	12,5	-
9	6	6	12,5	-
10	6	9	12,5	-
11	6	12	12,5	-
12	6	15	12,5	-
13	6	18	12,5	-
14	12	6	12,5	-
15	12	9	12,5	-
16	12	12	12,5	-
17	6	3	12,5	0,5
18	6	6	12,5	0,5
19	6	9	12,5	0,5
20	6	12	12,5	0,5
21	6	15	12,5	0,5
22	12	9	12,5	0,5
23	12	12	12,5	0,5

FIGURA 45: Massa remanescente dos hidrogéis após lavagem.
As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Dentre as formulações estudadas (8 a 23), as formulações 12, 13, 14 não formaram hidrogel. As formulações 11, 15, 16, 20 e 21 perderam mais de 50% de sua massa, o que indica que no mínimo 50% do polímero adicionado na formulação não reagiram para a formação do hidrogel, sendo facilmente retirado por uma lavagem.

Na literatura, existem vários estudos que utilizam ácido ascórbico para formação de hidrogel, no lugar do TEMED (SHUNG *et al.*, 2003; TEMENOFF *et al.*, 2002; BEHRAVESH, SIKAVITSAS, MIKOS, 2003; LIU *et al.*, 2009; BEHRAVESH, MIKOS, 2003; TESSMAR, GÖPFERICH, 2007). Deste modo, estudou-se a formação de hidrogel, utilizando-se o ácido ascórbico, numa tentativa de otimização da reação.

TABELA 35: Formulações estudadas visando aperfeiçoar a reação de *cross link*, utilizando ácido ascórbico

Formulação	APS (mg/mL)	Ácido Ascórbico (mg/mL)	PEG-Da (%)	PVA -Ma (%)
A	6	17,6	12,5	-
B	12	17,6	12,5	-
C	6	35,22	12,5	-
D	12	35,22	12,5	-
E	12	52,8	12,5	-
F	12	70,4	12,5	-
G	12	88,1	12,5	-
H	12	8,8	12,5	-
I	12	13,2	12,5	-
J	6	8,8	12,5	-
L	12	17,6	12,5	0,5
M	12	13,2	12,5	0,5
N	6	8,8	12,5	0,5
O	12	8,8	12,5	-
P	6	13,2	12,5	-
Q	6	8,8	12,5	0,5

FIGURA 46: Massa remanescente dos hidrogéis após lavagem
As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Das 17 formulações estudadas (A a Q), somente seis formaram hidrogel, e estas apresentaram resultados inferiores aos encontrados anteriormente, utilizando TEMED. Sendo assim, as formulações que apresentaram menor perda de polímero, usando TEMED como catalisador, foram estudadas, desta vez permitindo que a polimerização do hidrogel ocorresse a 50°C. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 46, e as formulações escolhidas na Tabela 36 (formulações que continham ambos os polímeros e apresentaram menor perda destes).

TABELA 36: Formulações de hidrogel para polimerização a 50 °C

Formulação	APS (mg/mL)	TEMED (mg/mL)	PEG-DA (%)	PVA-MA (%)
17	6	3	12,5	0,5
18	6	6	12,5	0,5
19	6	9	12,5	0,5
22	12	9	12,5	0,5
23	12	12	12,5	0,5

FIGURA 47: Massa remanescente dos hidrogéis após lavagem.
As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Conforme se pode observar na Figura 47, o aumento de temperatura na formação do hidrogel influenciou na sua formação e fez com que ocorresse menor perda de polímero, frente aos formados em temperatura ambiente. Isso se deve ao fato de que um aumento de temperatura, aumenta a energia cinética das moléculas. Destas formulações estudaram-se as respectivas taxas de absorção, que são apresentadas na figura abaixo (Figura 48).

FIGURA 48: Taxa de absorção das formulações 17, 18, 19, 22 e 23.
As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Somando as informações de perda de polímero e as taxas de absorção destes géis, optou-se por seguir os experimentos utilizando as formulações 18, 19 e 23, que apresentaram perda de polímero menor que 34% e também as taxas de absorção foram superiores a 1000%.

Os resultados de taxa de absorção obtidos foram todos superiores aos encontrados por Razzar e colaboradores (2001), em hidrogel de PVA-PVP para curativos, onde a taxa obtida foi entre 40% e 250%. Yoo e Kim (2008) obtiveram taxas de absorção na faixa de 409 a 810% em hidrogéis para curativos formados por poliuretano e PEG. Jiang e colaboradores (2012) obtiveram valores de 530 a 10440% em hidrogéis formados por poli (N-isopropilacrilamida) para fins de curativo. Em hidrogel formado por gelatina recombinante HU4 para liberação de proteínas, Sutter e colaboradores (2007) obtiveram taxas de absorção inferiores aos encontrados no presente trabalho, com valores de 5 a 140%. A máxima taxa de absorção obtida por Saarai e colaboradores (2012) com hidrogéis de sódio alginato e gelatina para curativos foi de 1176%.

Das três formulações escolhidas, realizaram-se estudos de reologia, onde a evolução dos módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') foram medidos em função do tempo, a uma frequência oscilatória de 1 Hz.

FIGURA 49: Típico reograma do hidrogel 18, polimerizado a temperatura ambiente e 50°C.

FIGURA 50: Típico reograma do hidrogel 19, polimerizado a temperatura ambiente e 50°C.

FIGURA 51: Típico reograma do hidrogel 23, polimerizado a temperatura ambiente e 50°C.

No início do experimento, todas as amostras se comportaram como um líquido de fluxo livre ($G'' > G'$); porém não foi possível obter o tempo exato de gelatinização, onde G' cruza com G'' . Isto se deve ao fato do ponto de gelatinização ocorrer rapidamente, segundos antes da realização da primeira medida do aparelho. Deve-se levar em conta que após a amostra ser colocada no prato inferior do reômetro, o aparelho leva em média 1 minuto entre o prato superior atingir a altura ideal para realização do teste, e a primeira medição. Durante o curso do experimento, o *cross-linking* prosseguiu, como indicado pelo pronto aumento do valor de G' . Após 5 minutos, o valor de G' excede o valor de G'' por várias ordens de magnitude, atingindo um *plateau* após 10 min, indicando que a formação do gel estava completa.

A formulação 18, polimerizada à temperatura ambiente (entre 21 e 25 °C), apresentou $G' 2636 \pm 666$ Pa, a polimerizada a 50 °C 1351 ± 217 Pa; ou seja, o hidrogel polimerizado a temperatura ambiente foi cerca de 2 vezes mais rígido que o polimerizado a 50°C. A formulação 19, polimerizada a temperatura ambiente, apresentou $G' 2521 \pm 125$ Pa e a polimerizada a 50 °C 3013 ± 578 Pa, portanto levemente mais rígida. A formulação 23, polimerizada a temperatura ambiente, apresentou $G' 1078 \pm 235$ Pa, a polimerizada a 50 °C 2167 ± 695 Pa, cerca de 2 vezes mais rígida que a polimerizada a temperatura ambiente. Deste modo temos que a

formulação mais rígida foi a 19 polimerizada a 50°C e a mais flexível foi a formulação 23 polimerizada a temperatura ambiente.

Sutter e colaboradores (2007) encontraram valores de G' de 90 a 32300 Pa em hidrogéis formados por gelatina recombinante HU4 para liberação prolongada de proteínas. Já no estudo de Song, Rane e Christman (2012), os valores de G' encontrados foram de 1400 Pa a 3000 Pa a 1 Hz, em hidrogéis para feridas, formados por polipeptídios e PEG- amida succinimidil glutarato. Hidrogéis à base de colágeno são utilizados extensivamente em cicatrização, e seu G' típico (cerca de 78 Pa a 1 Hz, colágeno = 1,6 mg/ml) (SONG, RANE, CHRISTMAN, 2012) é inferior aos encontrado nas formulações estudadas. Os hidrogéis à base de colágeno são conhecidos por suas baixas propriedades mecânicas, e os hidrogéis obtidos neste estudo são mais fortes do que o gel de colágeno, medidos por reologia, e, portanto, pode proporcionar um suporte mecânico mais adequado para a cicatrização de feridas.

Os valores da força do gel ($|G^*|$) são apresentados na Tabela 37.

TABELA 37: Força do gel ($|G^*|$)

Formulação	Temperatura 25°C	Temperatura 50°C
18	2635 ± 666	4458 ± 529
19	2520 ± 123	3014 ± 578
23	1078 ± 235	2168 ± 695

Através da análise de variância dos resultados apresentados na Tabela 37, não se observou diferença significativa entre as formulações estudadas ($p > 0.05$, Tukey).

Os valores de G' e G'' também foram avaliados pela varredura de frequência na faixa de 0,1 a 30 rad.s⁻¹, a temperatura ambiente.

FIGURA 52: Varredura de frequência do hidrogel gel 18 polimerizado a temperatura ambiente e a 50°C.

FIGURA 53: Varredura de frequência do hidrogel 19 polimerizado a temperatura ambiente e a 50°C.

FIGURA 54: Varredura de frequência do hidrogel 23 polimerizado a temperatura ambiente e a 50°C.

As varreduras de frequência das formulações mostram que o módulo de armazenamento (G') permanece constante e superior ao módulo de dissipação (G'') por toda frequência angular estudada (0,01 a 30 rad/s), indicando comportamento de gel. Esse comportamento de G' superior a G'' indica a formação de géis fortes e rígidos (THATIPARTI, SHOFFSTALL, RECUM, 2010).

Uma rede tridimensional é indicada quando G' predomina G'' , como suas inclinações sendo independentes da frequência angular (WILLIAMS *et al.*, 2011). As formulações estudadas exibem uma dependência positiva da frequência angular, e, por conseguinte, não exibem uma estrutura de gel tridimensional definitiva, segundo os dados reológicos.

Em seguida, procedeu-se à realização dos testes de tensão para cada formulação estudada, 18, 19 e 23, com a polimerização realizada à temperatura ambiente e a 50°C, conforme apresentado na Figura 55.

FIGURA 55: Carga máxima, tensão à ruptura e tensão de tração em carga máxima para as formulações 18, 19 e 23, polimerizadas em temperatura ambiente (TA) e a 50°C.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão encontrado.

Através da análise de variância dos resultados obtidos, temos uma diferença significativa da tensão entre os géis polimerizados a temperatura ambiente e os polimerizados a 50°C ($p < 0,05$, teste de Tukey).

Conforme podemos observar na Figura 55, para as três formulações estudadas, os hidrogéis polimerizados a 50°C mostraram-se mais frágeis e menos elásticos que os polimerizados a temperatura ambiente. Isso se deve ao fato de que, quando a polimerização ocorre a 50°C, aumenta o número de *crosslink* entre os polímeros, tornando o gel menos suscetível a alongamento.

Porém, no estudo de Yoo e Kim (2008) obteve-se valores de tensão de tração superiores aos encontrados no presente trabalho, de 250 a 750%, mas estes trabalharam com hidrogéis para curativos formados por poliuretano e PEG.

Posteriormente, estudou-se a absorção da bromelina pelas três formulações estudadas. Nos hidrogéis que foram polimerizados juntamente com a solução de bromelina, a quantidade de bromelina presente em cada gel foi de $5,3 \pm 0,2$ mg/mL, com atividade de 793 ± 26 U/mL.

Nos hidrogéis onde a bromelina foi absorvida através da metodologia de difusão por turgescência, conforme descrito nos Materiais e Métodos, a quantidade de bromelina absorvida foi calculada através da diferença entre a atividade e concentração da solução inicial, e a atividade e concentração da solução após período de *overnight*.

Para a formulação 18, polimerizada à temperatura ambiente, os hidrogéis absorveram $7,4 \pm 5$ mg/mL; para a polimerizada a 50°C , o valor foi de $9,8 \pm 3,8$ mg/mL; para a formulação 19, $1,7 \pm 0,2$ mg/mL e $7,2 \pm 3$, polimerizada à temperatura ambiente e a 50°C , respectivamente. Para a formulação 23, polimerizada a temperatura ambiente, os hidrogéis absorveram $6,7 \pm 2,2$ mg/mL; para a polimerizada a 50°C , o valor foi de $7,8 \pm 3,3$ mg/mL.

As Figuras 56 e 57 apresentam a atividade de bromelina liberada pelas formulações de hidrogéis estudadas. A liberação foi estudada em temperatura ambiente e a 37°C .

FIGURA 56: Atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis 18; 19 e 23, carregado com bromelina através da metodologia de difusão por turgescência.

FIGURA 57: Atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis 18; 19 e 23, carregado com bromelina através da metodologia de *cross link*

A atividade de bromelina liberada à temperatura ambiente e a 37°C foram próximas e seguiram o mesmo comportamento, com poucas exceções, conforme apresentado nas figuras acima. Para a formulação 18, polimerizada a temperatura ambiente, com absorção da bromelina pelo método de difusão por turgescência, obteve-se a atividade de bromelina liberada, a temperatura ambiente, alcançando o valor de 278 ± 89 U/mL. Já na formulação 23, polimerizada a temperatura ambiente, com absorção da bromelina pelo método de difusão por turgescência, apresentou a segunda atividade de bromelina liberada, ocorrendo a 37 °C, no valor de 271 ± 12 U/mL.

A maior atividade de bromelina liberada por hidrogéis em que a absorção de bromelina ocorreu por *crosslink*, foi 214 ± 14 U/mL, obtida pelo hidrogel 19, polimerizado a 50 °C, com liberação a temperatura ambiente. A segunda maior foi 120 ± 54 U/mL, obtida pelo hidrogel 23, polimerizado à temperatura ambiente, com liberação a 37 °C.

FIGURA 58: Gráfico de Pareto. Efeito das variáveis (A) formulação do hidrogel (18; 19 ou 21); (B) temperatura de polimerização; (C) forma de absorção da bromelina; (D) temperatura do ensaio.

O gráfico de Pareto, apresentado na figura 58, apresenta o efeito padronizado de cada variável ou interação correspondente para a resposta de atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis. As barras que se prolongam para além da linha vertical correspondem aos efeitos estatisticamente significativos a um nível de confiança de 95%. Deste modo observamos que a força que mais interfere na atividade de bromelina é a temperatura de polimerização, e que a interação de todas as variáveis é significativa na atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis.

As Figuras 59 e 60 apresentam a liberação acumulada de bromelina pelas formulações de hidrogéis estudadas.

FIGURA 59: Liberação acumulada de bromelina pelos hidrogéis 18; 19 e 21, carregado com bromelina através da metodologia de difusão por turgescência.

FIGURA 60: Atividade de bromelina liberada pelos hidrogéis 18; 19 e 23, carregado com bromelina através da metodologia de *cross link*

A liberação de bromelina a temperatura ambiente e a 37°C foram próximas e seguiram o mesmo comportamento, com poucas exceções, conforme apresentado

nas figuras acima. Para a formulação 19, polimerizada a temperatura ambiente, com absorção da bromelina pelo método de difusão por turgescência, obteve-se a maior liberação de bromelina a temperatura ambiente, 80%. Já em hidrogéis em que a absorção de bromelina ocorreu por *crosslink*, a maior liberação foi de 8%, obtida pelo hidrogel 23, polimerizado a temperatura ambiente, com liberação a 37 °C.

Os hidrogéis em que a absorção de bromelina ocorreu por *crosslink*, liberaram menor quantidade de bromelina, comparados aos hidrogéis em que a absorção da bromelina foi realizada através da difusão por turgescência. Uma das explicações para este fato é que a reação de *cross link* pode ter inibido a ação da enzima, seja por destruição da estrutura quaternária da enzima, ou por a reação ter ligado covalentemente a enzima aos polímeros, impedindo sua liberação.

FIGURA 61: Gráfico de Pareto. Efeito das variáveis (A) formulação do hidrogel (18; 19 ou 21); (B) temperatura de polimerização; (C) forma de absorção da bromelina; (D) temperatura do ensaio.

O gráfico de Pareto, apresentado na figura 61 apresenta o efeito padronizado de cada variável ou interação correspondente para a resposta de liberação de pelos hidrogéis. As barras que se prolongam para além da linha vertical correspondem aos

efeitos estatisticamente significativos a um nível de confiança de 95%. Deste modo observamos que a variáveis que interferem na liberação de bromelina é a forma de absorção da bromelina, a temperatura de polimerização e a interação entre estas.

CONCLUSÃO PARCIAL

As formulações 18, 19 e 23, polimerizadas à temperatura ambiente apresentaram melhores propriedades de tensão dentre os hidrogéis estudados. Suas propriedades reológicas foram superiores às de hidrogéis de colágeno, muito utilizados como curativos.

A absorção da bromelina pelo método de turgescência proporcionou a maior liberação de bromelina assim como a maior atividade (80% da bromelina liberada em 24 h, obtida pela formulação 19, e 278 ± 89 U/mL, obtida pela formulação 18, ambas polimerizadas a temperatura ambiente).

CONCLUSÃO GERAL

No presente trabalho, a bromelina comercial apresentou maior estabilidade em pH 5,0, em todas as temperaturas estudadas (20, 30, 40 e 50 °C), apresentando menor decréscimo da atividade relativa. Também se pode concluir que a temperatura em que a bromelina é mais estável, dentro dos valores estudados é 20 °C. Soluções de PEG aumentaram a estabilidade da enzima, enquanto que soluções de PAA tiveram efeito oposto.

A extração da bromelina a partir de resíduos de abacaxi, realizada através do sistema de duas fases aquosas, formados por PEG/PAA proporcionaram bons resultados de ambos os parâmetros - rendimento de 335% e fator de purificação de 25,8 - em comparação com outros métodos disponíveis na literatura, o que demonstra o potencial deste sistema como um método novo e alternativo para a extração da enzima.

Dentre as formulações de hidrogéis estudadas, três apresentaram melhores propriedades reológicas, demonstrando-se serem flexíveis, embora pouco elásticas. Os hidrogéis carregados com bromelina, pelo método de turgescência, liberaram 80% da bromelina carregada em 24h, com atividade de 278 ± 89 U/mL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, B.; ANSARI, M. A.; SEN, P.; KHAN, R. H. Low versus high molecular weight poly(ethylene glycol)-induced states of stem bromelain at low pH: Stabilization of molten globule and unfolded states. **Biopolymers**, v. 81, n. 5, p. 350–359, 2006.

AHMAD, B.; KHAN, R. H. Studies on the acid unfolded and molten globule states of catalytically active stem bromelain: A comparison with catalytically inactive form. **Journal of Biochemistry**, v. 140, n. 4, p. 501–508, 2006.

ALMEIDA, J. S.; BENVEGNÚ, D. M.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R. C. S.; CORADINI, K.; CARVALHO, L. M. DE; BÜRGER, M. E.; BECK, R. C. R. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 7, p. 792–799, 2012. doi:10.3109/03639045.2011.628676.

ANWAR, T.; AHMAD, B.; YOUNUS, H. Cross-linked stem bromelain: A more stabilized active preparation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 6, p. 453–458, 2007.

AZEVEDO, A. M.; CABRAL, J. M.S.; PRAZERES, D. M.F.; GIBSON, T. D.; FONSECA, L. P. Thermal and operational stabilities of Hansenula polymorpha alcohol oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 27, n. 1, p. 37–45, 2004.

BABU, B. RAVINDRA; RASTOGI, N.K; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 1, p. 83–89, 2008. doi:10.1016/j.cep.2007.08.006.

BALLS, A. K.; THOMPSON, R. R.; KIES, M. W. Bromelin. Properties and Commercial Production. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 950–953, 1941. doi:10.1021/ie50379a028.

BEHRAVESH, E.; MIKOS, A. G. Three-dimensional culture of differentiating marrow stromal osteoblasts in biomimetic poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol)-based macroporous hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 66, n. 3, p. 698–706, 2003. doi:10.1002/jbm.a.10003.

BEHRAVESH, E.; SIKAVITSAS, V. I.; MIKOS, A. G. Quantification of ligand surface concentration of bulk-modified biomimetic hydrogels. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4365–4374, 2003. doi:10.1016/S0142-9612(03)00338-7.

BENUCCI, I.; LIBURDI, K.; GARZILLO, A. M.V.; ESTI, M. Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1349–1353, 2011.

BHATTACHARYA, R.; BHATTACHARYYA, D. Resistance of bromelain to SDS binding. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1794, n. 4, p. 698–708, 2009. doi:10.1016/j.bbapap.2008.12.019.

BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N.E; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008. doi:10.1002/jps.21210.

CAVALCANTI, M.; PORTO, T.; DEBARROSNETO, B.; LIMAFILHO, J.; PORTO, A.; PESSOAJR, A. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 2, p. 135–140, 2006. doi:10.1016/j.jchromb.2006.01.023.

CAVALCANTI, M.T.H; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G; BRANDI, I.V; PORTO, T.S; CONVERTI, A.; LIMA FILHO, J.L; PORTO, A.L.F; PESSOA, A. Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* Type A in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase PEG–phosphate system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, 9-10, p. 1771–1776, 2008. doi:10.1016/j.cep.2007.09.018.

CHAGAS, A.C. In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**, 2013. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.031.

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A.B.; MAJID, F.A.A. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. **Cancer letters**, v. 290, n. 2, p. 148–156, 2010. doi:10.1016/j.canlet.2009.08.001.

COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA JUNIOR, A.; TAMBOURGI, E. B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 2, p. 185–192, 2013. doi:10.1007/s00449-012-0774-5.

CYGLER, M.; MORT, J.S. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. **Biochimie**, v. 79, n. 11, p. 645–652, 1997. doi:10.1016/S0300-9084(97)83497-9.

DEVAKATE, R. V.; PATIL, V. V.; WAJE, S. S.; THORAT, B. N.; DEVAKATE, R.V; PATIL, V.V; WAJE, S.S; THORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. **Separation And Purification Technology**, v. 64, n. 3, p. 259–264, 2009. doi:10.1016/j.seppur.2008.09.012.

DOKO, M.B; BASSANI, V.; CASADEBAIG, J.; CAVAILLES, L.; JACOB, M. Preparation of proteolytic enzyme extracts from *Ananas comosus* L., Merr. fruit juice using semipermeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-

drying processes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 199–206, 1991. doi:10.1016/0378-5173(91)90272-P.

DOMINGUES, L.F.; GIGLIOTI, R.; FEITOSA, K.A.; FANTATTO, R.R.; RABELO, M.D.; SENA OLIVEIRA, M.C.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, G.P.; BARIONI JUNIOR, W.; SOUZA

FALABELLA, A. F. Debridement and wound bed preparation. **DERMATOLOGIC THERAPY**, v. 19, n. 6, p. 317–325, 2006.

FATIMA, S.; KHAN, R. H. Effect of polyethylene glycols on the function and structure of thiol proteases. **Journal of Biochemistry**, v. 142, n. 1, p. 65–72, 2007.

GODOI, P.H. **Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução em diferentes temperaturas e pH**. Campinas, 2007.

HALE, L.P.; GREER, P.K.; TRINH, C.T.; JAMES, C.L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 783–793, 2005. doi:10.1016/j.intimp.2004.12.007.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008. doi:10.1016/j.addr.2008.08.002.

HANCOCK, T. J.; HSU, J. T. Thermal stability studies of a globular protein in aqueous poly(ethylene glycol) by H-1 NMR. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 51, n. 4, p. 410–421, 1996.

HATTI-KAUL, R.. **Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols. Methods and protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2000. Online-Datei. ISBN 978-0-89603-541-6.

HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; LANG, H.; BERNDT, W. Isolation and properties of bromelin protease. **FEBS letters**, v. 2, n. 5, p. 278–280, 1969.

HERMANS, M.; TREADWELL, T. An Introduction to Wounds. In: PERCIVAL, S.; CUTTING, K. (Org.). **Microbiology of Wounds**: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-4200-7993-7, p. 83–134.

JIANG, J.; PRAUSNITZ, J.M. Molecular Thermodynamics for Protein Precipitation with a Polyelectrolyte. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 26, p. 5560–5569, 1999. doi:10.1021/jp990455e.

JIANG, B.; LARSON, J. C.; DRAPALA, P. W.; PÉREZ-LUNA, V. H.; KANG-MIELER, J. J.; BREY, E. M. Investigation of lysine acrylate containing poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels as wound dressings in normal and infected wounds. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 3, p. 668–676, 2012. doi:10.1002/jbm.b.31991.

JOHANSSON, G. Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems. In: JANSON, J.-C.; RYDÉN, L. (Org.). **Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications // Protein purification. Principles, high-resolution methods, and applications**. 2. ed., New York: Wiley, 1998. x, 695. ISBN 0471186260.

JOHANSSON, H.-O.; ISHII, M.; MINAGUTI, M.; FEITOSA, E.; PENNA, T.C.V.; PESSOA JR, A. Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly(acrylate) aqueous two-phase systems. **Separation And Purification Technology**, v. 62, n. 1, p. 166–174, 2008. doi:10.1016/j.seppur.2008.01.017.

JOHANSSON, H.-O.; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA JR., A.. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1178, 1-2, p. 145–153, 2008. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.071.

KÁLAL, J. Water sensitive chemically crosslinked gels. In: Finch, C. A. (Org.). **Chemistry and technology of water-soluble polymers**, New York: Plenum Press, 1983. xvi, 258. ISBN 0306412519.

KETNAWA, S.; RAWDKUEN, S.; CHAIWUT, P. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, 2-3, p. 205–211, 2010. doi:10.1016/j.bej.2010.08.012.

KHAN, R.H.; RASHEEDI, S.; HAQ, S.K. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. **Journal of biosciences**, v. 28, n. 6, p. 709–714, 2003.

KIM, J. O.; PARK, J. K.; KIM, J. H.; JIN, S. G.; YONG, C. S.; LI, D. X.; CHOI, J. Y.; WOO, J. S.; YOO, B. K.; LYOO, W. S.; KIM, J.-A.; CHOI, H.-G.. Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, 1-2, p. 79–86, 2008. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.03.021.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A.C.S.; TEIXEIRA, M.F.S.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the PEG/Phosphate Aqueous Two-Phase System. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1912–1915, 2012. doi:10.1590/S0100-40422012001000004.

KUNITZ, M. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor: Ii. General Properties. **The Journal of General Physiology**, v. 30, n. 4, p. 291–310, 1947. doi:10.1085/jgp.30.4.291.

LALANI, R.; LIU, L. Electrospun Zwitterionic Poly(Sulfobetaine Methacrylate) for Nonadherent, Superabsorbent, and Antimicrobial Wound Dressing Applications. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 6, p. 1853–1863, 2012. doi:10.1021/bm300345e.

LEE, W.; LEE, T.G.; KOH, WON-GUN. Grafting of Poly(acrylic acid) on the Poly(ethylene glycol) Hydrogel Using Surface-initiated Photopolymerization for Covalent Immobilization of Collagen. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1195–1200, 2007. Disponível em: <<http://www.cheric.org/research/tech/periodicals/view.php?seq=692524>>.

LIU, Shao Qiong; TAY, Richie; KHAN, Majad; RACHEL EE, Pui Lai; HEDRICK, James L.; YANG, Yi Yan. Synthetic hydrogels for controlled stem cell differentiation. **Soft Matter**, v. 6, n. 1, p. 67, 2009. doi:10.1039/b916705f.

MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1234–1245, 2001. doi:10.1007/PL00000936.

MAYERHOFF, Z.D.V.L; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 3, p. 217–223, 2004. doi:10.1016/j.bej.2003.09.003.

MAZZOLA, P.G.; LOPES, A.M.; HASMANN, F.A.; JOZALA, A.F.; PENNA, T.C. V.; MAGALHAES, P.O.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA JR, A. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 143–157, 2008. doi:10.1002/jctb.1794.

MORAWETZ, H.; HUGHES, W.L. The Interaction of Proteins with Synthetic Polyelectrolytes. I. Complexing of Bovine Serum Albumin. **Journal of Physical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 64–69, 1952. doi:10.1021/j150493a014.

MOSS, J. N.; FRAZIER, C. V.; MARTIN, G. J. Bromelains. The Pharmacology Of The Enzymes. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 145, p. 166–189, 1963.

MÜLLER, S.; MÄRZ, R.; SCHMOLZ, M.; DREWELOW, B.; ESCHMANN, K.; MEISER, P. Placebo-controlled Randomized Clinical Trial on the Immunomodulating Activities of Low- and High-Dose Bromelain after Oral Administration - New Evidence on the Antiinflammatory Mode of Action of Bromelain. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 199–204, 2013. doi:10.1002/ptr.4678.

MURACHI, T. Bromelain enzymes. **Methods in enzymology**, v. 45, p. 475–485, 1976.

MURACHI, T.; YAMAZAKI, M. Changes in conformation and enzymatic activity of stem bromelain in alkaline media. **Biochemistry**, v. 9, n. 9, p. 1935–1938, 1970.

NAVAPARA, R.D.; AVHAD, D.N.; RATHOD, V.K. Application of Response Surface Methodology for Optimization of Bromelain Extraction in Aqueous Two-Phase System. **Separation Science and Technology**, v. 46, n. 11, p. 1838–1847, 2011. doi:10.1080/01496395.2011.578101.

NOEL, M.; COMBES, D. Rhizomucor miehei lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, 2-3, p. 299–308, 2003.

OHTAKE, S.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 13, p. 1053–1073, 2011. doi:10.1016/j.addr.2011.06.011.

PARK, J.-S.; KIM, H.-A.; CHOI, J.-B.; GWON, H.-J.; SHIN, Y.-M.; LIM, Y.-M.; KHIL, M. S.; NHO, Y.-C.. Effects of annealing and the addition of PEG on the PVA based hydrogel by gamma ray. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 7, p. 857–860, 2012. doi:10.1016/j.radphyschem.2012.02.005.

RABELO, A.; TAMBOURGI, E.; PESSOA JR., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 61–68, 2004. doi:10.1016/j.jchromb.2004.03.029.

RAZZAK, M. T.; DARMAWAN, D.; ZAINUDDIN; SURKINO. Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 107–113, 2001. doi:10.1016/S0969-806X(01)00427-3.

RITONJA, A.; ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; Rawlings, N. D.; Turk, V.; Barrett, A. J. Stem Bromelain - Amino-Acid Sequence And Implications For Weak Binding Of Cystatin. **FEBS LETTERS**, v. 247, n. 2, p. 419–424, 1989.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J. Pineapple cysteine endopeptidases. **Methods in enzymology**, v. 244, p. 555–568, 1994.

SAARAI, A.; SEDLACEK, T.; KASPARKOVA, V.; KITANO, T.; SAHA, P. On the characterization of sodium alginate/gelatine-based hydrogels for wound dressing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 126, S1, p. E79, 2012. doi:10.1002/app.36590.

SALAS, C. E.; GOMES, M. T.R.; HERNANDEZ, M.; LOPES, M. T.P.; SALAS, CARLOS E.; GOMES, MARCO T.R; HERNANDEZ, MARTHA; LOPES, MIRIAM T.P. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2263–2269, 2008. doi:10.1016/j.phytochem.2008.05.016.

SARAVANAN, S.; REENA, J.A.; RAO, J.R.; MURUGESAN, T.; NAIR, B.U. Phase Equilibrium Compositions, Densities, and Viscosities of Aqueous Two-Phase

Poly(ethylene glycol) + Poly(acrylic acid) System at Various Temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, n. 4, p. 1246–1249, 2006. doi:10.1021/je050543u.

SELIGMAN, B. Bromelain: an anti-inflammatory agent. **Angiology**, v. 13, p. 508–510, 1962.

SHUNG, A. K.; BEHRAVESH, E.; JO, S.; MIKOS, A. G. Crosslinking Characteristics of and Cell Adhesion to an Injectable Poly(Propylene Fumarate-co-Ethylene Glycol) Hydrogel Using a Water-Soluble Crosslinking System. **Tissue Engineering**, v. 9, n. 2, p. 243–254, 2003. doi:10.1089/107632703764664710.

SINGER, A. J.; MCCLAIN, S. A.; TAIRA, B. R.; ROONEY, J.; STEINHAUFF, N.; ROSENBERG, L. Rapid and Selective Enzymatic Debridement of Porcine Comb Burns With Bromelain-Derived Debrase®: Acute-Phase Preservation of Noninjured Tissue and Zone of Stasis. **Journal of Burn Care & Research**, v. 31, n. 2, p. 304–309, 2010. doi:10.1097/BCR.0b013e3181d0f4d4.

SILVEIRA, E. **Purificação e Caracterização de Bromelina a Partir do Extrato Bruto de Ananas comosus por Adsorção em Leito Expandido**. Campinas, 2007.

SILVEIRA, E.; SOUZA, M. E.; SANTANA, J. C.C.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L.F.; TAMBOURGI, E. B. Expanded Bed Adsorption Of Bromelain (Ec 3.4.22.33) From Ananas Comosus Crude Extract. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 149–157, 2009.

SOARES, P.A.G; VAZ, A.F.M; CORREIA, M.T.S; PESSOA JR, A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 389–395, 2012. doi:10.1016/j.seppur.2012.06.042.

SONG, A.; RANE, A. A.; CHRISTMAN, K. L. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly(ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 41–50, 2012. doi:10.1016/j.actbio.2011.10.004.

SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice. **Transactions of the ASAE**, v. 43, n. 6, p. 1703–1708, 2000.

SUTTER, M.; SIEPMANN, J.; HENNINK, W. E.; JISKOOT, W. Recombinant gelatin hydrogels for the sustained release of proteins. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 3, p. 301–312, 2007. doi:10.1016/j.jconrel.2007.03.003.

TANG, Q.; SUN, X.; LI, Q.; LIN, J.; WU, J. Synthesis of polyacrylate/polyethylene glycol interpenetrating network hydrogel and its sorption for Fe³⁺ ion. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 3, p. 726–733, 2009. doi:10.1007/s10853-008-3173-1.

TAUSSIG, S. J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 191–203, 1988. doi:10.1016/0378-8741(88)90127-4.

TEMENOFF, J. S.; ATHANASIOU, K. A.; LEBARON, R. G.; MIKOS, A. G. Effect of poly(ethylene glycol) molecular weight on tensile and swelling properties of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 3, p. 429–437, 2002. doi:10.1002/jbm.1259.

TESSMAR, J. K.; GÖPFERICH, A. M. Customized PEG-Derived Copolymers for Tissue-Engineering Applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 23–39, 2007. doi:10.1002/mabi.200600096.

THATIPARTI, T. R.; SHOFFSTALL, A. J.; RECUM, H. A. VON. Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2335–2347, 2010. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.087.

UMESH HEBBAR, H.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4896–4902, 2008. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.038.

VALE, E. C. S. do. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, 2005. doi:10.1590/S0365-05962005000100003.

WALTER, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H. U.; Bergmeyer, J.; Grassl, M.; Masseyeff, R. F. (Org.). **Methods of enzymatic analysis**. 3. ed., Weinheim, Deerfield Beach, Fla: Verlag Chemie, 1986. xxii, 508. ISBN 0895732408, p. 270–277.

WICHTERLE, O.; LÍM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, v. 185, n. 4706, p. 117–118, 1960. doi:10.1038/185117a0.

WILLIAMS, P. D.; OZTOP, M. H.; MCCARTHY, M. J.; MCCARTHY, K. L.; LO, Y. M. Characterization of Water Distribution in Xanthan-Curdlan Hydrogel Complex Using Magnetic Resonance Imaging, Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry, Rheology, and Scanning Electron Microscopy. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. E472, 2011. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02227.x.

WILKINS, D. K.; GRIMSHAW, S. B.; RECEVEUR, V.; DOBSON, C. M.; JONES, J. A.; SMITH, L.J. Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques †. **Biochemistry**, v. 38, n. 50, p. 16424–16431, 1999. doi:10.1021/bi991765q.

WINNICK, T.; DAVIS, A. R.; GREENBERG, D. M. Physicochemical Properties Of The Proteolytic Enzyme From The Latex Of The Milkweed, *Asclepias Speciosa* Torr. Some Comparisons With Other Proteases. Iii. Kinetics Of The Heat Inactivation Of Papain, Bromelin, And Asclepain. **The Journal of general physiology**, v. 23, n. 3, p. 301–308, 1940.

WOLCOTT, R.; CUTTING, K.; DOWD, S.; PERCIVAL, S.. Types of Wounds and Infections. In: PERCIVAL, S.; CUTTING, K. (Org.). **Microbiology of Wounds**: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-4200-7993-7, p. 219–232.

WU, S.-Y.; HU, W.; ZHANG, B; LIU, S.; WANG, J.-M.; WANG., A.-M. Bromelain ameliorates the wound microenvironment and improves the healing of firearm wounds. **The Journal of surgical research**, v. 176, n. 2, p. 503–509, 2012. doi:10.1016/j.jss.2011.11.1027.

XUE, Y.; WU, C. Y.; BRANFORD-WHITE, C. J.; NING, X.; NIE, H. L.; ZHU, L. M. Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 63, 3-4, p. 188–193, 2010.

YOO, H-J; KIM, H-D. Synthesis and properties of waterborne polyurethane hydrogels for wound healing dressings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85, n. 2, p. 326–333, 2008. doi:10.1002/jbm.b.30950.

ZHANG, C.; LILLIE, R.; COTTER, J.; VAUGHAN, D. Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, n. 1, p. 107–112, 2005. doi:10.1016/j.chroma.2004.10.018.

ZIELENKIEWICZ, W.; SWIERZEWSKI, R.; ATTANASIO, F.; RIALDI, G. Thermochemical, volumetric and spectroscopic properties of lysozyme-poly(ethylene) glycol system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 83, n. 3, p. 587–595, 2006.