

INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PIAUI



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA
COM INCORPORAÇÃO DE PAPAÍNA**

DORYS MIRIAN SOARES TABATINGA SILVA

**Orientador: Prof^a. Dr^a. MARINA DE OLIVEIRA CARDOSO MACÊDO
Co-orientador: Prof. Dr. VICENTE GALBER FREITAS VIANA**

**FEVEREIRO DE 2017
TERESINA / PI**

Dorys Mirian Soares Tabatinga Silva

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA
COM INCORPORACAO DE PAPAÍNA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, como requisito para Defesa e obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Caracterização e Processamento de Materiais.

Orientador: Dr^a. MARINA DE OLIVEIRA CARDOSO MACÊDO
Co-orientador: Dr. VICENTE GALBER FREITAS VIANA

FEVEREIRO DE 2017
TERESINA / PI

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Dorys Mirian Soares Tabatinga

S586p Preparo e caracterização de membranas de Quitosana com incorporação de Papaína / Dorys Mirian Soares Tabatinga Silva. - 2017.
53 f.: il. color.

Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central Mestrado em Engenharia de Materiais, 2017.

Orientadora : Profa Dra. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo .

Coorientador : Prof Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

1. Membrana. 2. Quitosana. 3. Papaína e caracterização. I.Título.

CDD - 620.1

Elaborado por Sindya Santos Melo - CRB-3/1085



INISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
DIRETORIA DE ENSINO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS
Praça da Liberdade 1597 – Centro – Teresina – PI CEP: 64000 – 040
Fone: (86) 3215-5225 Fax: (86) 3215-5206 endereço eletrônico:
<http://ppgem.ifpi.edu.br/home>

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSONA COM INCORPORAÇÃO DA PAPAÍNA”

ALUNA: DORYS MIRIAN SOARES TABATINGA DA SILVA

DATA: 14 de fevereiro de 2017.

Este trabalho foi julgado adequado e aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí.

ASSINATURA NO ORIGINAL

Prof. Dr. Hudson Chagas dos Santos
Coordenador do PPG-EM/IFPI-Campus Teresina Central

COMISSÃO EXAMINADORA

ASSINATURA NO ORIGINAL

Profa. Dra. Mariana de Oliveira Cardoso de Macedo
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí
Orientadora

ASSINATURA NO ORIGINAL

Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí.
Coorientador

ASSINATURA NO ORIGINAL

Prof. Dr. Airton de Sá Brandim
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí.
Avaliador Interno

ASSINATURA NO ORIGINAL

Prof. Dr. Marcio Cleto Soares de Moura
Universidade Federal do Piauí
Avaliador Externo

Ao meu esposo Marcus, meus filhos, com amor, por me ter dispensado
compreensão e apoio durante o período da elaboração deste trabalho, a minha tia
Miriam sempre presente. A minha mãe e avó (in memória).

AGRADECIMENTOS

A meu Senhor Jesus Cristo autor e consumidor da minha fé. Meu amigo sempre presente nas horas difíceis, me oferecendo força e vontade de continuar rumo à realização dos meus sonhos.

A minha orientadora Dra. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo, por seu posicionamento firme quando necessário, pela dedicação e envolvimento no desenvolvimento do projeto passando sempre o conhecimento sem reserva, e pela contribuição inestimável para a formação do meu caráter acadêmico.

Ao meu co-orientador Dr. Vicente Galber Freitas Viana por ter me apresentado a possibilidade de participar da seleção desse programa e contribuir com apoio necessário para a realização desse projeto.

Ao Dr. Ayrton de Sá Brandim pelo envolvimento e dedicação no programa de pós-graduação e por suas palavras sempre acertivas, quando mais precisamos, e além de tudo pelo respeito dispensados de forma igualitária e admirável a todas as pessoas que tem a oportunidade de conviver com ele.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia dos Materiais – PPGEM e ao corpo docente pela disponibilidade ao longo do Mestrado.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Engenharia dos Materiais, que estiveram sempre dispostos a colaborar com a execução desse projeto: A Rosângela, exemplo de resignação e força; a Thiciane pelo exemplo de fé e amor ao próximo; a Luciana pelo exemplo de mulher sábia; ao Edmilson pelo seu jeito simples e encantador; a Josyane pela bondade eminente em seu ser. E aos demais colegas por terem feito parte desse processo.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq, Finep e FAPEPI.

“ Deus é o nosso refúgio e fortaleza, socorro bem presente na angústia”

Salmos 46:1

RESUMO

A busca por materiais inovadores que melhore e acelere o processo de cicatrização tem sido foco de pesquisas na atualidade. Entre estes apresentam destaque a quitosana devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo custo, além de ser encontrada em abundância na natureza. A papaína é uma enzima proteolítica complexa, de origem vegetal com ampla aplicação terapêutica, em especial na abordagem de feridas, em função do seu poder debridante e acelerador do crescimento tecidual. O estudo para a obtenção de uma membrana composta por quitosana e papaína, visa a potencialização dos efeitos já estudados anteriormente de cada um desses biomateriais isoladamente. Foram preparadas membranas de quitosana pura e quitosana com papaína a 10%, 20% e 30%, as mesmas foram caracterizadas por espectroscopia por infravermelho(IV), por microscopia eletrônica de varredura(MEV), por fluorescência de RX(FRX), por termogravimetria(TG), e por calorimetria exploratória diferencial(DSC)métodos: microestrutural, termogravimétricos e espectroscópicos. A membrana obtida foi caracterizada quantitativamente e qualitativamente. Com isso a obtenção desse novo material abre a possibilidade de futura utilização do mesmo na otimização do processo de cicatrização de feridas.

Palavras-chaves: Membrana, Quitosana, Papaína e caracterização.

ABSTRACT

The Search for Innovative materials That improve and accelerate the healing process has been the focus of research today. Among these have highlighted the Chitosan due to its biocompatibility, biodegradability, low toxicity and Budget, in addition to being found in abundance in nature. And papain proteolytic enzyme Complex of plant origin with the Broad Therapeutic Application, especially in the approach of wounds, in function of his debridement power and throttle tissue growth. Study for Obtaining A membrane composed of chitosan and papain, as a potentiating effects have previously studied Each hum these biomaterials alone. Were prepared pure Chitosan Chitosan Membranes and papain 10%, 20% and 30% depending same Were characterized by methods: microstructural, thermogravimetric and spectroscopic. A membrane was obtained with good microstructural aspect and characterized quantitatively and qualitatively. With one IT Getting In this new material opens up the possibility of future use do EVEN in optimizing the wound healing process.

Keywords: membrane , chitosan , papain and description.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fluxograma da obtenção quitina e quitosana.....	19
Figura 2- Estruturas da (a) quitina e (b) quitosana	20
Figura 3- Estrutura química da quitosana com x representando o grau de acetilação	21
Figura 4- Célula unitária ortorrômbica	22
Figura 5- Ilustra a célula unitária ortorrômbica da quitosana nas três projeções	22
Figura 6- Estrutura molecular da quitosana.....	23
Figura 7- Estrutura molecular da Papaína.....	25
Figura 8- Estrutura tridimensional da Papaína	26
Figura 9- Domínio L da papaína.....	26
Figura 10- Domínio R da papaína	27
Figura 11- Fases sequenciais do processo de cicatrização	29
Figura 12- Fluxograma do procedimento experimental	32
Figura 13- Membrana preparada de quitosana	35
Figura 14- Membrana preparada quitosana/papaína	36
Figura 15- Equipamento de Infravermelho	36
Figura 16 - Equipamento de Termogravimetria	37
Figura 17- Equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial	37
Figura 18-Equipamento de Microscopia Eletrônica de Varreduras	38
Figura 19- Espectro de Infravermelho da quitosana	40
Figura 20- Gráfico de comparação dos espectros de infravermelho da papaína da literatura (a) e (b) da papaína utilizada no presente trabalho.	41
Figura 21- Gráfico de espectro de infravermelho comparativo de papaína pura, quitosana pura e quitosana com papaína (10%, 20% e 30%)	42
Figura 22- Quitosana pura	43
Figura 23- Papaína pura	43

Figura 24- Quitosana com Papaína 10%.....	44
Figura 25- Quitosana com Papaína 20%.....	44
Figura 26- Quitosana com Papaína 30%.....	45
Figura 27- Gráfico percentual de pureza das membranas de quitosa e quitosana com papaína (10%, 20% e 30%)	Erro! Indicador não definido.
Figura 28 Análise termogravimétrica da membrana de quitosana pura comparada as proporções de papaína (10%, 20% e 30%)	46
Figura 29- Gráfico da curva de DSC da membrana de quitosana e quitosana com papaína (10%, 20% e 30%)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados fabricante da quitosana	33
Tabela 2- Dados fabricante da papaína	34
Tabela 3- Modos vibracionais da quitosana reportado na literatura comparado aos resultados	39
Tabela 4- Temperatura de degradação de membranas de quitosana e quitosana com papaína (10%, 20% e 30%)	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DSC- Calorimetria Exploratória Diferencial

FGF- Fator de Crescimento de Fibroblastos

GD- Grau de Desacetilação

GlcN- Glicosamina

IV- Infravermelho

MEV- Microscopia Eletrônica de Varreduras

PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pH- Pontecial hidrogeniônico

SH- Radical Sulfidril

TG- Termogravimetria

VEGF- Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

%- porcentagem

°C- grau Celsius

cm- centímetro

cPs- centipoises

g- gramas

h- horas

m- massa

mesh- mesh

mL- mililitros

min- minuto

μm- micrometro

mol- mol

nm- nanomêtro

ppm- partes por milhão

δ- sigma

T- temperatura

UFC- unidade de formação de colônias

Δ- variação

v- velocidade da onda

v- volume

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	15
2 - OBJETIVOS.....	18
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1- Quitosana	19
3.1.1 Cristalinidade da Quitosana	21
3.1.2 Propriedades físico químicas e biológicas da quitosana.....	23
3.2. Papaína.....	24
3.2.1 Propriedade e aplicação da papaína	278
3.3 Utilização da Quitosana e Papaina na Cicatrização	29
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1- Materiais	34
4.1.1- Quitosana	34
4.1.2- Papaína	34
4.2 - Preparações de Membranas	35
4.2.1- Quitosana	35
4.2.2- Papaína	35
4.3- Técnicas de caracterizações.....	37
4.3.1- Infravermelho (IV)	37
4.3.2- Termogravimétrica (TG)	37
4.3.3-Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	38
4.3.4- Microscopia Eletrônica de Varreduras (MEV).....	38
5- RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1- Análise de Infravermelho	40

5.2 Análise de Microscopia Eletrônica de Varreduras	43
5.3- Análises Térmicas.....	45
5.3.1- Termogravimetria(TG).....	45
5.3.2- Calorimetria Exploratoria Diferencial(DSC)	49
6- CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

1- INTRODUÇÃO

A engenharia de materiais envolve várias áreas da ciência, dentre elas destacam-se a química, biologia, nanotecnologias, engenharias, bioquímica e áreas biomédicas. A correlação destas áreas permite o conhecimento aprofundado do material em estudo, confere a este, propriedade e aplicação específica, tornando-o único e com utilidade definida.

Para Veiga (2012) um biomaterial deve ser biocompatível, atóxico, não cancerígeno, estável quimicamente. Além de apresentar: propriedades mecânicas, massa específica, formas adequadas e ser biofuncional. Diversos biomateriais vêm sendo usados nas áreas biomédicas, apresentando destaque a utilização dos polímeros, devido as propriedades apresentadas por esse material.

Segundo Alvarado (2012) os polímeros naturais e/ou sintéticos estão sendo usados na fabricação de membrana. Por apresentarem características adequadas para esse fim, como é o caso da quitosana, devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo custo, além de ser encontrada em abundância na natureza.

Os produtos da degradação enzimática da quitosana, os oligômeros N-acetil D glicosamina, apresentam propriedades importantes na resolução do processo cicatricial, como ação fungicida, bactericida e hemostática. Além de serem biodegradáveis, bioabsorvíveis, possuem excelente capacidade de formarem filmes em soluções ácidas diluídas, que apresentam flexibilidade e resistência mecânica (Dallan, 2015; Silveira, 2013).

A quitosana é um biopolímero catiônico, quando em meio ácido diluído. Essa apresenta grupos amino livres, que na presença de meio ácido diluído apresenta carga positiva. Essa propriedade confere a quitosana a capacidade de ligar-se a outros materiais, como é o caso da papaína, enzima carregada negativamente (Dallan, 2015; Goulart, 2006; Lima, 2006).

A papaína é uma enzima proteolítica (hidrólise 3) extraída das folhas e frutos não maduros do mamão *Carica papaya Linné* (ZULLI, 2007). Esta enzima vem sendo usada desde tempos remotos na cicatrização de feridas de difícil resolução.

A junção da quitosana e da papaína, apresenta-se como uma possibilidade de otimizar as propriedades desses materiais em especial a função bactericida, além de permitir a diminuição da massa molar da quitosana.

O presente trabalho visa a utilização da quitosana e da papaína para a preparação de membranas, tendo em vista que ambas apresentam características adequadas para esse fim.

As membranas de quitosana com papaína foram preparadas e caracterizadas com o intuito de utilização futura em organismos vivos, para o reparo de feridas. Considerando que tanto a quitosana como a papaína são biomateriais que apresentam biocompatibilidade e alto potencial cicatrizante.

2 - OBJETIVOS

➤ *Objetivo Geral*

- Preparar e caracterizar membranas poliméricas de quitosana com papaína para a aplicação como biomaterial.

➤ *Objetivos Específicos*

- Preparar membranas de quitosana com papaína nas proporções 10, 20 e 30%.
- Identificar as propriedades das membranas de quitosana com papaína acima citadas.

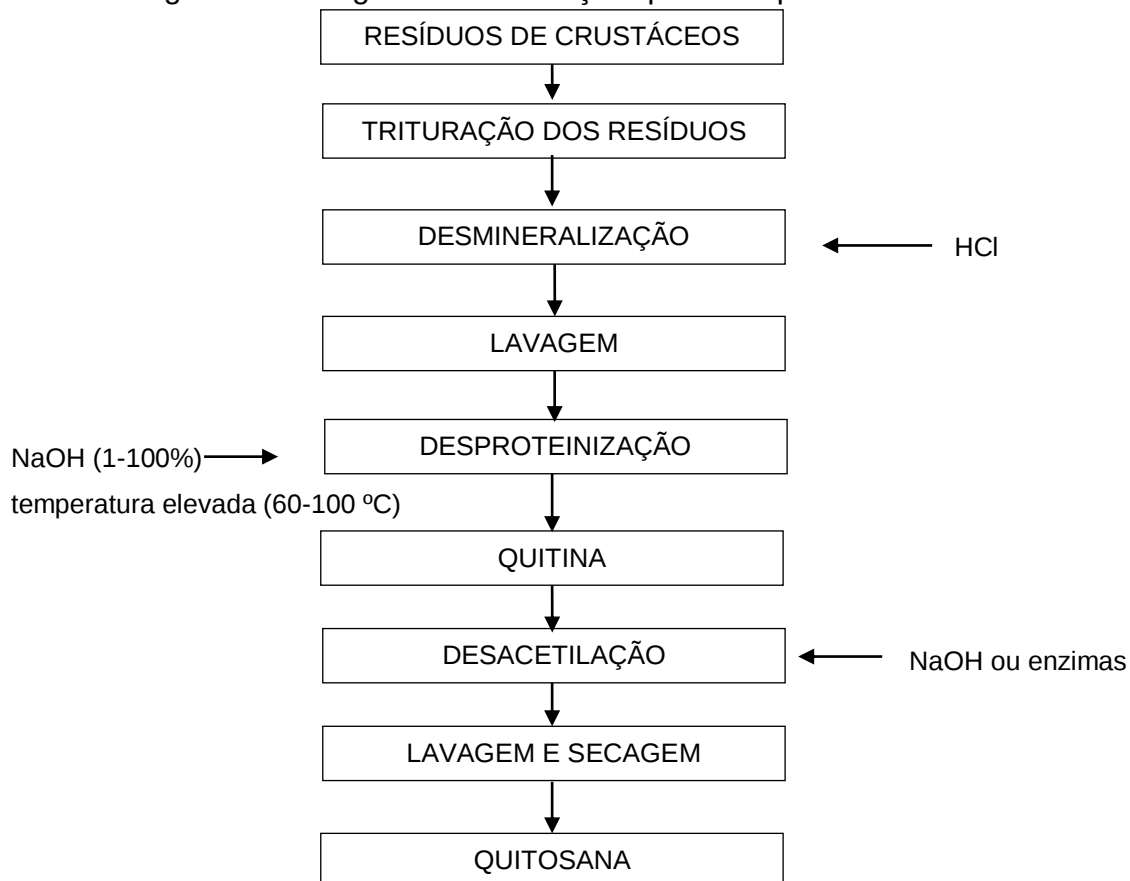
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Quitosana

A quitosana é um dos materiais naturais renováveis mais abundantes no mundo, sendo de grande interesse na área de biomateriais. Esse material é obtido do processamento de carapaças de caranguejos, camarões e lagostas ,Figura 1, representando de 20 a 50 % em massa (seca) dos subprodutos destes animais.

Na atualidade a comercialização da quitosana é ampla, anualmente milhões de toneladas no mundo, portanto, esse biopolímero representa uma fonte de baixo custo, além de amplamente disponível na natureza, em muitos casos considerado poluente, por ser resíduo da indústria pesqueira. A sua reutilização é importante tanto do ponto de vista econômico como ambiental (SILVEIRA, 2013; AZEVEDO et al., 2007; ROBERTS, 1992).

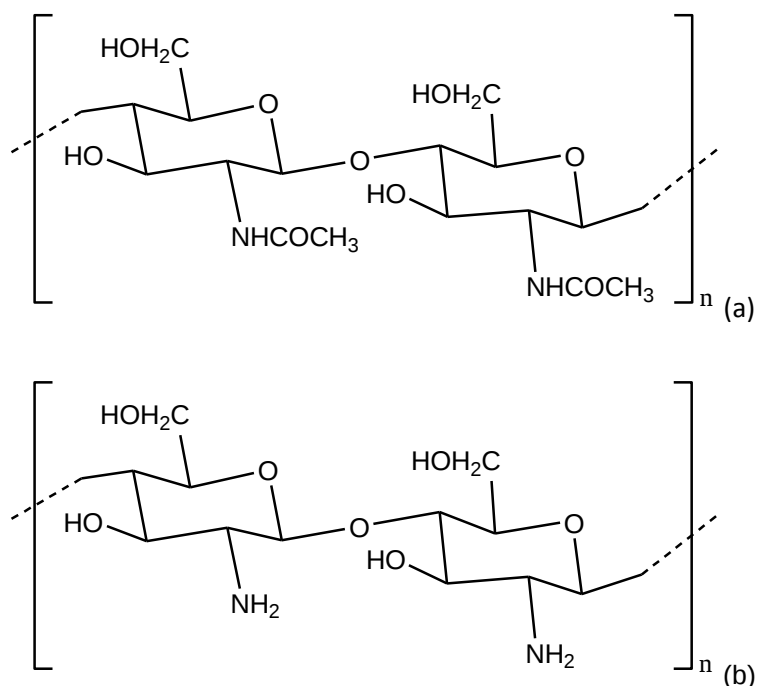
Figura 1- Fluxograma da obtenção quitina e quitosana



Fonte: MONTEIRO, 2000.

A quitosana é um material resultante da desacetilação da quitina, sua formula estrutural consiste de um copolímero de N-acetil glicosamina (β -(1-4)2 – acetamido-2-desoxi-D-glicose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose) (Figura 2). A proporção que as ligações N-acetil da quitina são rompidas formando D-glicosamina, ou seja, o grau de desacetilação (GD) se torna maior que 50 %, a quitina torna-se solúvel em meio aquoso e o polímero passa a ser denominado quitosana e geralmente apresenta o (GD) entre 70% a 95% com massa molar de 104 a 106 (FERNANDES, 2009; VEIGA, 2012).

Figura 2- Estruturas da (a) quitina e (b) quitosana



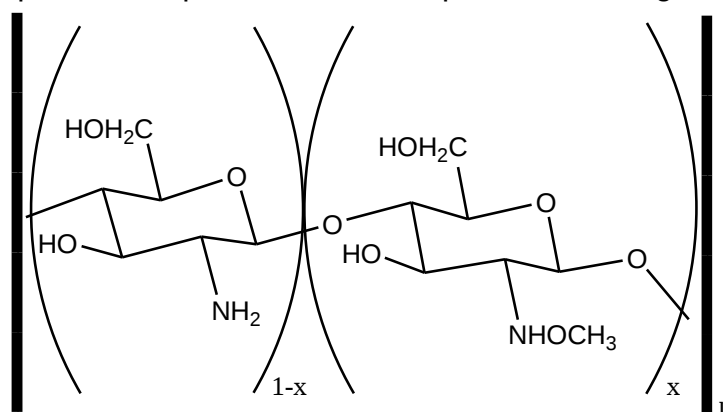
Fonte: KUMAR, 2000.

As propriedades químicas da quitosana conferem a ela características próprias e que Segundo Craveiro e Carneiro (2000) permite a sua utilização em diversos fins, por exemplo, na área industrial, como purificador de água residual, estabilizante de gorduras em preparação alimentícia, de frutas e verduras perecíveis, empacotamento de alimentos, em aditivos para cosméticos; na área biomédica pode atuar como agente de imobilização de micro-organismos e ainda sob a forma de filmes de recobrimento (membranas), soluções coloidais e esponjas. A membrana de quitosana apresenta destaque por apresentar boa resistência mecânica e permeabilidade seletiva.

O grau de desacetilação(GD) da quitosana pode ser medido por diferentes técnicas, tais como: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ou de carbono, espectroscopia de UV-Visível ou de infravermelho, titulação potenciométrica, análise elementar e dicroísmo circular (CODOY, 2013).

A quitina e a quitosana possuem estruturas similares, exceto pela substituição do grupo acetoamido (NHCOCH_3) na posição 2 do anel glicopiranosídeo por grupos amino (NH_2), conforme figura 3 (Dallan, 2015; Veiga, 2012; Lima, 2006).

Figura 3- Estrutura química da quitosana com x representando o grau de acetilação



Fonte: LIMA, 2006.

A N-desacetilação da quitosana é realizada com uso de solução alcalinas, durante a reação os grupamentos acetoamidos ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos aminos ($-\text{NH}_2$) dando origem a quitosana (Silveira, 2013).

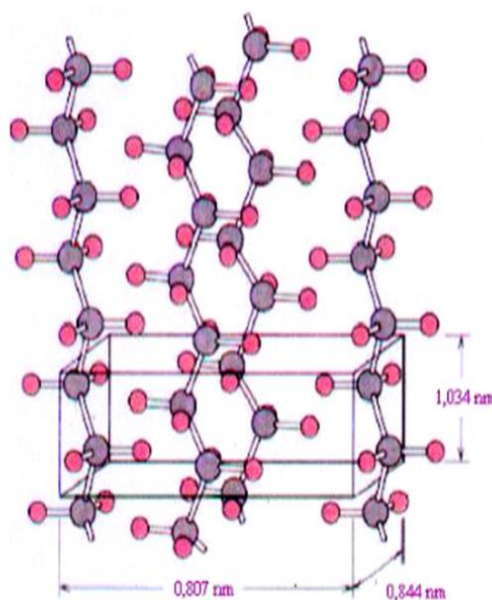
O polímero é insolúvel em água, ácidos concentrados, alcolis, álcool e acetona, sendo solúvel em ácidos com potencial hidrogeniônico- pH da solução menor que 6, para que ocorra a dissolução do polímero é necessário que seja mantida em agitação constante por um período de tempo (Dallan, 2015).

3.1.1 Cristalinidade da Quitosana

A cristalinidade da quitosana depende do grau de desacetilação(GD) e do processo de obtenção do polímero. No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. A literatura reporta que existem quatro formas polimorfas do polímero, três hidratadas que são conhecidas como quitosana de tendão e uma anidra (Fernandes, 2009). A quitosana de tendão é a forma que se encontra disponível

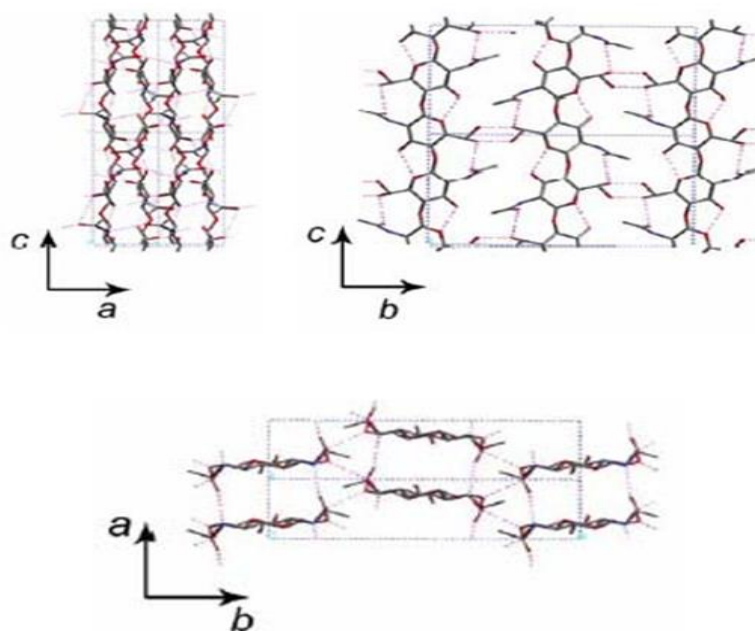
para comercialização. É composta por quatro cadeias de quitosana, na difração de raios-X é observado uma célula unitária ortorrômbica ($P2_12_12_1$), com parâmetro de rede $a = 0,896 \text{ nm}$; $b = 1,697 \text{ nm}$; $c = 1,034 \text{ nm}$, , célula unitária ortorrômbica Figura 4, célula unitária nas três projeções Figura 5 (Okuiama et al., 2000).

Figura 4– Célula unitária ortorrômbica



Fonte: DERMARQUETE, 2001.

Figura 5- A célula unitária ortorrômbica da quitosana nas três projeções



Fonte: RINAUDO, 2006.

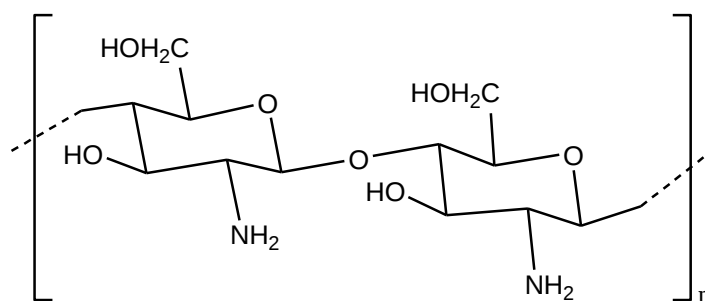
A presença ligações de hidrogênios intra e inter-moleculares nas moléculas de quitosanas conferem ao polímero caráter semi-cristalino e o par de elétrons livres no nitrogênio tem a capacidade de formar complexos (Rinaldo, 2006; Torodovic, 2002).

3.1.2 Propriedades físico químicas e biológicas da quitosana

O grau de desacetilação define o conteúdo médio de unidades de glicosamina (GlcN) nas cadeias da quitosana. Esse parâmetro é capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do polímero. Alterando as propriedades da quitosana, como, hidrofobia, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes de entrecruzamento, solubilidade e viscosidade de suas soluções (Silveira, 2013).

Este polímero apresenta três grupos funcionais, um grupo amino na posição C(2) e dois grupos hidroxila, uma hidroxila na posição C(3) e outra na posição C(6) respectivamente. Tendo o grupo amino como as hidroxilas podem ser protonados, a fim de melhorar sua solubilidade Figura 6.

Figura 6- Estrutura molecular da quitosana



Fonte: KUMAR, 2000.

De acordo com Goulart (2006) a quitosana é um bom complexante de metais pesados e essa propriedade permite a sua utilização na indústria alimentícia, purificação de água e nas áreas biomédicas. O grupo aminos livre na presença de

soluções ácidas diluídas podem adquirir carga positiva, conferindo a quitosana propriedades específicas. A quitosana é um bom agente foliculante e coagulante, devido à alta densidade do grupo amino livre que permite ligar-se com corantes, coloides, polímeros e com enzimas proteolíticas, como é o caso da papaína Goulart (2006).

Os oligômeros N-acetil D glicosamina, que são produtos da degradação enzimática da quitosana, apresentam propriedades importantes na resolução do processo cicatricial, com ação fungicida, bactericida e hemostática. Além de serem biodegradáveis, bioabsorvíveis, possuem excelente capacidade de formarem filmes em soluções ácidas diluídas, que apresentam flexibilidade e resistência mecânica (Dallan, 2015; Silveira, 2013).

3.2. Papaína

A papaína é uma enzima proteolítica extraída do látex presente nas folhas e frutos verdes do mamão (*carica papaya linné*), utilizada na indústria têxtil, indústria de borracha, laboratórios bioquímicos e bacteriológicos. Na indústria de alimentos possui uma ampla utilização, devido a sua ação proteolítica, tendo como principais aplicações, a clarificação de cerveja, o amaciamento de carnes e o processamento de couro em curtumes (Ferreira, 2005; Goulart, 2006).

O látex do mamão não maduro é utilizado há muito tempo por tribos da América, África, e ilhas do Caribe para a cicatrização de feridas. (Pieper e Caliri, 2003) relatam a diversificada utilização da papaína em vários países, inclusive no Brasil. A utilização da papaína no Brasil tem crescido muito nas últimas décadas, sendo foco de interesse dos profissionais da saúde, em especial os que trabalham com a abordagem de feridas.

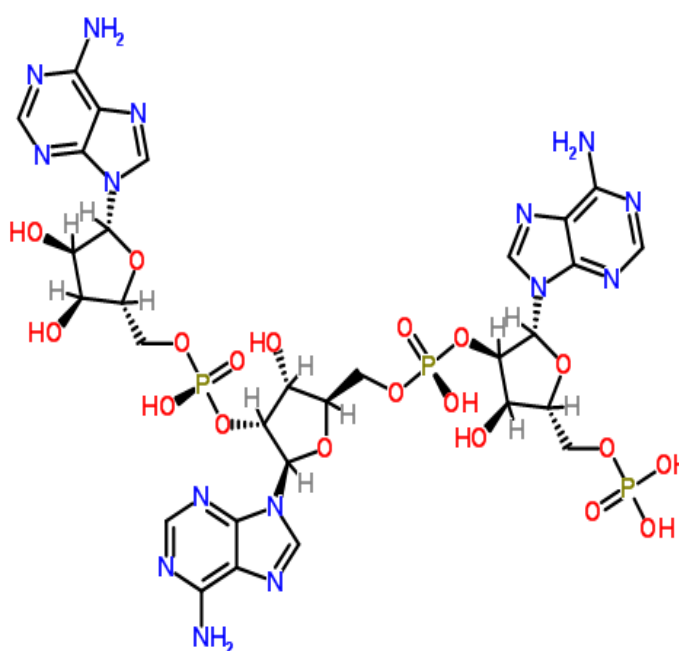
O látex do papaia é um fluido tixotrópico, com uma aparência leitosa, que contém cerca de 15% de matéria seca. 40% dessa matéria são constituídos por enzimas, principalmente cisteínas endopeptidases (Azarcan et al, 2003). Comercialmente a papaína purificada é encontrada sob a forma de um pó higroscópico, capaz de absorver a umidade do ar. Possui coloração que vai do branco ao amarelo claro e odor desagradável (Capucho, 2007).

A enzima pode ser mantida em solução de NaCl a 4 °C sem a perda da atividade. Possui sua faixa de estabilidade entre 30 °C a 75 °C, com temperatura de

atividade ótima em torno de 60 °C, e faixa de pH de 3,0 a 9,5 com pH ótimo em 6,5 (Capucho, 2007). As cisteínas, classe de enzimas que a papaína faz parte, formam ligações tioester, entre os grupamentos ascila do substrato e grupamento sulfidrilico de um resíduo específico de cisteína, no grupo ativo da enzima (Capucho, 2007).

A Figura 7 representa a estrutura molecular da papaína ($C_{30}H_{38}N_{15}O_{19}P_3$) obtida do banco de dados ChemSpider (base de dados da Royal Society of Chemical).

Figura 7- Estrutura molecular da Papaína



Fonte: ChemSpider

A molécula da papaína contém 7 resíduos de cisteína, 6 realizam 3 ligações dissulfeto, enquanto a cisteína-25 (Cys-25) está envolvida no sítio catalítico (Cabral, 2005). Os resíduos Cys-25 (azul) encontram-se em um domínio, já os resíduos His-159 (vermelho), estão no domínio oposto ao da Cys-25, demonstrado na Figura 8.

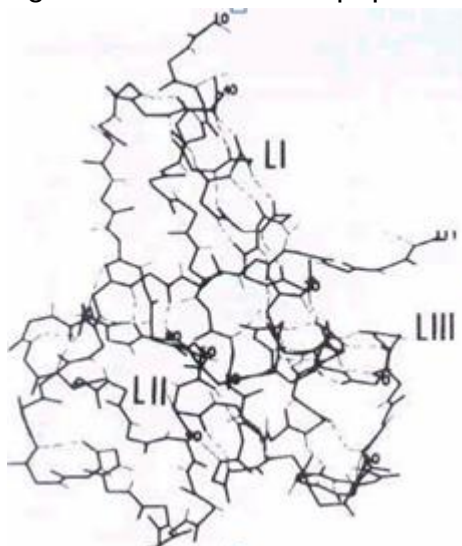
Figura 8- Estrutura tridimensional da Papaína



Fonte: CABRAL, 2005.

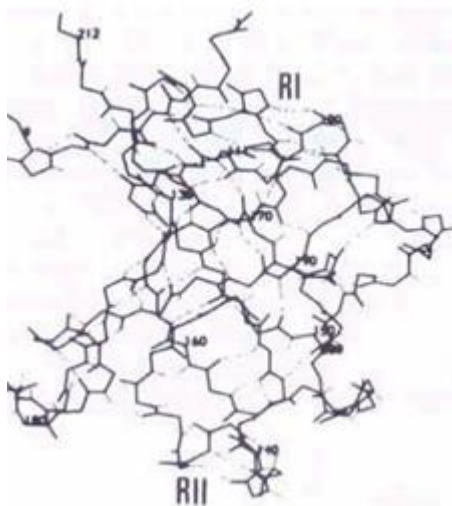
A papaína é composta por uma cadeia polipeptídica com 212 resíduos de aminoácidos, possui massa molar de 23.406 g/mol, que é dobrada para formar dois domínios L e R, delimitando uma fenda dentro da qual o substrato pode ligar-se, demonstrados nas Figuras 9 e 10 respectivamente Storer e Ménard, 1994. O domínio L apresenta estrutura secundária de α -hélice e o R esta principalmente na conformação β -folha-anti-paralela (Zulli, 2007). Sua forma é elipsoidal com 5,0 x 3,7 x 3,7 nm e massa molar de 23.350 g/mol (Ferreira, 2005).

Figura 9- Domínio L da papaína



Fonte: ZULLI, 2007.

Figura 10- Domínio R da papaína



Fonte: ZULLI, 2007.

O Sítio ativo da enzima está entre os domínios L e R, constituído pelos resíduos Cys-25, His-159 e Asp-158. O cys é o sulfidril essencial que na enzima ativa está livre, já os outros resíduos de cisteína formam pontes de sulfeto que estabilizam a conformação tridimensional da molécula (ZULLI, 2007; ZHUANG e BUTTERFIELD, 1991).

3.2.1 Propriedades e aplicações da papaína

A papaína é uma enzima complexa de origem vegetal com ampla aplicação terapêutica, age em todas as fases do processo inflamatório, em especial na fase proliferativa, em função do seu poder de acelerar o crescimento tecidual. Sua ação proteolítica age de forma eficaz no debridamento químico provoca uma dissociação importante de proteínas em moléculas mais simples e em aminoácidos.

Possui importante ação anti-inflamatória, age nos tecidos necróticos e contaminados por micro-organismo, provoca a liquefação e remoção da secreção purulenta, facilitando e encurtando o processo de cicatrização de feridas. Age ainda na cicatrização por segunda intenção, facilitando a contração e aproximação dos bordos da ferida (Ferreira, 2007).

Rocha et al., (2015) relatam que a larga utilização da papaína se dá por diversos fatores, entre eles, seu baixo custo, não provoca efeitos colaterais, facilidade de aplicação, e sua ação similar a debridantes químicos autolíticos.

O poder de debridamento químico confere ao biomaterial a possibilidade de sua utilização em qualquer fase do processo de cicatrização e nos diversos acometimentos patológicos, incluindo os crônicos, como pé diabético, úlceras de pressão, insuficiência circulatoria venosa e arterial, além de apresentar efeito seletivo e eficaz na lise dos tecidos mortos, sem atingir os tecidos íntegros adjacentes, previne ainda a proliferação de micro-organismo, os quais são responsáveis por infectar a ferida (Rocha, 2015; Capucho, 2007, Tiras et al., 2005).

Uma das propriedades mais surpreendente da papaína é a sua resistência a temperaturas elevadas quando em contato com solventes orgânicos (Aparecida, 1994) devido, principalmente à manutenção da estrutura ativa em função das pontes dissulfeto presentes nas cisteínas (Capucho, 2007).

Lopes (2005) relata que a papaína é eficaz e segura quando utilizada como promotor de absorção cutânea. O mecanismo provável da ação da enzima na camada córnea seria a competição entre a enzima e a transglutaminase, enzima responsável pela formação do envelope cornificado em torno dos corneócitos.

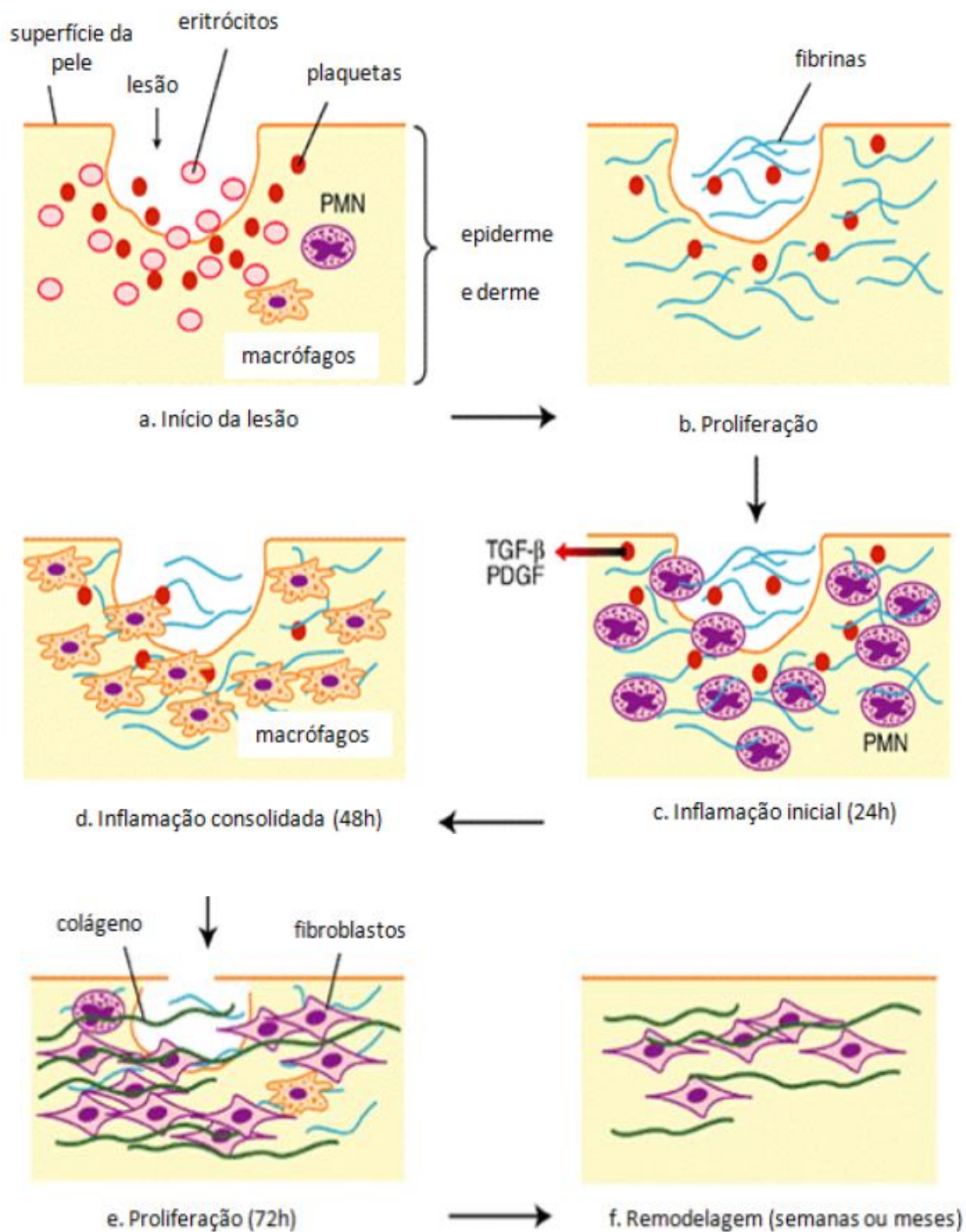
Conforme Goulart (2006) a papaína facilita a limpeza da ferida, tecido necrosado e secreções. Além de acelerar o processo de regeneração tecidual de forma organizada através do alinhamento das fibras de colágeno, reduzindo a formação de quelóides e cicatrizes hipertróficas.

3.3 Utilização da Quitosana e Papaina na Cicatrização

O processo cicatricial é especializado, envolve várias células residentes (queratinócitos, endoteliais, fibroblastos e células nervosa), células migratórias (leucócitos), mediadores de natureza lípidica (prostaglandinas, leucotrienos, fatores de agregação plaquetária) e proteínas como as citocinas (Neto et al., 2015).

A cicatrização tem início imediatamente após a lesão tecidual e envolve uma sequência de eventos, que são divididos didaticamente em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, demonstrada na Figura 11. Para uma cicatrização adequada, as fases devem ocorrer de maneira sincronizada e equilibrada (Santana, 2015; Greaves et al, 2013; Mendonça, 2009).

Figura 11- Fases sequenciais do processo de cicatrização



Fonte: BEANES et al., 2003.

O início do processo de cicatrização é marcado pelo tamponamento dos vasos, que ocorre logo após a lesão. Em seguida, a vasoconstrição como resposta inicial, seguida por uma sequência de eventos que inicia com a deposição de

plaquetas e posterior recrutamento de novas células. As plaquetas são essenciais à formação do tampão hemostático (Santana, 2015).

As plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sanguínea, como o colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação (Santana, 2015; Souto, 2005).

. A reação inflamatória dura entre 48 a 72 h, é mediada por meio de fatores de crescimento e citocinas, que induzem o recrutamento de diferentes tipos de células para o sítio da ferida. Com a ativação de receptores específicos, os mediadores iniciam mecanismos intracelulares como a liberação de citocinas, que favorecem a migração e a proliferação célula (Bajay, 2001; Balbino et al., 2005).

As plaquetas, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos liberam diversos fatores de crescimento e diversas proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastinas, importantes para o processo de cicatrização (Bajay, 2001; Balbino et al., 2005).

Os macrófagos degradam e removem os componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, proteoglicanos e elastina, além de produzirem o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), estimulam a formação do tecido de granulação (Genaro, 2013).

Para Kaneko et al., (2008) a ação enzimática seletiva da papaína pelo tecido lesado, ocorre devido à presença de um radical sulfidril (SH), que pertence ao aminoácido cisteína. O tecido íntegro não é degradado, pois apresenta a antitripsina, uma globulina humana que inativa a ação das proteases e que não está presente no tecido desvitalizado.

De acordo com Balbino et al.(2005) a fase proliferativa é marcada pela grande migração e ativação dos fibroblastos. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação, que após sofrerem influencia dos fatores de crescimento e demais mediadores derivados em especial dos macrófagos. São ativados e migram das margens da ferida para o centro da ferida.

Em decorrência do aumento do número de fibroblastos e consequente produção de colágeno, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo forte e elástico (Bugni, 2014). Nessa fase ocorre a angiogenese,

fenômeno fundamental, que permite a troca de gases e nutrição das células metabolicamente ativas (Balbino, 2005).

Por volta do décimo dia, inicia-se a fase de remodelamento, nesta o leito da ferida encontra-se totalmente preenchido pelo tecido de granulação emaranhado pela nova rede linfática em expansão (Balbino, 2005).

Nessa fase ocorre a deposição de colágeno e a maioria das células presentes nas fases anteriores desaparecem, ocorre apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando finalmente a cicatriz. Esse processo ocorre lentamente, levando meses ou até anos. Mesmo após esse tempo a cicatriz cultanea madura, possui apenas 70% da resistência da pele normal (Balbino, 2005).

Segundo Bugni (2014) o processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. A princípio a orientação é feita de forma aleatória e desorganizada, são orientadas pela fibronectina e orientação e direção da tensão aplicada ao tecido cicatricial.

As novas fibras de colágeno são digeridas pela collagenase, re-sintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes (Pereira, 2008; Shingel, 2008).

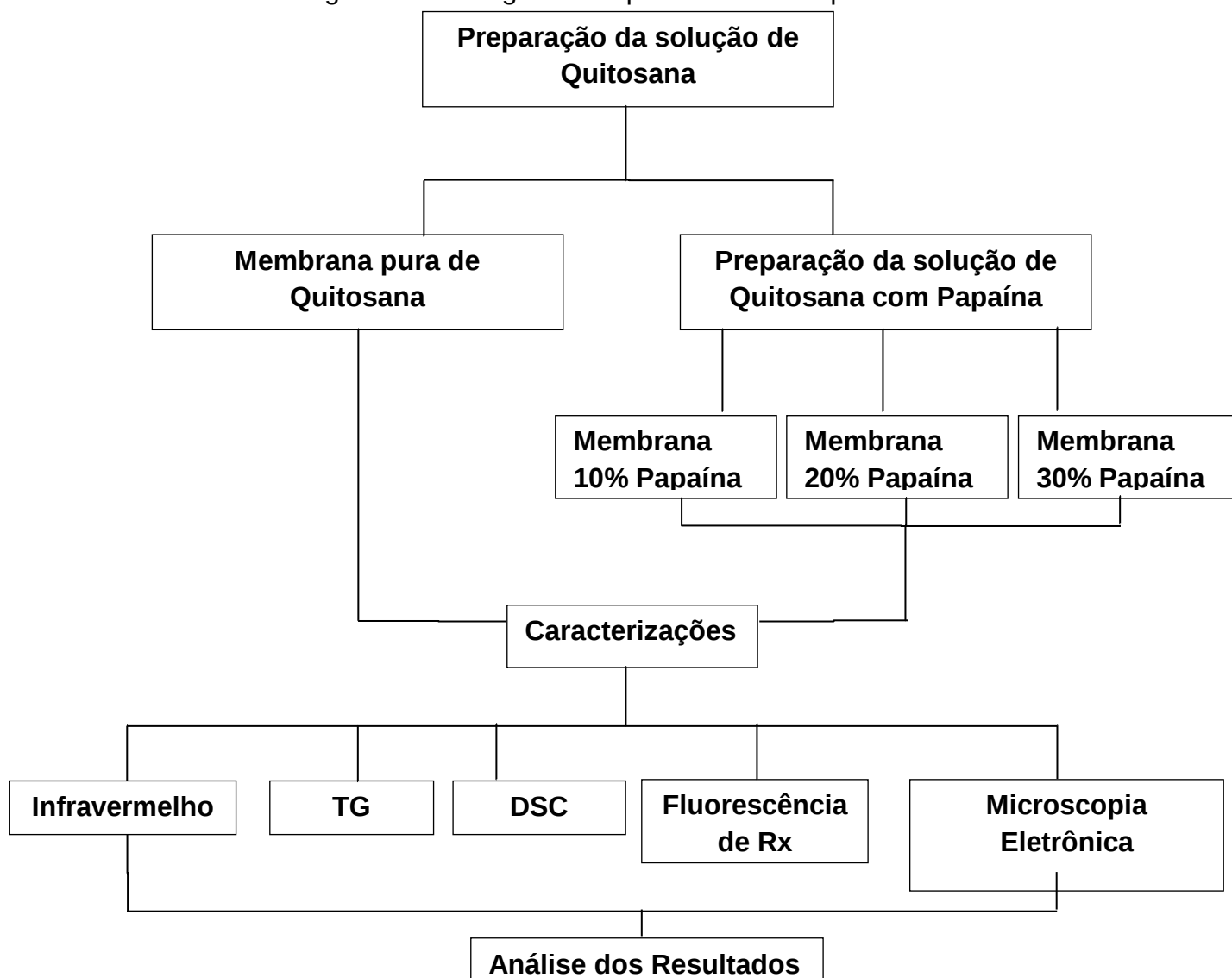
Diversos fatores locais ou sistêmicos, internos e/ou externos podem interferir e até mesmo acelerar uma ou mais fases do processo de cicatrização, entre os fatores externos temos alguns biomateriais, apresentando destaque para esse fim a quitosana e a papaína que aceleram e melhoram o processo cicatricial.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

No fluxograma abaixo (Figura 12) está contida de uma forma geral, o procedimento utilizado na metodologia.

As análises foram realizadas no Laboratório do Programa de Engenharia de Materiais do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí.

Figura 12- Fluxograma do procedimento experimental



4.1- Materiais

4.1.1- Quitosana

O material de quitosana foi adquirido do fabricante POLYMAR INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA, material em pó de Lote: QP051214. Abaixo Tabela 1 com os dados do certificado de análise.

Tabela 1- Dados fabricante da quitosana

	TESTE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
01	Identificação	Conforme prescrito	De acordo
02	Aparência	Pó de cor creme e odor característico	De acordo
03	Aspecto da solução em ác. Acético a 1%	Cor variando de amarelo a creme	De acordo
04	Densidade aparente	Informativo	0,36 g/ml
05	Granulometria	95% passa a 80 mesh	De acordo
06	Perda por dessecação	10,0% máx.	7,0%
07	Cinzas totais	2,0% máx.	0,89%
08	pH	7,0-9,0	8,10
09	Viscosidade	<200 cPs	1,95 cPs a 20 °C, LVt 31, torque de 11,7%
10	Grau de desacetilação	85,0% min.	86,7%

Fonte: fabricante POLYMAR

4.1.2- Papaína

A papaína utilizada é de origem Indiana de Lote: 141226624E do fabricante FAGRON e a parte utilizada é o fruto. A seguir Tabela 2 com os dados de análises do controle de qualidade.

Tabela 2- Dados fabricante da papaína

Ensaio	Especificação	Resultado
Descrição	Pó amorfo Branco à Castanho Claro	Pó Amorfo Branco
Solubilidade	Solúvel em Água (a Solução e Inicialmente Incolor a Amarelo Claro e mais ou Menos Opalescente)	Conforme
Solubilidade	Praticamente Insolúvel em Álcool	Conforme
Solubilidade	Praticamente Insolúvel em Clorofórmio	Conforme
Solubilidade	Praticamente Insolúvel em Éter	Conforme
Ph	4,8 - 6,2 (solução 2% em água)	6,11
Perda Por Dessecação	Máximo: 7% (60 °c/A Vácuo/4 Horas)	3,27%
Atividade Proteolítica	Mínimo: 6000 U/mg	6102 U/mg
Microbiologia	Contagem Total de Bactérias: Máximo 1000 UFC/g	< 1000 UFC/g
Microbiologia	Escherichia Coli: Ausente	Ausente
Microbiologia	Salmonella: Ausente	Ausente
Microbiologia	Bolores e Leveduras: Máximo 100 UFC/g	< 10 UFC/g
Densidade Aparente	Informativo (sem compactação)	0,57 g/mL

Fonte: fabricante FAGRON

4.2 - Preparações de Membranas

4.2.1- Membranas de quitosana (QUI-PURA)

A quitosana em pó foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético (CH_3COOH) 2 % v/v sob agitação constante 24 h, para obtenção da solução de 1,5% m/v do polímero. Após este momento a solução foi filtrada, sendo este procedimento realizado em duas etapas. Na primeira etapa foi utilizado um filtro com tela de nylon a fim de eliminar resíduos sólidos derivados do processo de obtenção da quitosana. Na segunda etapa foi utilizado um filtro *Milex Millipore®* com diâmetro de poros de 41 μm . Para filtrar a solução, a mesma foi colocada em repouso para eliminar as bolhas. Um volume de 27 mL da solução de quitosana foi adicionado às placas de Petri. Em seguidas as membranas foram submetidas a estiramento e secagem em temperatura ambiente, por 24 h. As placas de Petri foram colocadas em estufa a 50 °C por período de 24 h para evaporação do solvente. Ao serem retiradas da estufa, às membranas formadas foram colocadas em solução aquosa

de NaOH a 5 % por 2 h para neutralizar as mesmas, em seguida estas foram lavadas com água destilada em abundância para remoção dos resíduos de sal. Em seguidas as membranas foram submetidas a estiramento e secagem em temperatura ambiente, por 24 h (Figura 13).

Figura 13- Membrana preparada de quitosana



Fonte: próprio autor.

4.2.2- Membrana de Quitosana com Papaína(Qui-Pa)

Preparou-se 300 mL da solução de quitosana e separada em 3 porções de 100 ml, a cada 100 ml da solução de quitosana, foi acrescido 0,010 g; 0,020 g e 0,030 g respectivamente, essas soluções foram submetidas a 2 h sobre agitação constante. Um volume de 27 mL da solução de quitosana com papaína nas respectivas proporções foram então colocadas às placas de Petri e foram colocadas em estufa a 50 °C por período de 24 h para evaporação do solvente, conforme Figura 14. Ao serem retiradas da estufa, às membranas formadas foram colocadas em solução aquosa de NaOH a 5% por 2 h para neutralizar as mesmas, em seguida estas foram lavadas com água destilada em abundância para remoção dos resíduos de sal. Em seguidas as membranas foram submetidas a estiramento e secagem em temperatura ambiente, por 24 h.

Figura 14- Membrana preparada de Quitosana com papaína



Fonte: próprio autor.

4.3- Técnicas de caracterizações

4.3.1- Infravermelho (IV)

As membranas de quitosana e quitosana com papaína foram caracterizadas utilizando o Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier

(FT-IR). Com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr. Os espectros de absorção na região do infra-vermelho foram obtidos em um espectrômetro da marca SHIMADZU de modelo IRAffinity-1 (Figura 15).

Figura 15- Equipamento de Infravermelho



Fonte: próprio autor.

4.3.2- Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica mede a variação de massa da amostra em relação a temperatura e/ou tempo, sob uma programação controlada. O equipamento usado para essa análise foi da marca SHIMADZU e modelo TGA-51 (Figura 16). As condições da análise foram: faixa de temperatura de ensaio de 25 °C

a 650 °C, taxa de aquecimento 10 °C. min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹ em porta amostra de platina

Figura 16 - Equipamento de Termogravimetria



Fonte: próprio autor.

4.3.3- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para quantificar a energia envolvida nas reações, utilizou-se a Calorimetria Exploratória Diferencial, da marca SHIMADZU e modelo DSC-60 Plus (Figura 17). As amostras da membrana de quitosana pura e com papaína foram submetidas a ensaios de acordo com as seguintes condições: faixa de temperatura de ensaio de 25 °C a 650 °C, taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹. Para a realização do ensaio foi utilizado porta amostra de alumínio.

Figura 17- Equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial



Fonte: próprio autor.

4.3.4- Microscopia Eletrônica de Varreduras (MEV)

Para caracterização microestrutural das membranas de quitosana pura e de quitosana com papaína via microscopia eletrônica de varredura foi utilizado o Microscópio da marca SHIMADZU e modelo SSX-550, Figura 18. As amostras foram recobertas com ouro em metalizador, modelo SC-701 da Sanyu Electron por não possuírem natureza condutora..O material do filamento utilizado foi de tungstênio. O equipamento foi operado em 15 kV devido a rápida desintegração das membranas a acelerações mais altas. O equipamento possui um sistema que identifica elementos diferentes em uma amostra usando o software de identificação de elementos, integrado ao seu detector Espectroscopia por Dispersão em Energia EDS.

Figura 18-Equipamento de Microscopia Eletrônica de Varreduras



Fonte: próprio autor.

5- RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1- Análise de Infravermelho

Estudos de espectrometria no infravermelho em polissacarídeos para materiais poliméricos, apresentam em geral, bandas degeneradas pela sobreposição de grupos quimicamente similares, ocasionando bandas intensas e largas (FRANCO, 2009). Neste sentido, a análise por Espectroscopia de Infravermelho permite compreender quais os componentes (elemento e/ou grupos) presentes no material em análise através da vibração das moléculas, determinando a composição química do material (FRANCO, 2009).

Os espectros da quitosana pura e da papaína pura foram comparados com os espectros da membrana de quitosana modificada com 10%, 20% e 30% de papaína, respectivamente. A fim de determinar os modos vibracionais de cada composto em análise, a Tabela 3 apresenta as possíveis vibrações dos grupamentos presentes na quitosana.

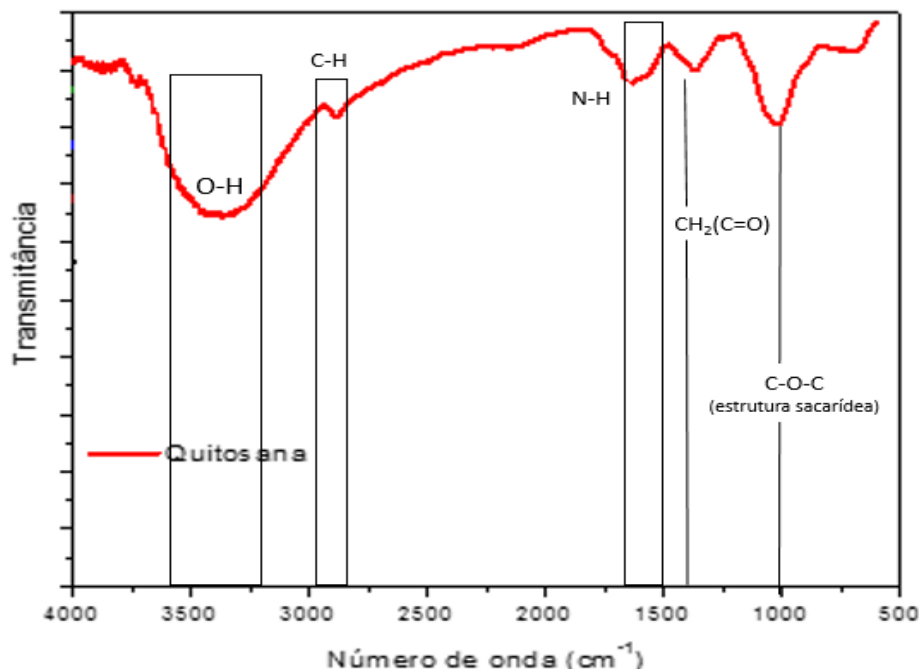
Tabela 3- Modos vibracionais da quitosana reportado na literatura comparado aos resultados

Material	Bandas (cm ⁻¹)	Grupos Associados	Bandas (cm ⁻¹) resultados
Quitosana	3570-3200	OH ligado: ν	3580-3240
Quitosana	2955-2845	C-H (assimétrico): ν	2980-2850
Quitosana	2878	C-H ν (simétrico):	-
Quitosana	1658-1630	N-H: δ	-
Quitosana	1570-1515	N-H: δ	~1650-1500
Quitosana	1465 e 1423	O-H: δ e CH ₂ (tesoura)	-
Quitosana	1406	-CH ₂ (C=O)	1400
Quitosana	1340-1250 e 1379	C-N (terciária): δ	-
Quitosana	1321	C-N (primária): ν	-
Quitosana	1260	C-N (secundária): ν	-
Quitosana	1154 e 896	C-O-C (estrutura secundária- β): ν	1000
Quitosana	890	C-N: ν e C-C: ν	-

Fonte: Adaptado SKOOG et al, 2002; COSTA et al.,2007; BISPO, et al., 2009.

A figura 19 ilustra o comportamento espectral da quitosana, os espectros das bandas e suas correspondentes vibrações encontram-se similares com os encontrados na literatura (SKOOG, et al. 2002; COSTA, et al 2007; BISPO, et al., 2009).

Figura19– Espectro de Infravermelho da quitosana



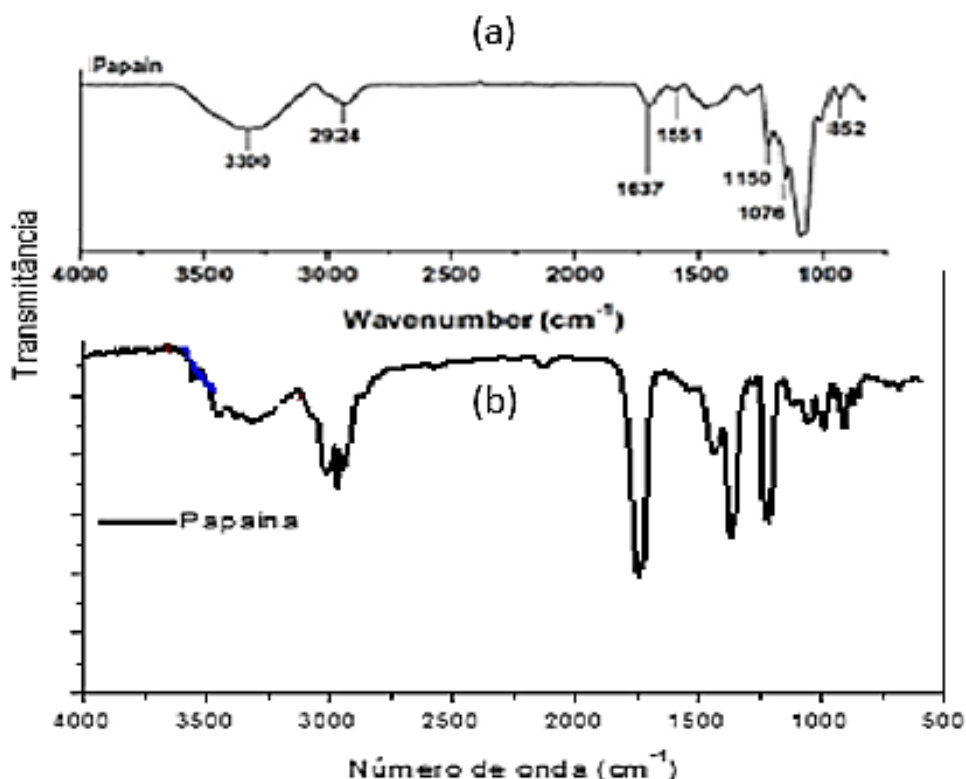
Fonte: próprio autor.

A quitosana pura apresentou bandas vibracionais nas faixas correspondentes aos modos presentes na estrutura quitosana, $C_6H_{11}O_4N$. Na região entre 3570-3200 cm^{-1} apresentou bandas vibracionais típicas do grupo funcional OH, na faixa de 2955-2845 cm^{-1} há a sobreposição das bandas de CH simétrico e assimétrico, na região de 1658-1515 cm^{-1} há a presença de sobreposição de vibração do tipo dobramento da ligação N-H. Na região de 1406 cm^{-1} há a vibração da ligação C=O pertencente ao CH_2 do biopolímero, as vibrações do tipo estiramento da ligação C-O-C correspondentes à estrutura sacarídea em 1154 cm^{-1} e 896 cm^{-1} são também encontradas neste espectro.

Ao analisar o espectro de papaína pura com a literatura na Figura 21, observa-se que há uma banda larga de absorção centrada a 3300 cm^{-1} , que coincide com a vibração de alongamento da ligação N-H pertencente a amida secundária (SHARMA, et al. 2011). As bandas em 1637 e 1551 cm^{-1} são associadas ao grupamento $-CONH$ pertencente a amida primária e amida secundária,

respectivamente e estão deslocadas no espectro da papaína utilizado neste trabalho (FORATO, et al. 1998; PEREZ, et al. 2015). A banda em 2924 cm^{-1} é tipicamente associada com a vibração assimétrica de CH_2 (PEREZ, et al. 2015).

Figura 20– Gráfico de comparação dos espectros de infravermelho da papaína da literatura (a) e (b) da papaína utilizada no presente trabalho.

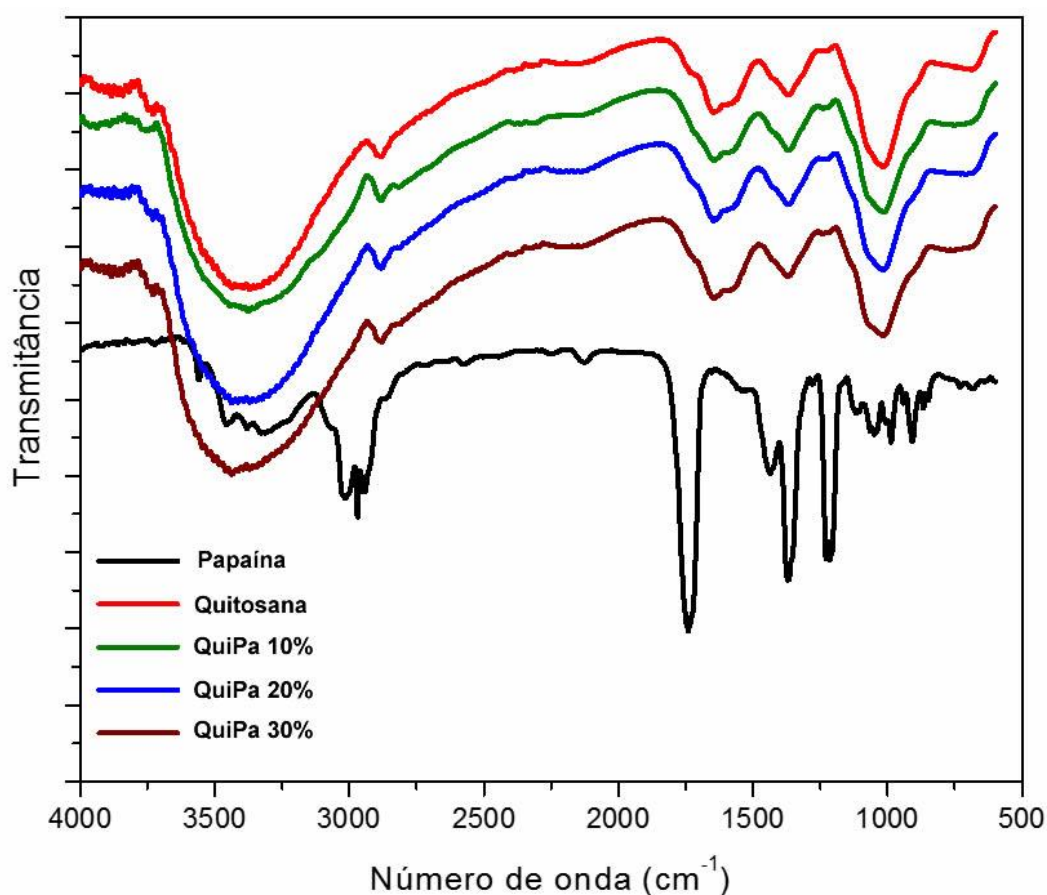


Fonte: Adaptado com PEREZ, et al. 2015.

Na Figura 20 observa-se que o espectro da papaína pura apresenta maiores vibrações das bandas quando comparadas aos espectros verificados na literatura, sugerindo que o equipamento utilizado para análise deste trabalho possua maior sensibilidade operacional e ou variedade no próprio material em análise.

Ao analisar os espectros das membranas modificadas por papaína (10%, 20% e 30%), com os espectros de quitosana e papaína (puras), é possível perceber similaridade entre as bandas vibracionais (Figura 21).

Figura 21- Espectro de infravermelho comparativo de papaína pura, quitosana pura e quitosana e papaína (10%, 20% e 30%)



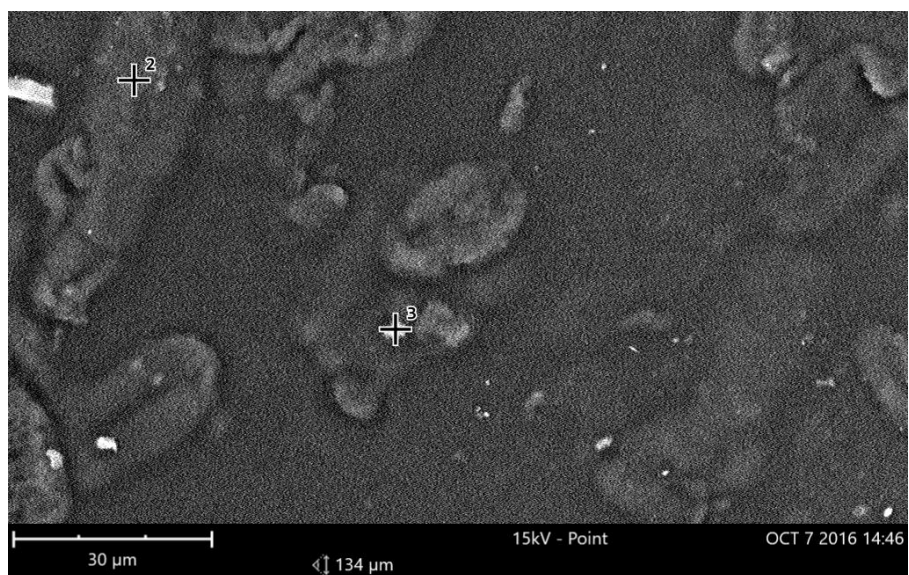
Fonte: próprio autor.

Através da comparação entre os gráficos, verifica-se um alargamento das bandas vibracionais nas membranas de quitosana e papaína na região entre 750-1250 cm^{-1} , região que corresponde as ligações C-O-C (estiramento), estiramento C-N e C-C. Sugerindo modificação do material polimérico, provavelmente pela incorporação da papaína a quitosana.

5.2 Análise de Microscopia Eletrônica de Varreduras

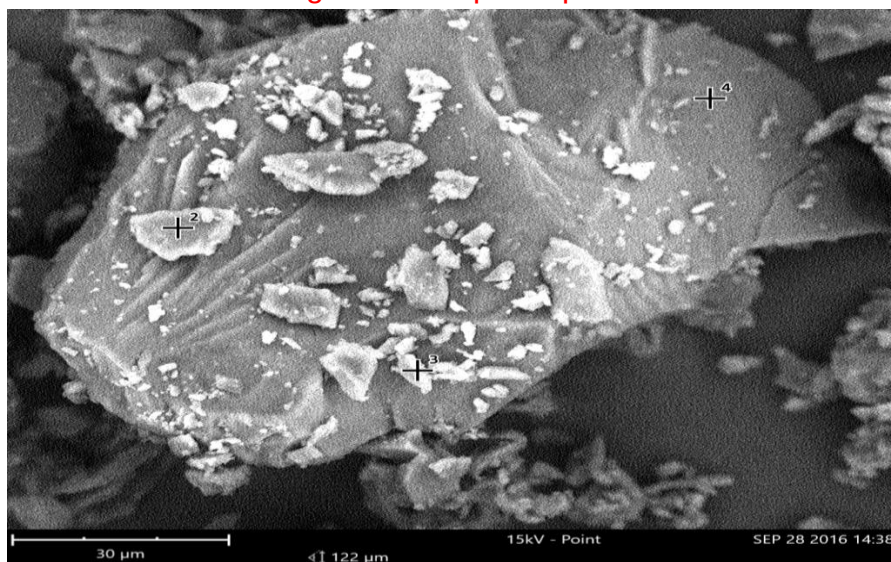
A análise por MEV da morfologia de superfície das membranas foi realizada visando a compreensão das propriedades desse material. Os resultados são mostrados nas Figuras 22 a 26. Através das micrografias para as membranas de quitosana e quitosana com papaína em 10%, 20% e 30% respectivamente.

Figura 22- Quitosana pura



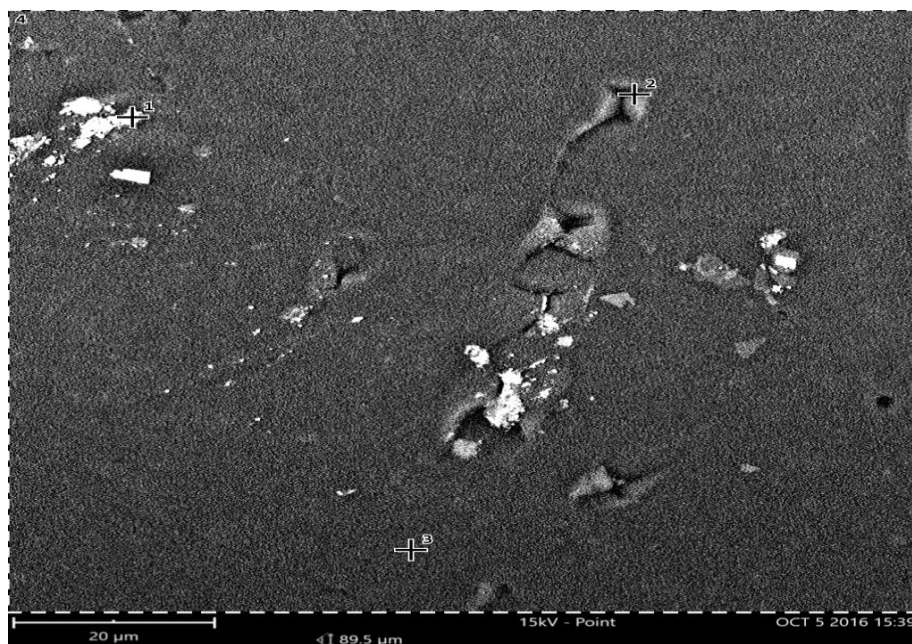
Fonte: próprio autor.

Figura 23- Papaína pura



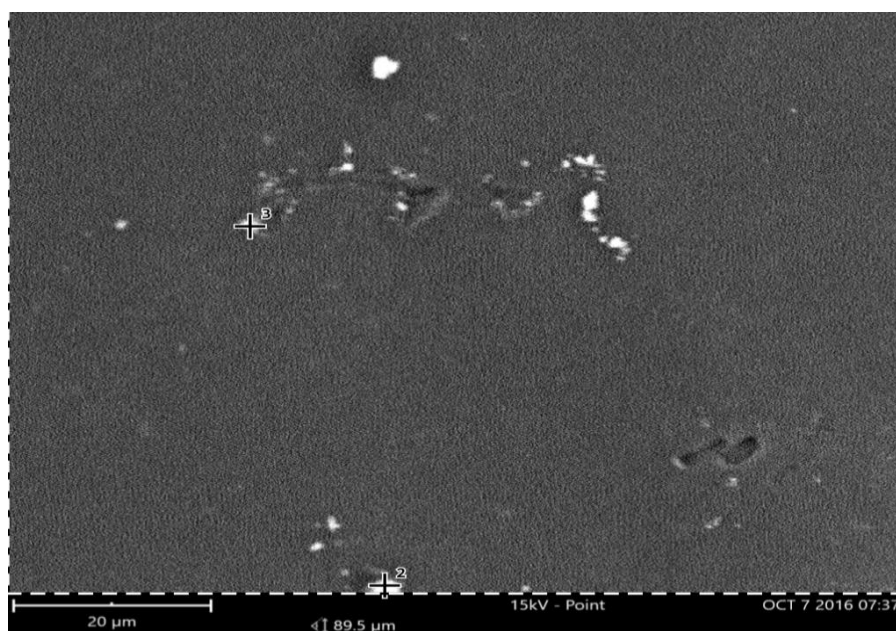
Fonte: próprio autor.

Figura 184- Quitosana e Papaína 10%



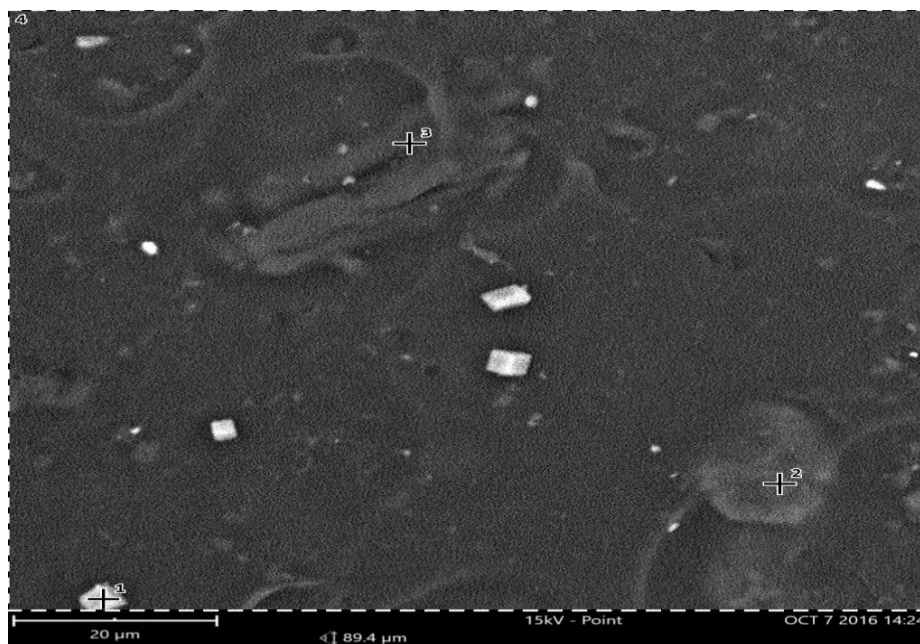
Fonte: próprio autor.

Figura 25- Quitosana e Papaína 20%



Fonte próprio autor.

Figura 196- Quitosana e Papaína 30%



Fonte: próprio autor.

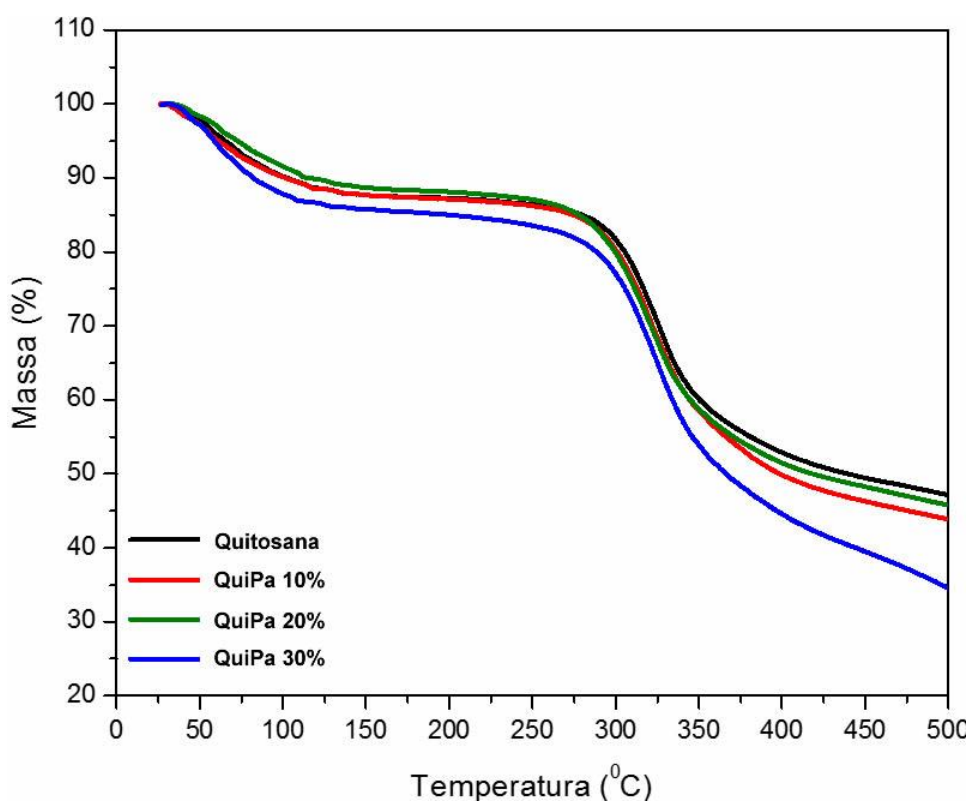
As membranas de quitosana e papaína 10%, 20% e 30% não apresentam superfícies lisas, com presença de agregados. Verificou-se ainda nas amostras de 10%, 20% e 30% de quitosana com papaína a presença de precipitados, em especial, as membranas de 10% e 30%. Em todas as membranas foi verificado a presença de porosidade. Através do EDS as membranas com 10%, 20% e 30% de papaína apresentam Carbono(C), Oxigenio(O) e Nitrogenio(N) oriundos da própria quitosana. As membranas de quitosana com papaína 20% apresentam superfícies mais lisas, com menos agregados indicando uma melhor diluição do material usado para a preparação das membranas de quitosana com papaína, sugerindo que esta seja a proporção mais adequada na preparação de membranas de quitosana com papaína.

5.3-Análises Térmicas

5.3.1-Termogravimetrica (TG)

As análises por termogravimetria (TG) mostraram uma maior estabilidade térmica para membrana de quitosana pura quando comparada às membranas com proporções de papaína (10%, 20% e 30%), demonstrado na Figura 29. Verificaram-se dois estágios de degradação para todas as membranas.

Figura 28- Análise termogravimétrica da membrana de quitosana pura comparada as proporções de papaína (10%, 20% e 30%)



Fonte: próprio autor.

Para a membrana de quitosana pura, o primeiro estágio corresponde a desidratação da quitosana, na faixa de 25-150 °C, com perda de aproximadamente 12% em massa. O segundo estágio de degradação (272-366 °C) corresponde a degradação dos sacarídeos que compõem a quitosana, Tabela 4.

Tabela 4- Temperatura de degradação de membranas de quitosana e quitosana com papaína (10%, 20% e 30%)

Amostra	Estágio 1		Estágio 2	
	ΔT (°C)	%	ΔT (°C)	%
Quitosana	25 – 150	12,3	272 - 366	28,6
Papaína	-	-	-	-
Quitosana 10	25 - 141	12,0	236 - 370	31,3
Quitosana 20	25 - 142	11,0	243 - 358	30,3
Quitosana 30	25 - 144	14,2	250 - 377	35,5

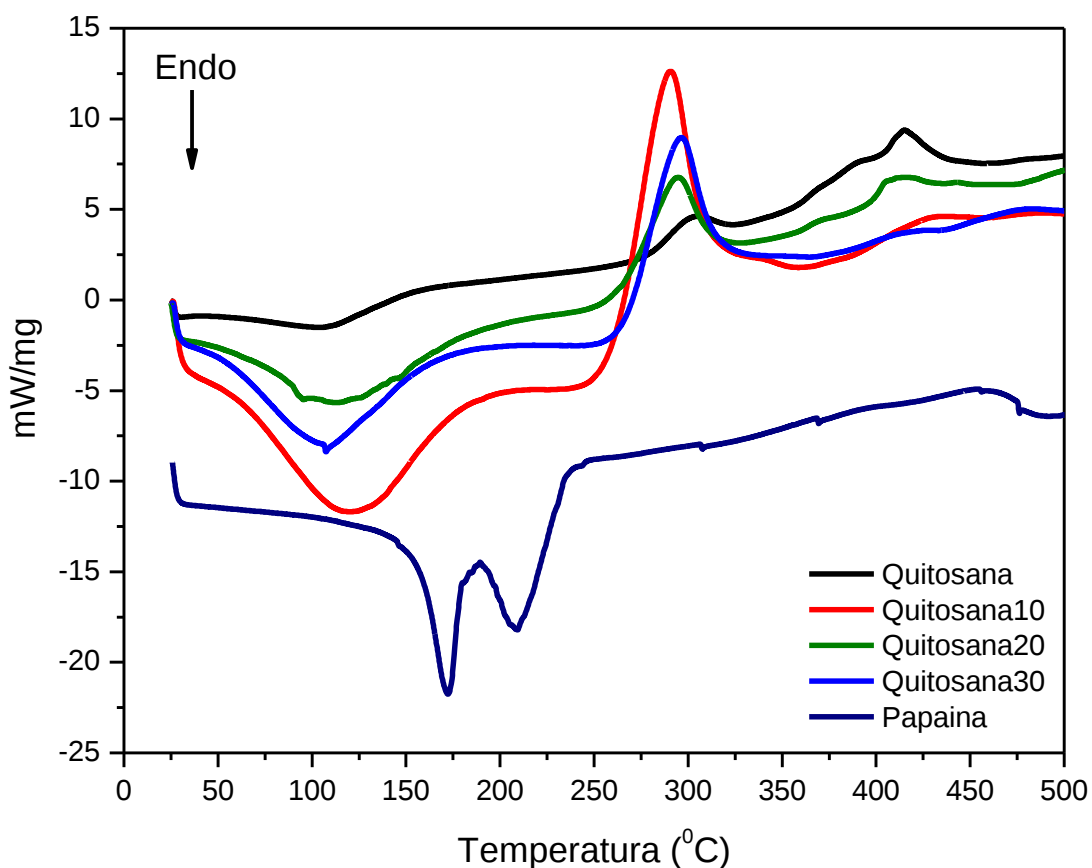
Fonte: próprio autor.

As membranas de quitosana com papaína degradam-se em temperaturas inferiores às da membrana pura, possivelmente, devido a desnaturação enzimática da papaína, que ocorre em torno de 50 °C. Com o aumento da proporção de papaína nas membranas de quitosana, há aumento da faixa de degradação em cada um dos estágios. No entanto, dentre as membranas com papaína a que apresentou melhor estabilidade térmica, com menor perda de massa (11%) sob as mesmas condições, foi a membrana de quitosana e papaína a 20%.

5.3.2-Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A partir das curvas DSC obtidas para a membrana de quitosana pura e para as membranas de quitosana com papaína, pode-se verificar três eventos térmico, conforme Figura 30. Sendo um endotérmico (que corresponde a temperatura de fusão das membranas) e dois exotérmicos (correspondendo a degradação das membranas).

Figura 29- Curva de DSC da membrana de quitosana e quitosana com papaína (10%, 20% e 30%)



Amostras	Evento 1		Evento 2		Evento 3	
	P (°C)	Processo	P (°C)		P (°C)	
Quitosana	104	Endotérmico	306	Exotérmico	415	Exotérmico
Papaina	172	Endotérmico	209	Endotérmico	-	-
Quitosana10	120	Endotérmico	291	Exotérmico	436	Exotérmico
Quitosana20	113	Endotérmico	295	Exotérmico	416	Exotérmico
Quitosana30	107	Endotérmico	296	Exotérmico	482	Exotérmico

FR-X

Medidas mecânicas

Verificou-se que quanto maior a proporção de papaína na membrana, menor o ponto de fusão destas e que, quando comparadas entre si, as membranas de quitosana e papaína (10%, 20% e 30%) aumentam a sua temperatura de degradação respectivamente.

6- CONCLUSÕES

Verificou-se na análise por Infravermelho uma similaridade entre os espectros das membranas puras de quitosana e papaína com as membranas de quitosana e papaína 10%, 20% e 30% em suas bandas vibracionais, verificando-se uma sobreposição das bandas vibracionais, comparado os gráficos dos espectros separados e entre si, devido a coincidência dos elementos químicos presentes na quitosana e na papaína.

Na microscopia eletrônica de varreduras foi demonstrada que as membranas de quitosana com papaína 20% possuem superfície menos rugosa e com menos precipitados, quando comparadas as membranas de quitosana e papaína com 10% e 30%, portanto sendo a que apresentou melhores condições para uma possível utilização. No EDS das membranas de 10%, 20% e 30% foi identificado a presença dos elementos C, O e N. A identificação dos componentes químicos nas amostras coincide com os elementos químicos presentes na molécula de quitosana e papaína isoladamente descritas na literatura.

A partir das análises de termogravimetria a membrana de quitosana e papaína a 20% obteve melhor estabilidade térmica, por apresentar menor perda de massa, sob as mesmas condições das demais membranas de quitosana e papaína. Na análise das membranas por calorimetria exploratória diferencial a temperatura de degradação aumenta quanto maior a proporção de papaína nas membranas de quitosana com papaína.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, L. G. **Membranas transdérmica de liberação controlada utilizando quitosana, plasma e plaquetas para a regeneração de feridas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Médica), Botucatu, São Paulo.
- APARECIDA, C. **Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no látex do mamoeiro**. Tese (Doutorado em Química), UNICAMP, 1994.
- AZARCAN, M.; MOUSSAOVI, A. E.; WUYTSWINKEL, A. V.; DEHON, G.; LOOZE, Y. **Fractionation and purification of the enzymes stored in the látex of carica papaya**. Journal of Cromatografy B. v. 790. 2003.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. **Quitina e quitosana aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processo. Vol 2. 2007.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, C. M.; CURI, R. **Mecanismo envolvido na cicatrização: uma revisão**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol 41, 2005.
- BAJAY, H. M. **Registro da evolução da ferida: elaboração e aplicabilidade de um instrumento**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), UNICAMP, 2001.
- BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. **The phases of cutaneous wound healing**. Expert Reviews in Molecular Medicine, v. 5, 2003.
- BISPO, V. M.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. **Caracterização por espectroscopia de infravermelho de filmes de quitosana com diferentes quantidades de agente reticulante**. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009.
- BUGNI, E. L. A. **Uso tópico do ácido docosahexano (DHA) melhora a cicatrização de feridas em ratos e ativa GPR 120**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem), 2014.
- CABRAL H. **Análise Funcional e Estrutural Comparativa da Faustosaina com Papaína e Bromelina**. [Tese] Doutorado em Biofísica Molecular. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP 2005. Estrutura da Papaína pag 5.
- CAPUCHO, H. C. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto), Universidade de São Paulo, 2007.
- CODOY, F. C. de. **Membrana denso de quitosana contendo nanopartículas de cobre: caracterização e possíveis aplicações**. 2013. Tese. (Doutorado em Engenharia Química), UNICAMP.

COSTA JR, E. S.; MANSUR, H. S. **Preparação e caracterização de blenda de quitosana/poli (álcool vinílico) reticulado quimicamente com glutaraldeído para a aplicação na engenharia de tecidos**. 9º Congresso Brasileiro de Polímeros. Campina Grande. 2007.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C. **Membranas de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações**. BR n. PI 9805480-5A, 12 set, 2000.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para a aplicação na regeneração de pele**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Campinas, São Paulo.

DERMAQUETE, N. R. **Estrutura e Propriedade de polímeros**. Notas de aula. CEFET-RS, 2001.

FERNANDES, L. P. **Produção de membranas de Quitosana e Quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. 2009. Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais), Rio de Janeiro.

FERREIRA, A. M.; OLIVEIRA, K. A. de.; VIEIRA, L. C.; ROL, J. L. **Revisão de estudos clínicos de enfermagem: utilização da papaína para o tratamento de ferodas**. P. 382.Rev. Enfermagem UERJ, 2005.

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, B.; COLNAGO, L. A. **Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy**. Revista: Analytical Biochemistry. 1998.

FRANCO, A. P. **Caracterização estrutural e adsorção de ions metálicos por carboximetilcelulose e quitosana in natura e impregnada com zeolita**. Tese (Doutorado em Química), UFPR, 2009.

GENARO, J. F. **Estimulação com corrente com corrente pulsada de alta voltage na cicatrização de áreas cruentas**. Dissertação (Mestrado em Ciências), UNICAMP, 2013.

GOULART, G. A. S. **Obtenção e caracterização de micropartículas de quitosana contendo papaína**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Campinas, São Paulo.

GREAVES, N. S.; ASHCROFT, K. J.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. **Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplosia and angiogenesis during acute wound healing**. Journal Dermatol Science. 2013.

KANECO, M. T.; TAQUEDA, M. E.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R.; PINTO, C. A. S. de O.; LOPES, P. S. **Avaliação in vitro da papaína e do óleo de pequi como promotores de permeação cutânea para diclofenaco de sódio**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, vol 44, 2008.

KUMAR, M. N. V. R. **A review of chitin on chitosan applications**. Reactive & Funtional Polymers. Vol. 46, 2000.

LIMA, M. S. P. **Preparo e caracterização de membranas de quitosana modificadas com poli (ácido acrílico)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química), Natal, Rio Grande do Norte.

LOPES, P. S. **Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutânea utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), São Paulo, 2005.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO NETO, J. **Aspectos celulares da cicatrização. Anais Brasileiro de Dermatologia**. 2009. <http://www.scielo.br/pdf/abd/v84n3/v84n03a07pdf> acesso em: maio de 2016.

MONTEIRO, J. O. A. **Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana**. Tese (Doutorado em Química), Instituto da Química, Universidade Estadual de Campinas. 2000.

NETO, R. J. G.; GENEVRO, G. M.; MORAES, M. A, de. **Obtenção e caracterização de membranas microestruturadas de quitosana e locomanana para a produção de curativos**. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UNICAMP, 2015.

OKAYAMA, K. NOGUCHI, K. KANERA, R. **Structural diversity of chitosan and its complexes**, Carbohydrate Polymers, Metal 2000, 2000.

PEREIRA, L. M.; FAURE, M. P. **Effect of oleic and liloneic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats**. Cell biotefunct. 2008.

PEREZ, R.; ARMELIN, E.; MORENO-MARTÍNEZ, J.; ALEMAN, C.; FERREIRA, C. A. **Transport and antifouling properties of papain-based antifouling coating**. Applied Surface Science. 2015.

PIEPER, B.; CALIRI, M. H. L. **Nontraditional Wound care: a review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids**. Journal of Wocn. V.30 p. 175-183, 2003.

RINAUDO, M. **Chitin and Chitosan: Propriets and applications**. Prog. Polym. Sci.31, 2006.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**, The Macmillan press, London,1992.

ROCHA, R. P. de A.; GURJÃO, W. S.; JUNIOR, L. C. de B. **Cicatrização de úlceras não infectadas tratadas com papaína**. <http://revista.fmrp.usp.br> acesso em: maio de 2015.

SANTANA, L. P. G. **Avaliação do reparo tecidial durante o tratamento tópico com solução de papaína em feridas de comundongos black**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), 2015.

SHARMA, M ; SHARMA, V; PANDA, A .K, et al. **Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery**. Revista: International Journal of Nanomedicine. Vol. 6 p 2097 – 2111 / 2011.

SHINGEL, K. I.; FAURE, M.P.; AZOULAY L, et al. **Solid emulsion gel as a vehicle for delivery of polyunsaturated fatty acids: implications for tissue repair, dermal angiogenesis and wound healing.** Journal Tissue Eng. Regen. Med. 2008.

SILVEIRA, M. M. da. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para uso em osmose direta.** 2013. Monografia (Graduação em Engenharia Química), Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**, Bookmon, Phonix Fort Worth. 2002.

SOUTO, L. R. M. **Modelo de pele humana (derme e epiderme) reconstrução in vitro.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), UNICAMP, 2005.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. **Methods enzymology.** In: BARRETT, A. J. Catalytic Mechanism in Papain Family of Cysteine Peptidases. Academic Press, v. 244. 1994.

TIRAS, U.; ERDEVE, O.; KARABULUT, A. A.; DALLAN, Y.; ERSIOGLU, H. M. **Debridamento via collagenase application in two neonatas.** Pediatric Dermatology. V. 22, 2005.

TODOROVIC, Z. **Avaliação da viscosidade e massa molar de quitosanas modificadas enzimaticamente.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UNICAMP, 2002.

VEIGA, I. G. **Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para a liberação controlada de anti-inflamatórios.** 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Campinas, São Paulo.

ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D. A. **Denaturation studies of active-site labeled papain using electon paramagnetic resonance and fluorence spectroscopy.** Biophysical Journal, v. 60,1991.

ZULLI, G. **Desenvolvimento de uma matriz polimérica para incorporação e liberação controlada de papaína.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear), São Paulo.