



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



AURILEIDE MARIA BISPO FRAZÃO SOARES

IMOBILIZAÇÃO DA PAPAÍNA EM SUPORTES HÍBRIDOS
CONTENDO ÓXIDOS METÁLICOS NANOPARTICULADOS E
QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TERESINA

2016

AURILEIDE MARIA BISPO FRAZÃO SOARES

IMOBILIZAÇÃO DA PAPAÍNA EM SUPORTES HÍBRIDOS
CONTENDO ÓXIDOS METÁLICOS NANOPARTICULADOS E
QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química – Área: Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Welter Cantanhêde

TERESINA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S676i Soares, Aurileide Maria Bispo Frazão.
Imobilização da papaína em suportes híbridos contendo
óxidos metálicos nanoparticulados e quitosana : síntese,
caracterização e avaliação da atividade citotóxica / Aurileide
Maria Bispo Frazão Soares. – 2016.
86 f.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2016.

“Orientador: Prof. Dr. Welter Cantanhêde”.

1. Química Inorgânica. 2. Quitosana. 3. Papaína.
4. ZnO NPs. 5. Fe₃O₄ NPs. I. Título.

CDD 546

AURILEIDE MARIA BISPO FRAZÃO SOARES

IMOBILIZAÇÃO DA PAPAÍNA EM SUPTOTES HÍBRIDOS
CONTENDO ÓXIDOS METÁLICOS
NANOPARTICULADOS E QUITOSANA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do
Piauí, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
(área de concentração: Química
Inorgânica).

Aprovada em: 07 de Dezembro de 2016

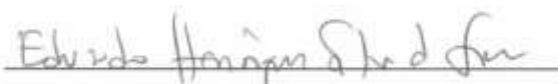
Banca examinadora:



Prof. Dr. Welter Cantanhêde
Universidade Federal do Piauí
(Orientador e Presidente)



Prof. Dr. Edson Calvalcanti da Silva Filho
Universidade Federal do Piauí
(Membro Interno)



Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa
Universidade Federal do Ceará
(Membro externo)

Dedico este trabalho a meu pai Francisco Frazão, que sempre me incentivou e acreditou em mim. Sem você pai, essa conquista não seria possível.

Agradecimentos

- ✓ A *Deus* por ser sempre meu refúgio, minha fortaleza e minha cidadela (Salmo 90). A *Nossa Senhora*, por me acolher como sua filha.
- ✓ Ao meu esposo Luciano, pelo amor, carinho, compreensão, apoio, incentivo e confiança depositada em mim, os meus dias estão cada vez mais felizes ao seu lado, te amo!
- ✓ A meu pai FRANCISCO FRAZÃO por seu imenso amor, confiança e incentivo.
- ✓ A minha madrasta Assunção e aos meus oito irmãos, pela força, companheirismo e incentivo.
- ✓ A minha mãe Dulce Helena (*in memoriam*), que mesmo não estando presente, sei que torce por mim.
- ✓ Ao meu querido orientador Prof. Dr. Welter Cantanhêde por ter abertos as portas do seu grupo de pesquisa, pelo tempo dedicado a mim, pela imensa ajuda em minha formação, e claro por ser um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido.
- ✓ A minha segunda família, LAS, Katharinne, Samuel, Thayllan, Tayna, Lia, Lizia, Caio, Elizio, Nielson, Wallonilson, Anderson, Steffane, Angélica, Lourdes e Anna Thaise, os dias no laboratório não seriam os mesmos sem vocês.
- ✓ A minha IC, Lizia, por toda dedicação, ajuda e amizade.
- ✓ A meu coorientador Prof. Dr. Anderson Mendes, pelo incentivo, ajuda e disponibilidade.
- ✓ A toda a minha família, sobrinhos, primos, sogros, cunhados, tios, obrigada pela força.
- ✓ Aos meus amigos Patrick, Fernanda, Carol, Carlinha, Elane que sempre torceram por mim.
- ✓ A todos os meus amigos, afinal, que graça teria a vida sem eles.

- ✓ Ao Laboratório de Biodiesel e Materiais (LBM – UFPI), pelo compartilhamento dos recursos na realização das sínteses.
- ✓ Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho pela colaboração com os ensaios de citotoxicidade.
- ✓ Ao Laboratório de Materiais (LABMAT – IFPI), pela colaboração para realização de análises de DRX, Em especial, Jairo Rufino, por todo auxílio e disponibilidade para realização destas.
- ✓ Ao professor Raul Fanguero, da Universidade do Minho (Portugal) pela colaboração com as imagens de TEM.
- ✓ Ao Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias (GERATEC – UESPI).
- ✓ À coordenação da pós-graduação em Química, na pessoa da prof^a. Dr^a. Carla Verônica.
- ✓ Aos profs. Drs. Edson e Anderson pelas contribuições dadas no exame de qualificação.
- ✓ Agradeço aos profissionais da limpeza que nos ajudaram na organização do laboratório, Leo e José Wilson.
- ✓ À CAPES pelo apoio financeiro.
- ✓ A todos que contribuíram de alguma forma, muito obrigada!

“Só eu sei cada passo por mim dado, nessa estrada esburacada que é a vida, passei coisas que até mesmo Deus dúvida... Fiquei triste, capiongo, aperriado, porém nunca me senti desmotivado, eu me agarrava sempre numa mão amiga e de força a minha alma era munida, pois do céu a voz de Deus dizia assim: -- Suba os queixo, meta os pés, confia em mim, Siga a luta que eu cuido das feridas. ”

-Bráulio Bessa

Resumo

A papaína (*Carica papaya*) uma enzima proteolítica, foi covalentemente imobilizada nos suportes híbridos contendo nanopartículas de óxido de zinco, ZnO NPs, e quitosana (S1- ZnO/quitosana) e em nanopartículas de magnetita, Fe₃O₄ Nps, e quitosana (S2-Fe₃O₄/quitosana). Cristalinidade, organização e estrutura foram investigadas por difração de raios-X (DRX), espectroscopia eletrônica e vibracional nas regiões do UV-Vis e infravermelho com transformada Fourier respectivamente. Os planos cristalográficos para a fase hexagonal do tipo wurtzita foram observados para as ZnO NPs, S1, e S1-Papaína bem como os picos referentes a estrutura cúbica de espinélio invertido das Fe₃O₄ NPs nos difratogramas das Fe₃O₄ NPs, S2 e S2-papaína foram observados por DRX. Os espectros eletrônicos apresentaram máximos de absorção no UV-Vis em 371 nm para as ZnO NPs, 377 nm para S1 e 192 e 352 nm S1-papaína referentes as transições d-d, e n→π* relativas às ZnO NPs e papaína, respectivamente. Para as Fe₃O₄ NPs o aumento na absorção em 345 nm confirma a formação destas. O espectro de FTIR para as ZnO NPs apresentou o estiramento intenso em 497 cm⁻¹ referente a νZn-O confirmando a formação das ZnO NPs, para as Fe₃O₄ NPs o estiramento em 585 cm⁻¹ foi atribuído a νFe-O. Os suportes S1 e S2 apresentaram as vibrações e estiramentos característicos da quitosana e das ZnO NPs e Fe₃O₄ NPs respectivamente, já nos espectros de FTIR para a papaína imobilizada tanto em S1 como em S2 pode se observar, além das bandas características da quitosana, da papaína, das ZnO NPs (para S1-papaína) e das Fe₃O₄ NPs (para S2-papaína) uma aumento na absorbância na banda em 1655 cm⁻¹, para S1-papaína e em 1645 cm⁻¹, para S2-papaína, podendo ser um indicativo da formação da ligação N=C, confirmando a imobilização da papaína nos suportes propostos. Todas as análises confirmam a formação das ZnO NPs, das Fe₃O₄ NPs, dos suportes S1 e S2 bem como a imobilização da papaína. Os ensaios farmacológicos realizados com S1-papaína mostraram que a enzima imobilizada em ZnO NPs possui baixa citotoxicidade em macrófagos (CC50 = 488,354 µg·mL⁻¹), sendo citotóxica apenas nas concentrações mais elevadas, e em eritrócitos. Além disso a enzima imobilizada provoca um aumento na capacidade fagocítica dos macrófagos em baixas concentrações e diminui este parâmetro em concentrações elevadas. Os materiais propostos no

presentem trabalho, mostram-se promissores para o uso na castração química de animais, entretanto mais estudos devem ser realizados.

Palavras chave: ZnO NPs, Fe₃O₄ NPs, Quitosana, Papaína, Imobilização.

Abstract

Papain (*carica papaya*), a proteolytic enzyme, was immobilized on hybrid supports containing zinc oxide nanoparticles, ZnO NPs; chitosan, (S1-ZnO/chitosan); magnetite nanoparticles, Fe₃O₄ NPs and chitosan (S2-Fe₃O₄/chitosan). Crystallinity, organization and structure were investigated by X-ray diffraction (XRD), electronic (UV-Vis) and vibrational (FTIR) spectroscopies. Crystallographic peaks for wurtzite hexagonal phase were observed for ZnO NPs, S1, and S1-papain as well as peaks referent to inversed spinel cubic structure of Fe₃O₄ NPs on Fe₃O₄ NPs, S2 and S2-papain diffractograms. Electronic spectra showed λ_{\max} at 371 nm for ZnO NPs, 377 nm for S1, and 192 and 352 nm for S1-papain assigned to d-d and $n \rightarrow \pi^*$ transitions related to ZnO NPs and papain, respectively. The increase in Fe₃O₄ NPs λ_{\max} to 345 nm confirms its formation. FTIR spectra for ZnO presented an intense stretching mode at 497 cm⁻¹ assigned to $\nu_{\text{Zn-O}}$ confirming its formation, while for Fe₃O₄NPs, the stretching mode $\nu_{\text{Fe-O}}$ appeared at 585 cm⁻¹. S1 and S2 showed characteristic vibrations and stretching modes of chitosan, ZnO NPs, and Fe₃O₄ NPs, respectively. For immobilized papain, besides S1 and S2 presenting characteristic bands for chitosan and papain, ZnO NPs (S1-papain only) and Fe₃O₄ NPs (S2-papain only) had an increase in absorbance at 1655 cm⁻¹ for S1-papain and 1645 cm⁻¹ for S2-papain, indicating N=C bond, confirming papain immobilization on to the proposed supports. All analysis confirmed ZnO NPs, Fe₃O₄ NPs, S1 and S2 supports, and papain immobilization. Pharmacological assays with S1-papain showed that the immobilized papain on ZnO NPs has lower cytotoxicity on macrophages (CC50 = 488,354 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and high cytotoxicity on erythrocytes at high concentrations. Besides, the immobilized enzyme causes an increase on macrophages phagocytic capacity at lower concentrations along with a decrease at higher concentrations. All material proposed on this work is promising for chemical castration of animals; however, more studies need to be done.

Keywords: ZnO NPs, Fe₃O₄ NPs, Chitosan, Papain, Immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da célula cristalina do ZnO, (a) Sal de rocha; (b) Blenda de zinco e (c) Wurtzita.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 2. Representação da célula unitária das Fe ₃ O ₄ NPs.....	22
Figura 3. Métodos de Imobilização de Enzimas	24
Figura 4. Representação da molécula de (a) Quitina e (b) Quitosana	28
Figura 5. Representação esquemática da síntese das ZnO NPs.....	36
Figura 6. Representação esquemática da síntese das Fe ₃ O ₄	37
Figura 7. Representação esquemática para preparação dos suportes S1 e S2.....	38
Figura 8. Representação esquemática da imobilização da papaína no suporte ZnO/quitosana	39
Figura 9. Representação esquemática para imobilização da papaína no suporte híbrido.....	46
Figura 10. Difratogramas para (a) Quitosana e (b) Papaína Livre	47
Figura 11. Difratogramas para (a) ZnO NPs e (b) Fe ₃ O ₄ NPs.....	49
Figura 12. Difratogramas para (a) S1: ZnO/quitosana e (b) S1-Papaína.....	50
Figura 13. Difratogramas para (a) S2 e (b) S2-papaína	52
Figura 14. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para Papaína livre, ZnO e Fe ₃ O ₄ NPs	55
Figura 15. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para S1 e S2	56
Figura 16. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para reação com ninidrina de S1 e S2 (I: Antes e II: Depois da reação com ninidrina).....	57
Figura 17. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para S1-Papaína e S2-Papaína	58

Figura 18. Espectros de FTIR para quitosana pura e papaína livre (colocar as estruturas no espectro para facilitar a atribuição).....	59
Figura 19. Espectros de FTIR para ZnO NPs e Fe ₃ O ₄ NPs	60
Figura 20. Espectros de FTIR para os suportes S1 e S1	61
Figura 21. Espectros de FTIR para (a) S1-Glutaraldeído e S1-Papaína e (b) S2-Glutaraldeído e S2-Papaína.....	62
Figura 22. Esquema de reação entre quitosana, glutaraldeído e papaína.....	63
Figura 23. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para (a) ZnO NPs e (b) S1-papaína	64
Figura 24. Histograma de distribuição de tamanho para (a) ZnO NPs e (b) S1-papaína.....	65
Figura 25. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para (a) Fe ₃ O ₄ NPs e (b) S2-papaína	66
Figura 26. Teste da atividade proteolítica sob a formação da gelatina para: a) controle negativo b) controle positivo - Papaína livre e c) S1-papaína e d) S2-papaína.....	68
Figura 27. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para (a) leite puro e teste de atividade proteolítica para (b) S1-papaína (c) S2-papaína e (d) reação com S1-papaína após 24horas.....	69
Figura 28. Voltamogramas de filmes cast para (a) ZnO/FTO, S1/FTO, S1-papaína/FTO, FTO e (b) Fe ₃ O ₄ /FTO, S2/FTO, S2-papaína/FTO e FTO em eletrólito KCl 0,1 mol L ⁻¹ , na presença de [Fe ^{II} (CN) ₆] ⁴⁻ , com velocidade de varredura 50 mVs ⁻¹	72
Figura 29. Voltamogramas de filmes cast constituídos de (a) ZnO/FTO e (b) Fe ₃ O ₄ /FTO, em eletrólito KCl 0,1 mol L ⁻¹ , na presença de [Fe ^{II} (CN) ₆] ⁴⁻ , em diferentes velocidades de varredura.....	74

Figura 30. Percentual de hemólise em eritrócitos de carneiro após tratamento com (a) Papaína Livre e (b) S1-papaína.....	75
Figura 31. Efeito sob macrófagos peritoneais murinos da (a) papaína livre e (b) S1-papaína.....	76
Figura 32. Avaliação da capacidade fagocítica de (a) Papaína Livre e (b) imobilizada	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Materiais e reagentes utilizados e suas procedências.....	35
Tabela 2. Índice de cristalinidade dos materiais sintetizados	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CC₅₀** – Concentração citotóxica média
- DRX** – Difractometria de Raios X
- Fe₃O₄ NPs** – Nanopartículas de Magnetita
- FTIR** – Infravermelho com Transformada de Fourier
- FTO** – (*Fluorine doped Tin Oxide*) óxido de estanho dopado com flúor
- JCPDS** - *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) Comitê Misto de Padrões em Difração de Pós
- MET** – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
- S1** – Suporte 1 (ZnO/quitosana)
- S1A** – Suporte 1 ativado (ZnO/quitosana-glutaraldeído)
- S1-papaína** – Papaína Imobilizada em S1
- S2** – Suporte 2 (Fe₃O₄/quitosana)
- S2A** – Suporte 2 ativado (Fe₃O₄/quitosana-glutaraldeído)
- S2-papaína** – Papaína Imobilizada em S1
- UV-Vis** – Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta e visível
- ZnO NPs** – Nanopartículas de Óxido de Zinco

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Castração Animal	18
1.2 Nanopartículas de Óxido de Zinco - ZnO NPs.....	19
1.3 Nanopartículas de Magnetita - Fe ₃ O ₄ NPs.....	22
1.4 Nanomaterias	23
1.5 Imobilização enzimática	23
1.5.1 Métodos para imobilização de enzimas.....	24
1.5.1.1 Imobilização por adsorção	25
1.5.1.2 Imobilização por encapsulação.....	26
1.5.1.3 Imobilização por ligação cruzada.....	26
1.5.1.4 Imobilização por ligação covalente.....	26
1.5.2 Suportes para imobilização	27
1.5.3 Quitosana	28
1.7 Papaína	30
2 Objetivos.....	33
3 PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 Materiais e Reagentes	35
3.2 Procedimento Experimental.....	35
3.2.1 Síntese das Nanopartículas de Óxido de Zinco – ZnO NPs	35
3.2.2 Síntese das Fe ₃ O ₄ NPs.....	36
3.2.3 Síntese dos suportes ZnO/Quitosana e Fe ₃ O ₄ /Quitosana	37
3.2.4 Imobilização da Papaína.....	39
3.3 Caracterizações	40
3.3.1 Difractometria de Raios-X.....	40
3.3.2 Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	40
3.3.3 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.....	40
3.3.4 Microscopia Eletrônica de transmissão	41

3.3.5 Voltametria Cíclica	41
3.4 Teste de atividade da enzima imobilizada	41
3.4.1 Hidrólise do colágeno.....	41
3.4.2 Degradação da caseína pela papaína imobilizada.....	42
3.5 Ensaio de Citotoxicidade.....	42
3.5.1 Animais.....	42
3.5.2 Células.....	42
3.5.3 Citotoxicidade em eritrócitos	43
3.5.4 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT	43
3.5.5 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos pela papaína pura e papaína imobilizada	44
3.5.5.1 Avaliação e determinação da capacidade fagocítica	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Síntese, estrutura molecular e cristalinidade	46
4.2 Investigação espectroscópica e reatividade	54
4.3 Arranjo supramolecular e tamanho	63
4.4 Ensaio de Atividade Proteolítica	67
4.5 Propriedades Eletroquímicas de Filmes cast formados por ZnO, quitosana e papaína.....	71
4.6 Avaliação da atividade citotóxica e de ativação do S1-papaína.....	75
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6 PERSPECTIVAS.....	80
Referências Bibliográficas.....	82



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A superpopulação canina e o elevado número de cães em condições de rua, representam um desafio mundial, uma vez que estes podem impactar negativamente o meio ambiente além de aumentar o risco de surtos de doenças zoonóticas, visto que estes cães podem ser reservatórios ou vetores de doenças transmissíveis ao homem. A eutanásia e captura desses animais são métodos considerados ineficientes para o controle da população de cães de rua, especialmente para cães machos. A esterilização de ambos os sexos desses animais é uma forma eficaz para o controle dessa população, entretanto a esterilização do macho é mais benéfica, uma vez que os machos possuem maior potencial para produzir um maior número de descendentes quando comparados às fêmeas (VANNUCCHI et al., 2015; VANDERSTICHEL et al., 2015; JANA; SAMANTA, 2007; KUTZLER; WOOD, 2006).

A castração cirúrgica é um método invasivo de esterilização para machos que consiste na remoção dos testículos por meio de uma incisão. Esse método apresenta desvantagens como, necessidade de cirurgias, cuidados prolongados no pós-operatório, infecções e sangramentos recorrentes após a cirurgia e elevado custo, que limitam sua aplicação em larga escala, sendo, portanto, considerado um método não eficaz para o controle de populações caninas. Desta forma, a castração química surge como uma alternativa a castração cirúrgica em campanhas para controlar o aumento da população canina (VANDERSTICHEL et al., 2015; JANA; SAMANTA, 2007).

1.1 Castração Animal

A castração animal é definida como a extirpação ou supressão das funções das gônadas, e pode ser classificada como hormonal, física ou química (ANDRADE NETO et al., 2014). A castração química promove alterações definitivas nas estruturas do aparelho reprodutor masculino, levando à redução parcial ou total da espermatogênese, pelo uso de agentes que geram inflamação, fibrose e dano físico definitivo às estruturas do aparelho reprodutor masculino, especialmente nos ductos deferentes, nos epidídimos e nos próprios testículos (LOPES; SILVA, 2014).

Para ser considerada eficaz, a castração química deve atender a fatores como, eficiência em uma grande quantidade de animais tratados, ser segura para os animais e para o meio ambiente, e claro, ser irreversível após um único tratamento (OLIVEIRA et al., 2011). Neste sentido, a castração química é um procedimento mais seguro e de menor custo, quando comparada a métodos de castração cirúrgicos tradicionais (LOPES; SILVA, 2014).

O primeiro produto considerado eficaz para a castração química de animais foi o gluconato de zinco (FAHIM et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2011). Entretanto, diversos materiais já foram testados através da injeção intratesticular, como tanato de zinco, gluconato de zinco, cloreto de cálcio, glicerol, ácido láctico, clorexidina, dimetil-sulfóxido, dentre outros (FAHIM et al., 1993; NISHIMURA et al., 1992; ANDRADE NETO et al., 2014; JANA; SAMANTA, 2006), em diversas espécies de mamíferos incluindo primatas, roedores, caninos, felinos e caprinos (ANDRADE NETO et al., 2014). Entretanto, mais pesquisas com novos agentes esterilizantes são necessárias, visando o bem estar do animal, seja para o aumento da produtividade, para ganho de peso, em bovinos por exemplo, ou para o controle de populações.

O zinco é um mineral presente naturalmente no processo de espermatogênese, sua carência ou excesso trazem variações nesse processo que podem levar à azoospermia. Sendo, por tanto, um material interessante para estudos de castração química, uma vez que a exposição de uma elevada concentração de zinco leva o aumento dos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos estimulados pela presença do mineral (LOPES; SILVA, 2014; OLIVEIRA et al., 2011). Neste sentido, se faz necessário desenvolver novos tipos de materiais que possam ser mais eficazes neste tipo de tratamento.

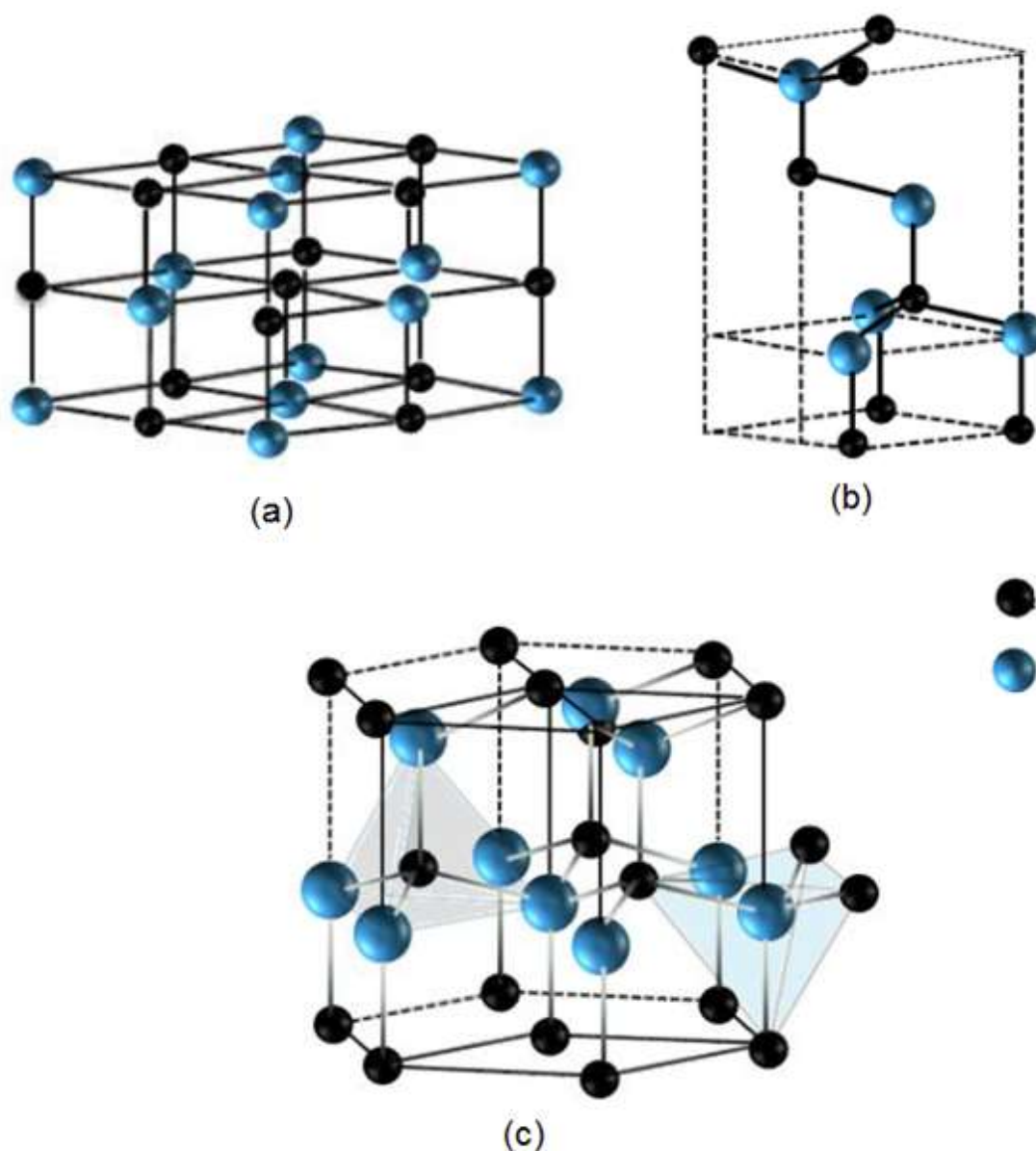
1.2 Nanopartículas de Óxido de Zinco - ZnO NPs

O óxido de zinco (ZnO) é um semicondutor do tipo-n, pertencente ao grupo II-VI, com um *band gap* de 3,37 eV (a 300 K). É um dos mais importantes materiais inorgânicos, com propriedades catalíticas, elétricas, optoeletrônica e fotoquímica. Graças as suas excelentes propriedades físicas e químicas vêm estimulando cada vez mais investigações quanto a sua aplicabilidade. (SILVA; MAGALHÃES;

SANSIVIERO, 2010; PUDUKUDY; HETIEQA; YAAKOBA, 2014; SAHOO et al., 2013)

Naturalmente o ZnO ocorre sob três estruturas, blenda de zinco, sal de rocha e wurtizita, Figura 1. A fase wurtizita é a mais estável em condições ambiente, que possui célula unitária hexagonal, na qual cada ânion se encontra rodeado por quatro cátions e vice-versa, tetracoordenados (Figura 1 (c)). A coordenação tetraédrica do ZnO resulta em uma estrutura simétrica não central (SAHOO et al, 2013; ÖZGÜR et al., 2005; WANG, 2004)

Figura 1. Representação da célula cristalina do ZnO, (a) Sal de rocha; (b) Blenda de zinco e (c) Wurtizita



Fonte - Adaptado de TEIXEIRA, Dissertação- Teresina, 2016.

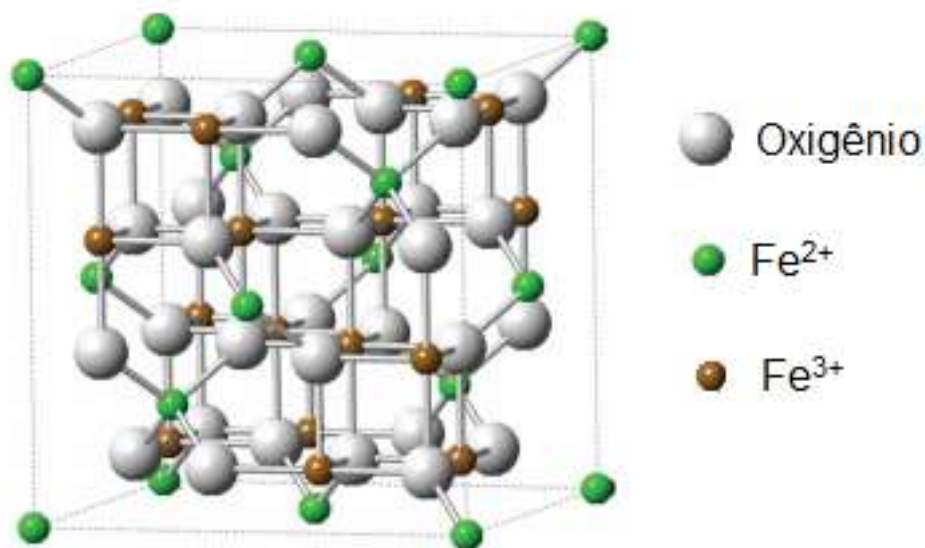
A síntese das ZnO NPs pode ser realizada por diferentes métodos, dentre eles destacam-se o método de coprecipitação (PUDUKUDY; HETIEQA; YAAKOBA, 2014), sol-gel, (VAFAEE; GHAMSARI, 2007) sonoquímica (FU; FU, 2015), evaporação térmica (WANG, 2004), dentre outros. O método de coprecipitação, é o mais viável para ser utilizado, uma vez que é um método de rápida preparação, simples, de baixo custo e consiste basicamente na mistura de apenas dois componentes, podendo ou não necessitar de aquecimento (SHARMA; GHOSE et al., 2015; PUDUKUDY; HETIEQA; YAAKOBA, 2014).

1.3 Nanopartículas de Magnetita - Fe_3O_4 NPs

As nanopartículas de magnetita, Fe_3O_4 NPs, são de bastante interesse no campo da nanociência e nanotecnologia, em virtude de suas propriedades, como, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, propriedades magnéticas, baixo custo e fácil obtenção, que possibilita a aplicação destas em diversas áreas (CHUMMING; XIANGQIN, 2009; LIU et al., 2011; LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; SANTOS; MELO; CRESPILO, 2014; YANG; WU; HOU, 2011; ZHANG et al., 2010).

A magnetita é um óxido de ferro que possui uma estrutura de espinélio invertido do tipo cúbica de face centrada (CFC), com o ferro em dois estados de oxidação, Figura 2. A célula unitária da magnetita há dois sítios: 1) tetraédrico, que é ocupado pelos íons Fe^{3+} ; e 2) octaédrico que é ocupado pelos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (YANG; WU; HOU, 2011).

Figura 2. Representação da célula unitária das Fe_3O_4 NPs



Fonte - Adaptado de YANG; WU; HOU, 2011.

Dentre os métodos utilizados para a preparação das Fe_3O_4 destaca-se o método de coprecipitação, que consiste na adição de uma base forte, a uma solução contendo os íons Fe^{3+} e Fe^{2+} na proporção estequiométrica de 2:1, respectivamente, em atmosfera inerte para evitar a formação da maghemita, pela oxidação da magnetita. A equação 1 mostra a formação das Fe_3O_4 (LIU et al., 2011).



1

A nanotecnologia tem fornecido uma diversidade de materiais que podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas, uma vez que o bom desempenho da enzima imobilizada depende diretamente do suporte em que esta está ligada (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

1.4 Nanomaterias

Os nanomateriais ZnO e Fe₃O₄ são objetos de estudo da nanociência e da nanotecnologia, pois apresentam pelo menos uma de suas dimensões interna ou externa na ordem de nanômetros (10⁻⁹ m). Como consequência do seu tamanho diminuto, estes materiais apresentam novas propriedades, físicas, químicas e biológicas como, eletrônicas, ópticas, de transporte, fotoquímicas, magnéticas, eletroquímicas e catalíticas, diferentes daquelas que o mesmo material possui enquanto *bulk* (sólido estendido), o que possibilita potencial aplicação desses materiais em vários campos tecnológicos como, farmácia, medicina regenerativa, diagnóstico, cosmética e tecnologia de alimentos (BARKALINA et al., 2014; JUTZ; BOKER, 2011; LIU, 2013; LLOYD; BYRNE; COKER, 2011). Nanopartículas metálicas, nanopartículas de semicondutores, nanotubos e nanofios são outros exemplos de nanomateriais. (POOLE; OWENS, 2003).

1.5 Imobilização enzimática

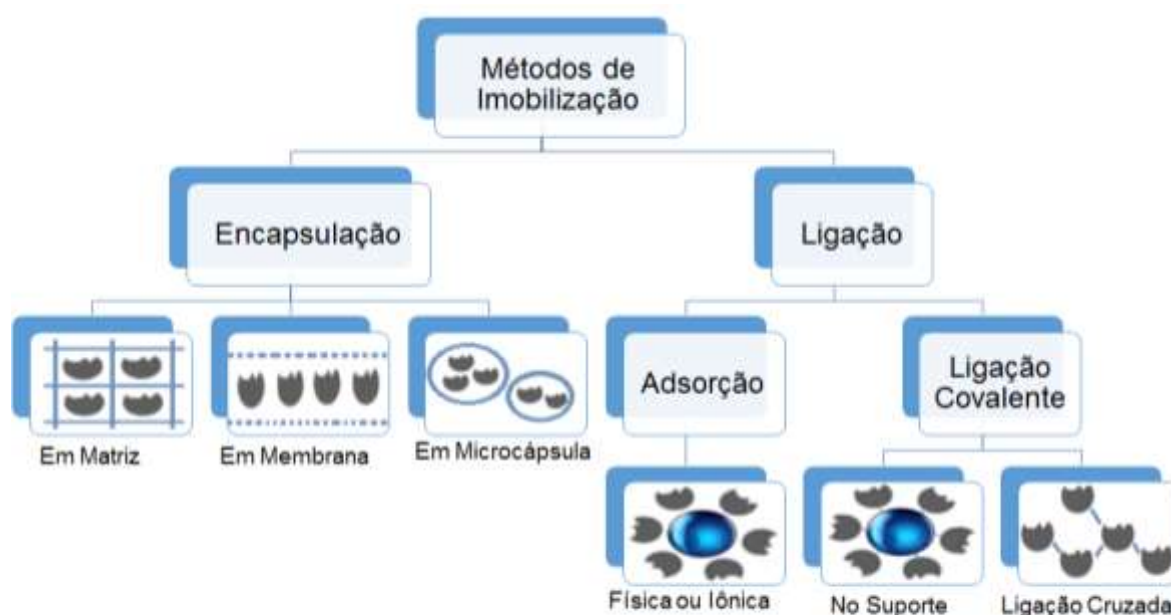
Enzimas são catalisadores biológicos cada vez mais utilizados, uma vez que possuem uma série de características vantajosas quando comparados aos catalisadores convencionais, como elevada atividade catalítica, especificidade, elevada atividade em condições brandas de temperatura e pressão. Ademais, estes biocatalisadores por serem geralmente de origem protéica oferecem menor risco quanto aos seus descartes. (SHARMA et al., 2011; HANSAN; SHAH; HAMEED, 2006; KRAJEWASKA, 2004; MENDES et al., 2011).

Apesar das inúmeras vantagens, as enzimas apresentam algumas desvantagens quanto à estabilidade operacional e de armazenamento, elevado custo de produção e purificação, instabilidade de suas estruturas, sensibilidade. Também quando utilizadas na forma solúvel não é possível sua recuperação para posterior utilização, devido sua solubilidade em meio aquoso (CARVALHO; LIMA;

SOARES, 2014; MENDES et al., 2011; KRAJEWASKA, 2004). Desta forma, a imobilização surge como uma alternativa para contornar as adversidades do uso de enzimas na sua forma solúvel.

A imobilização consiste no confinamento, adsorção ou ligação da enzima de interesse em um suporte, visando melhorias na estabilidade e retenção atividade catalítica da mesma (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; MENDES et al., 2011). Dentre as vantagens de se utilizar enzimas imobilizadas estão: possibilidade de reutilização da enzima em diferentes ciclos, separação do produto final, melhoria na dispersão enzimática e acesso ao substrato, e aumento da estabilidade térmica (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; MENDES et al., 2011). Adsorção, encapsulamento e ligação covalente em um suporte são as três categorias de métodos para a imobilização (SHELDON; PELT, 2013). Na Figura 3 estão ilustrados os métodos de imobilização enzimática.

Figura 3. Métodos de Imobilização de Enzimas



Fonte - Arquivo pessoal

1.5.1 Métodos para imobilização de enzimas

Idealmente, o método de imobilização deve assegurar a estabilidade da enzima durante grandes períodos de tempo, evitar sua lixiviação, torna-la reutilizável e permitir a livre difusão de substratos e produtos da reação. (ISPAS; SOKOLOV; ANDREESCU, 2009).

Enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, classificados como físicos e químicos. Os métodos físicos são adsorção (física ou iônica), inclusão (aprisionamento em gel), encapsulação e formação de filmes enzimáticos. Por outro lado, os métodos químicos são ligação química com o suporte; reticulação com o uso de um reagente multifuncional de baixo peso molecular e ligação cruzada com outras substâncias neutras. Nos métodos físicos de imobilização a interação entre a enzima e o suporte são consideradas fracas, já nos métodos químicos a interação entre enzima e suporte ocorre graças a formação de uma ligação covalente, sendo por tanto considerada forte. (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; KRAJEWASKA, 2004; HANEDEL; GARDOSI; MAGNER, 2009; SHELDON, PELT, 2013).

Não há um método de imobilização aplicável a todas as enzimas, sendo por tanto necessário a escolha de um método simples, de baixo custo e que resulte em um derivado com boa estabilidade para a aplicação desejada (MENDES et al., 2011).

1.5.1.1 Imobilização por adsorção

A imobilização por adsorção física é um método simples e de baixo custo que consiste na interação da enzima com o suporte por meio de interações fracas, tais como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas, iônicas) e ligações de hidrogênio. A grande desvantagem desse método é a facilidade de perda enzimática, uma vez que as interações fracas existentes entre a enzima e o suporte podem ocasionar a lixiviação da enzima nos meios reacionais. Por outro lado, a facilidade de dessorção pode ser encarada como uma vantagem, já que permite a recuperação do suporte após a desnaturação da enzima. Outra vantagem inerente a esse método é que a enzima não necessita de um pré-tratamento para imobilização. Graças as vantagens e facilidade de trabalho a adsorção física é o método mais empregado para a imobilização de enzimas (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; MENDES et al., 2011).

A adsorção iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido que deve conter cargas residuais. Esse método depende fortemente da concentração de sal e do pH durante a imobilização (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

1.5.1.2 Imobilização por encapsulação

A imobilização por encapsulação consiste em retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa que devem possuir poros pequenos o suficiente para não permitir a passagem das enzimas, porém suficientemente grandes para permitir a livre passagem dos substratos e produtos, permitindo assim que a enzima permaneça na solução sem sofrer exposição aos efeitos externos. Como desvantagens esse método apresenta uma necessidade de uma elevada concentração de enzima para garantir a encapsulação, possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização e instabilidade dos suportes geralmente empregados. (CARVALHO; LIMA; SOARES 2014; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009; MENDES et al., 2011).

1.5.1.3 Imobilização por ligação cruzada

Esse método de imobilização é um tipo especial de imobilização por ligação covalente, em que as moléculas da enzima são fortemente ligadas entre si com o uso de um agente multifuncional. Nesse método é de fundamental importância que o reagente utilizado para imobilização promova a ligação entre grupos que não estejam envolvidos no sítio catalítico da enzima, isto é, as ligações entre as moléculas de enzima devem ocorrer em grupos funcionais que não sejam responsáveis pela sua capacidade catalítica. Além disso, a concentração do agente multifuncional deve ser suficiente para promover a completa imobilização e manutenção da atividade enzimática (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

As enzimas imobilizadas por esse método apresentam alta estabilidade, elevada atividade além de baixo custo e produção uma vez que é excluída a adição de um suporte que de custo elevado (SHELDON; PELTI, 2013).

1.5.1.4 Imobilização por ligação covalente

Esse método de imobilização consiste na modificação da superfície de um suporte com agentes bifuncionais, que inserem em sua superfície grupos reativos que reagem com grupos nucleofílicos da enzima formando assim uma ligação covalente entre o suporte e a enzima. É um método eficiente e irreversível de imobilização de enzimas. (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; MENDES et al., 2011). O sítio catalítico enzimático não deve ser afetado pela imobilização, isto é, a

ligação formada entre o suporte e a enzima deve ocorrer em qualquer grupo funcional presente na enzima que não seja essencial para sua atividade catalítica.

A ligação covalente de uma enzima a um suporte tem a vantagem de diminuir a lixiviação da enzima, uma vez que está firmemente fixada no suporte, evitando assim a contaminação do produto de catálise pela enzima. Além disso, a formação de ligações na superfície da enzima diminui a flexibilidade conformacional da enzima diminuindo o desdobramento e conseqüentemente a desnaturação por outro lado há uma modificação química na enzima, que pode acarretar em perda de atividade (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER 2009; CAO, 2005).

1.5.2 Suportes para imobilização

Imobilização de enzimas implica necessariamente na interação entre a enzima e o suporte, de modo que as propriedades da enzima imobilizada dependam das características de ambos (KRAJEWASKA, 2004). Assim um suporte criteriosamente escolhido pode melhorar significativamente o desempenho do biocatalizador imobilizado.

Para um material ser considerado um suporte adequado para a imobilização de enzimas é necessário analisar suas propriedades físicas, químicas e morfológicas, e embora não exista um suporte universal para todos os biocatalisadores e suas aplicações. Há algumas características que devem ser levadas em consideração, como: elevada afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e para as modificações químicas, hidrofiliçidade, permeabilidade, insolubilidade, estabilidade mecânica, regenerabilidade, resistência ao ataque microbiano e facilidade de preparação e elevada área superficial, além disso, devem ser biodegradáveis e de baixo custo (KRAJEWASKA, 2004; MENDES et al., 2011, CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

Os suportes para imobilização são classificados como orgânicos ou inorgânicos. Um suporte híbrido pode ser definido como a combinação de componentes orgânicos e inorgânicos (LADERO et al., 2006; PAULA et al., 2008). Dentre os suportes orgânicos os mais utilizados são os polímeros sintéticos que podem exibir uma variedade de formas físicas e estruturas químicas ou naturais que são, geralmente, facilmente degradados sem causar danos ao meio ambiente e

possuem baixo custo se comparados aos sintéticos (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; MENDES et al., 2011).

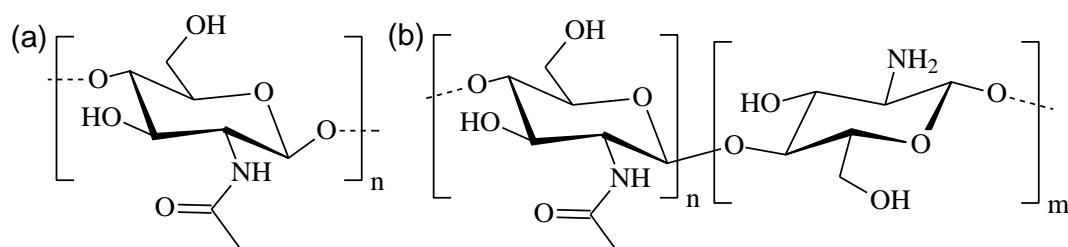
Os suportes mais adequados para uso industrial são os inorgânicos, uma vez que possuem elevada resistência mecânica, alta estabilidade e resistência ao ataque microbiano (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014). Um suporte híbrido por sua vez, pode conter as propriedades orgânicas e inorgânicas dos materiais que o constitui.

Dentre os muitos suportes considerados e estudados para a imobilização de enzimas, sejam orgânicos, inorgânicos, naturais ou sintéticos, destaca-se a quitosana, uma vez que, este biopolímero possui a maior parte das características necessárias a um suporte adequado (KRAJEWASKA, 2004; MENDES et al., 2011).

1.5.3 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo encontrado naturalmente em certas espécies de fungos, entretanto sua principal fonte é a desacetilação da quitina, que é encontrada em cascas de crustáceos. A cadeia polimérica da quitosana é formada predominantemente por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-deoxi-D-glucopirranose, Figura 4 (a), (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; BARROS et al., 2006). É um polímero natural, de baixo custo, renovável e biodegradável (MENDES et al., 2011). A quantidade de monômeros desacetilados, grau de desacetilação, define a forma do biopolímero predominante, isto é, o biopolímero é considerado quitosana quando apresenta grau de desacetilação maior que 50% (BARROS et al., 2006).

Figura 4. Representação da molécula de (a) Quitina e (b) Quitosana



Fonte – Arquivo Pessoal

Produtos que contêm quitosana em sua estrutura têm sido cada vez mais desenvolvidos em um amplo espectro de aplicações, como no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos, na agricultura, na indústria de celulose e papel,

na indústria de cosméticos e em produtos de higiene pessoal. Devido às suas propriedades químicas e biológicas únicas, a quitosana possui aplicações em áreas como a medicina e biotecnologia. Tais propriedades incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, inércia fisiológica, afinidade notável com proteínas, propriedades antitumorais e anticlistéricas (KRAJEWSKA, 2004; SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999).

Na medicina, a quitosana pode ser empregada como sistemas de distribuição controlada de drogas (*Drug Delivery*), células artificiais, membranas de hemodiálise, lentes de contato, pele artificial dentre outras. Por outro lado, em biotecnologia, os materiais contendo quitosana podem ser aplicados em matrizes cromatográficas, membranas para separação e em especial como suportes para a imobilização de enzimas (KRAJEWSKA, 2004).

Apesar das propriedades biológicas inquestionáveis que a quitosana possui, para a imobilização de enzimas, é necessário que se faça alterações em sua estrutura, para se obter um suporte quimicamente mais resistentes ao meio ácido, visto que os grupos amina primária presentes em sua estrutura conferem solubilidade em meio ácido em pH <6,5. (KRAJEWSKA, 2004; MENDES et al., 2011).

Os métodos de preparação de suportes para a imobilização de enzimas contendo quitosana podem ser divididos em quatro grupos: Método de evaporação do solvente, de neutralização, de reticulação e de gelificação ionotrópica (KRAJEWSKA, 2004).

No método de reticulação estão envolvidas reações por agentes bifuncionais que podem ocorrer tanto com os grupos amino e hidroxilas da quitosana. Estas modificações na estrutura da quitosana pode ser realiza com diferentes agentes de reticulação, como glicidol, epicloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído e genipina (MENDES et al., 2011). O agente de reticulação mais utilizado na modificação da quitosana é o glutaraldeído, devido a facilidade de utilização e disponibilidade de grupos amino, tanto na quitosana quanto nas enzimas, para a reação com glutaraldeído (KRAJEWSKA, 2004).

Na reação do glutaraldeído com quitosana ocorre a formação de uma ligação covalente irreversível entre os grupos amino da quitosana e aldeído do glutaraldeído

que resiste a valores extremos de temperatura e pH (MENDES et al.,2011). O mecanismo da reação pode ser explicado pela interação entre os grupos amino livres da quitosana com o grupo aldeído do glutaraldeído, formando uma base de Schiff, ligação imina, considerando três aspectos: (i) durante a reação forma-se apenas uma base de Schiff entre o grupo amino da quitosana e o grupo aldeído, permanecendo livre o outro grupo aldeído que seria utilizado na reação seguinte, a imobilização da enzima; (ii) a reticulação é formada entre duas unidades de grupo amina da quitosana com apenas uma molécula de glutaraldeído, formando de duas bases de Schiff e (iii) Há ocorrência de polimerização com os grupos amino da quitosana, já que a reticulação é formada não apenas com uma molécula de glutaraldeído (MONTEIRO; AIROLDI, 1999).

1.7 Papaína

A papaína é uma enzima de origem vegetal presente nas folhas e nos frutos do mamão (*Carica Papaya Line*), sua estrutura consiste na presença de 212 resíduos de aminoácidos. (RAŠKOVIC et al., 2015). A atividade enzimática da papaína é decorrente da presença do grupamento sulfidrila (SH) pertencente a cisteína presente em sua estrutura. (LEITE et al., 2012). A papaína é uma enzima proteolítica, sendo por tanto capaz de hidrolisar ligações peptídicas em aminoácidos. (PINTO et al., 2007).

Dentre as propriedades da papaína encontram-se, ação antiinflamatória, bactericida e bacteriostática, desbridante, aceleradora e modeladora do tecido de granulação e dos processos de cicatrização tecidual, dentre outras. (LEITE et al., 2012).

A papaína possui uma ampla faixa de aplicações, especialmente na indústria alimentar, como amaciante de carnes, na fabricação de cervejas, na indústria de laticínios e panificação (HOMAEI, 2015) outras aplicações potenciais dessa enzima incluem, remoção de cárie dentária, como um componente em cosméticos e detergentes, e tratamento de feridas (RAŠKOVIC et al. 2015; PERES et al., 2015).

A aplicação desse biocatalizador, em diversas tecnologias medicas e farmacêuticas têm estimulado o desenvolvimento de uma variedade de protocolos de imobilização (MORENO-CORTEZ; ROMERO-GARCÍA; GONZÁLEZ-

GONZÁLEZ,2015), uma vez que, em a aplicação industrial necessita da reutilização dessas enzimas, o que é assegurado pelo processo de imobilização (PERES et al., 2015) sendo portanto mais vantajoso a utilização de biocatalizadores imobilizados quando comparados ao seu homólogo solúvel (HOMAEI, 2015).

Neste sentido, há interesse de desenvolvimento de novos suportes híbridos que sejam eficazes para a imobilização de enzimas via ligação covalente, visando o emprego dos mesmos em diversas aplicações, incluindo a castração química de animais.



Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver suportes híbridos contendo óxido metálicos nanoparticulados, biopolímero quitosana e a enzima papaína com vistas na aplicação para castração química de animais.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) e de magnetita (Fe_3O_4 NPs);
- ✓ Desenvolver suportes híbridos contendo, ZnO NPs e Fe_3O_4 NPs e quitosana;
- Investigar a cristalinidade dos materiais híbridos por Difractometria de raios-X;
- ✓ Caracterizar os materiais por Espectroscopias Eletrônica e Vibracional nas regiões do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e Infravermelho, respectivamente;
- ✓ Investigar a capacidade de transporte de carga das ZnO NPs, Fe_3O_4 NPs, do suporte ZnO/quitosana e da papaína imobilizada por eletroquímica utilizando a técnica de voltametria cíclica;
- ✓ Avaliar o comportamento citotóxico da enzima imobilizada frente a macrófagos e eritrócitos;
- ✓ Avaliar a capacidade de ativação de macrófagos da enzima imobilizada.



Parte Experimental

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

Os materiais e reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados na Tabela 1. Estes foram de grau analítico sem a necessidade de purificação adicional. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, sistema Purelab Option-Q (Elga), com resistividade 18,2 M Ω cm.

Tabela 1. Materiais e reagentes utilizados e suas procedências

Reagentes	Procedência
Ácido Acético P.A. (Glacial) – CH ₃ COOH	Netec
Acetato de Zinco II dihidratado - Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	Synth
Cloreto de ferro hexahidratado – FeCl ₃ 6H ₂ O	Sigma Aldrich
Cloreto de ferro tetrahidratado - FeCl ₂ 4H ₂ O	Sigma Aldrich
Glutaraldeído, 25%	Sigma Aldrich
Hidróxido de sódio – NaOH 99%	Impex
Hidróxido de amônio NH ₄ OH (30 %)	Dinâmica Química ®
Papaína	Galeno
Quitosana	Padetec-UFC*

*Adquirida na empresa Polymar Ciência e Nutrição S/A localizada no parque de desenvolvimento tecnológico da Universidade Federal do Ceará

Fonte – Arquivo Pessoal

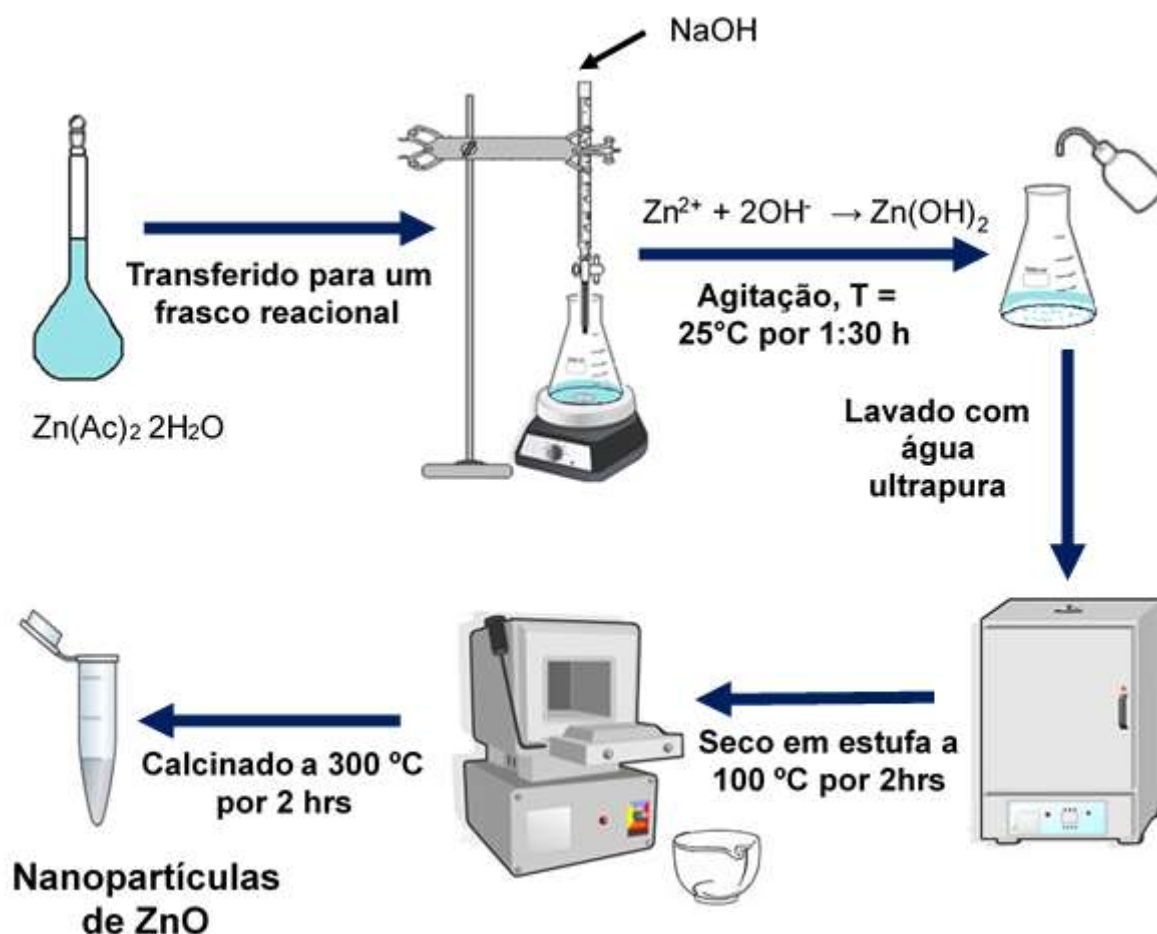
3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Síntese das Nanopartículas de Óxido de Zinco – ZnO NPs

As nanopartículas de óxido de zinco foram sintetizadas pelo método de coprecipitação como descrito por Pudukudy e colaboradores (PUDUKUDY; HETIEQA; YAAKOBA, 2014) com algumas modificações. Em um frasco reacional contendo 25 mL de acetato de zinco dihidratado 0,1 mol.L⁻¹ (2,5 mmol), adicionou-se gota a gota 50 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ (5 mmol), quando observou-se a formação de uma suspensão coloidal de coloração branca (Zn(OH)₂). A mistura foi

deixada sob agitação magnética constante por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após a decantação o precipitado branco foi lavado três vezes com água ultrapura e seco em estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas e finalmente calcinado em forno mufla por 2 horas a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto, para se obter as nanopartículas de ZnO. Na Figura 5 está ilustrado as etapas de preparação das ZnO NPs.

Figura 5. Representação esquemática da síntese das ZnO NPs



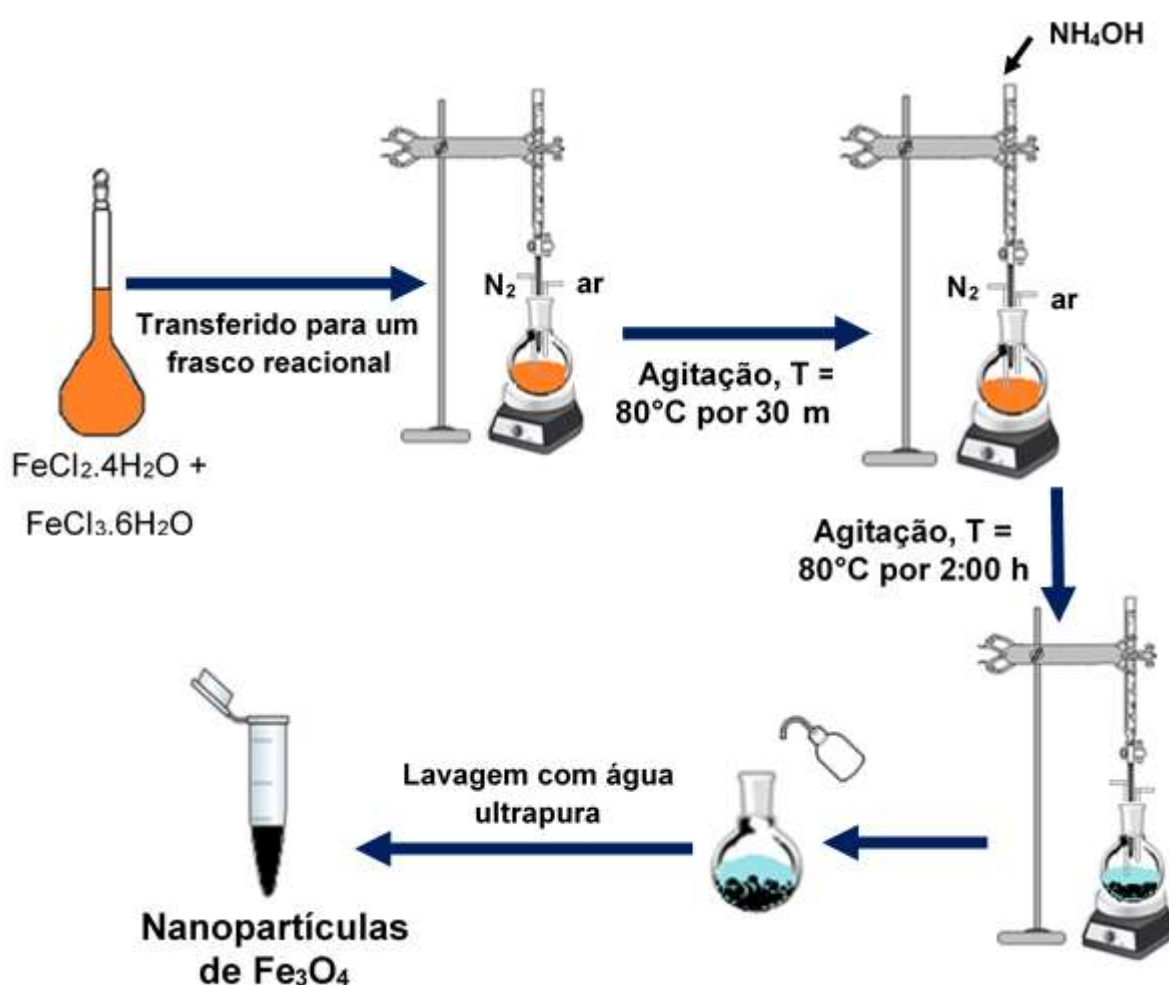
Fonte – Arquivo Pessoal

3.2.2 Síntese das Fe_3O_4 NPs

As nanopartículas de magnetita, Fe_3O_4 NPs, foram sintetizadas pelo método de coprecipitação (ZANG et al., 2014). Inicialmente preparou-se 50 mL de uma solução contendo 1,99g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,01 mol) e 5,4g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 mol), na proporção de 1:2, em seguida essa mistura foi transferida para um frasco

reacional, no qual foi submetida a agitação magnética vigorosa, sob atmosfera de N_2 e aquecimento a $80\text{ }^\circ\text{C}$. Após 30 minutos de reação, adicionou-se gota a gota 10 mL NH_4OH a $7,2\text{ mol.L}^{-1}$ ($0,07\text{ mol}$) para obtenção de um precipitado de coloração preta, característico das Fe_3O_4 NPs, que foi mantido nas condições iniciais por duas horas. Finalmente, o precipitado foi lavado com água ultrapura até que pH 7 fosse atingido, com auxílio de um imã. Por fim o precipitado foi seco em estufa a $90\text{ }^\circ\text{C}$ por 3 horas. A Figura 6 mostra o esquema de síntese das Fe_3O_4 NPs.

Figura 6. Representação esquemática da síntese das Fe_3O_4 NPs



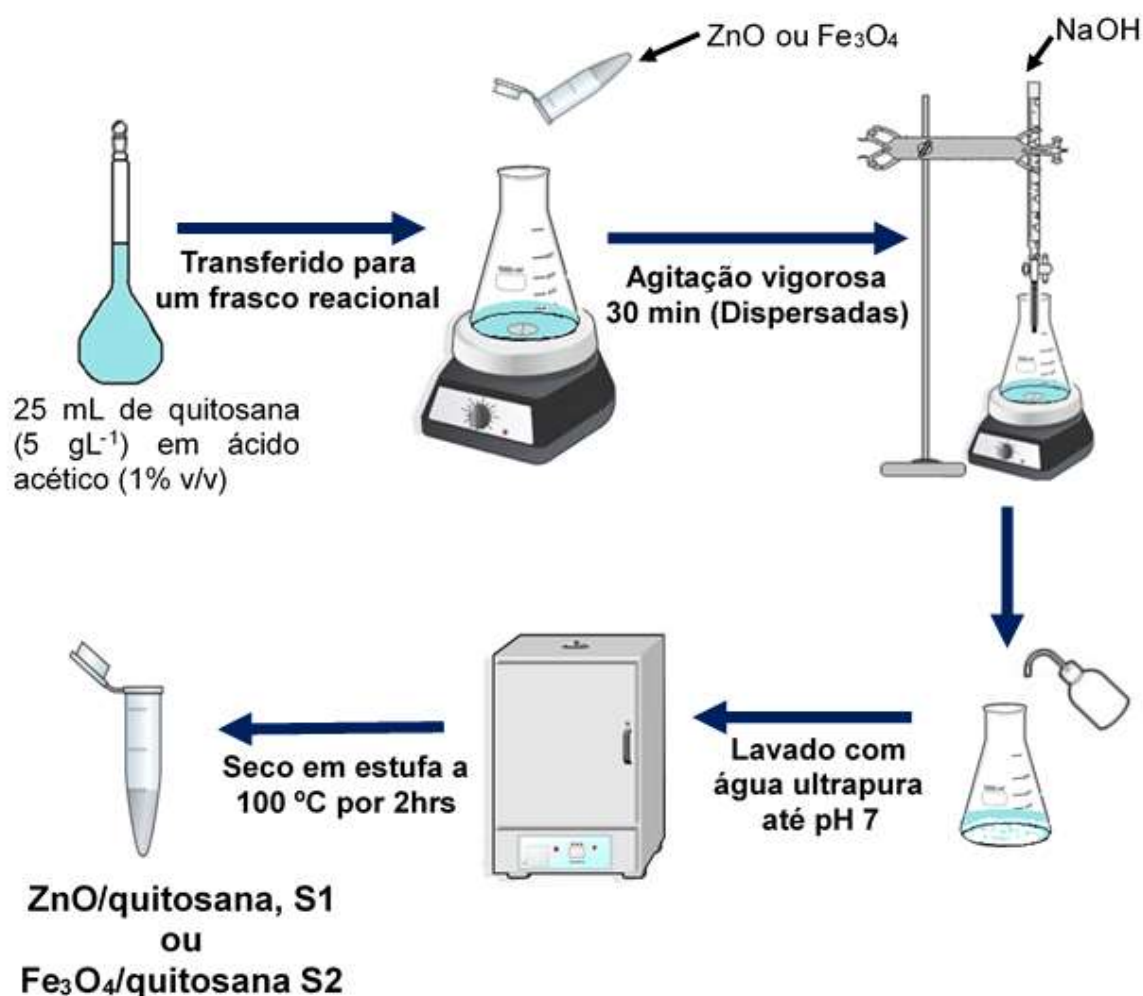
Fonte – Arquivo Pessoal

3.2.3 Síntese dos suportes ZnO/Quitossana e Fe_3O_4 /Quitossana

A preparação dos suportes foi realizada como descrito por Zang e colaboradores (ZANG et al., 2014) com algumas modificações. A preparação dos

suportes ZnO/quitosana (S1) ocorreu da seguinte forma: inicialmente 125 mg de quitosana foram totalmente dissolvidas em 25 mL de ácido acético (1% v/v), que em seguida foram transferidas para um frasco reacional. Após esta etapa adicionaram neste frasco 350 mg de ZnO NPs. A mistura foi então mantida por 30 minutos sob agitação magnética constante a fim de que as nanopartículas se dispersassem na solução. Em seguida, 25 mL de NaOH 1,0 molL⁻¹ foram adicionados sobre a mistura para que ocorresse a precipitação da quitosana sobre as ZnO NPs. O precipitado de coloração branca foi lavado com água ultrapura até que a dispersão atingisse o pH igual a 7 e reservado para a imobilização. A síntese do suporte Fe₃O₄/quitosana (S2) ocorreu de forma análoga, entretanto utilizou-se 1,0 g das Fe₃O₄ NPs na segunda etapa. O suporte Fe₃O₄/quitosana (S2) possui coloração marrom. A Figura 7 mostra o esquema de preparação dos suportes.

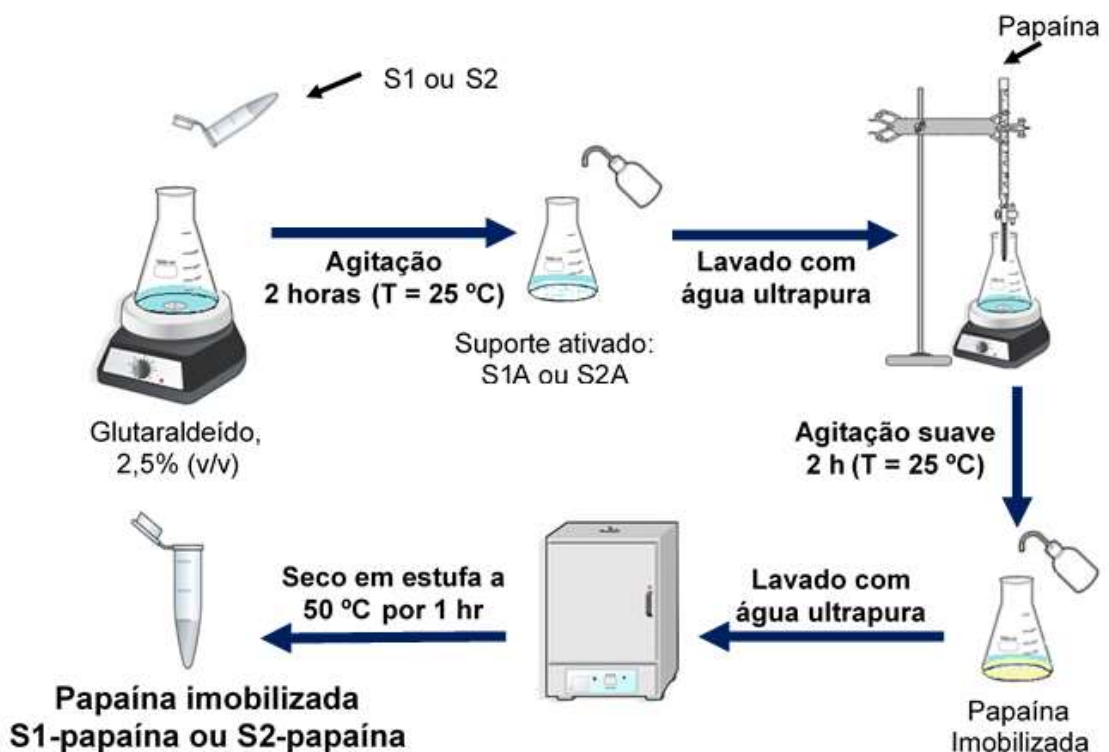
Figura 7. Representação esquemática para preparação dos suportes S1 e S2



3.2.4 Imobilização da Papaína

A papaína foi imobilizada covalentemente nos suportes S1 e S2 pelo método de ativação com glutaraldeído. Com intuito de obter os suportes ativados S1A e S2A, adicionou-se 330 mg do suporte S1 (ou S2) sobre 10 mL de uma solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v), que permaneceu sob agitação constante por 2 horas a temperatura ambiente ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida, lavou-se o suporte por três vezes com água ultrapura para remover o excesso de glutaraldeído. Ao suporte ativado, foi adicionado 16,5 mL de uma solução de papaína a $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, que permaneceu sob agitação magnética suave por 2 horas a temperatura ambiente ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), para que ocorresse a imobilização por ligação química. O precipitado de coloração levemente amarelada (S1-papaína) ou marrom (S2-papaína) foi ainda lavado três vezes com água ultrapura com a finalidade de remover o excesso de papaína que não reagiu, e finalmente seco em estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora (ZANG et al., 2014). O esquema da imobilização da papaína nos suportes S1 ou S2 está ilustrado na Figura 8.

Figura 8. Representação esquemática da imobilização da papaína no suporte ZnO/quitosana



3.3 Caracterizações

3.3.1 Difractometria de Raios-X

As análises de difração de raios X foram realizadas utilizando um difratômetro de raios X Empyrean Instrument (PANanalytical) com velocidade de varredura de 0,026°/min, com intervalo de 10 a 90° e radiação de cobalto (Co-K α 1 = 1,7902 Å). O tamanho do cristalito das ZnO NPs e das Fe₃O₄ NPs foi estimado utilizando-se dados das análises de DRX por meio da equação de Debye-Scherrer (Eq. 2), em que λ é o comprimento de onda do raio X (sendo para Co-K, $\lambda=1,7902$ A); K refere-se a constante de Scherrer e foi dotado como 0,89 para estruturas hexagonais e 0,9 para materiais esféricos; β é a largura a meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade em radianos; θ o ângulo de Bragg e D corresponde ao tamanho do cristalito.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (2)$$

3.3.2 Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro UV-6100S 6100S Allcrom spectrophotometer (Mapada Instruments, Shanghai, China) de feixe duplo utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico. As amostras foram dispersas com o auxílio de banho ultrassônico.

3.3.3 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros da região do infravermelho (FTIR) das amostras, preparados em pastilhas de KBr, foram obtidos utilizando um aparelho de FTIR, modelo Spectrum 100 FTIR Spectrometer na região de 4000 a 400 cm⁻¹. Para a comparação entre os espectros dos materiais, os dados de absorvância (Abs) foram normalizados utilizando a Equação 3, de modo que os valores numéricos máximo e mínimo correspondessem a 1,0 e 0,0, respectivamente.

$$Abs_{normalizada} = \frac{(\text{Valor exp. Abs.} - \text{Valor mín. exp. Abs.})}{(\text{Valor máx. exp. Abs.} - \text{Valor mín. exp. Abs.})} \quad (3)$$

3.3.4 Microscopia Eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas em um microscópio TECNAI 20 da Universidade do Minho em Portugal, utilizando uma voltagem de aceleração de 200 KV. As amostras foram diluídas com água ultrapura e dispersas com o auxílio do banho ultrassônico, em seguida colocou-se uma gota da suspensão coloidal de cada material (ZnO NPs, S1, S1-Papaína, Fe₃O₄, S2, S2-papaína) sobre o grid (rede de cobre revestida de carbono), seco sob temperatura ambiente (T = 25 °C) e realizada a análise de MET.

3.3.5 Voltametria Cíclica

A capacidade de transporte de carga dos materiais sintetizados foi investigada na forma imobilizada como filme *cast*, que foi preparado utilizando deposição do material (ZnO NPs, S1, S1-papaína, Fe₃O₄ NPs, S2 e S2-papaína) via *drop coating* (gotejamento manual) em que 20 µL de uma dispersão de 1 mg mL⁻¹ foi depositado sobre a superfície de lamina de vidro recoberta com óxido condutor de estanho dopado com flúor (FTO, áreas = 0,2 cm² e 0,25 cm²). Utilizando uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio, K₃[Fe(CN)₆], com concentração de 5,0x10⁻³ mol L⁻¹ em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ e velocidade de varredura variando de 10 a 1200 mV s⁻¹. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando um potenciostato Autolab PGSTAT128N acoplado a uma cela eletroquímica convencional contendo três eletrodos, em atmosfera inerte. Eletrodos de calomelano saturado (ECS) e platina (área = 0,35 cm²) foram utilizados como referência e contra eletrodo respectivamente.

3.4 Teste de atividade da enzima imobilizada

3.4.1 Hidrólise do colágeno

A capacidade proteolítica da enzima imobilizada foi avaliada utilizando teste com gelatina, como demonstrado por Lima e colaboradores (2008). Neste ensaio, adicionou-se 10 mL de gelatina (preparadas seguindo as instruções presentes na embalagem) a quatro tubos de ensaio denominados tubos A, B, C e D. Em seguida, no tubo A adicionou-se 3 mL de água para o controle negativo, no tubo B adicionou-se 3 mL de papaína livre a 1 mg.mL⁻¹ para o controle positivo, no tubo C adicionou-

se 3mL S1-papaína e no tubo D adicionou-se S2-papaína a 10 mg.mL^{-1} , permanecendo sob agitação até homogeneização e finalmente resfriado por 4 horas. A capacidade de proteólise da enzima imobilizada foi avaliada mediante a observação de formação de gel.

3.4.2 Degradação da caseína pela papaína imobilizada

No teste de degradação da caseína para 10 mL de leite adicionou-se 10 mL da dispersão de papaína imobilizada 6 mg.mL^{-1} , que permaneceu sob agitação constante durante 24 horas a temperatura ambiente ($T=25 \text{ }^\circ\text{C}$). A degradação da caseína foi acompanhada por espectrofotometria na região do UV-vis e os espectros foram registrados a partir de uma dispersão contendo uma gota do meio reacional em 6 mL de água, ao longo do tempo (5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 minutos e 24 horas) (CARREIRA et al., 2003).

3.5 Ensaios de Citotoxicidade

3.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c (20-30 g), machos e fêmeas de 4-5 semanas de vida, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais NPPM-UFPI, mantidos a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e ciclo claro escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após tranquilização e sedação por injeção intraperitoneal de uma associação de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80 mg/Kg de peso vivo) de acordo com a RESOLUÇÃO Nº 1000, DE 12 DE MAIO DE 2012, CRMV (Conselho Regional de Medicina Veterinária), as eutanásias foram realizadas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, CFMV-PI Nº 0335. Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI Nº 022/15).

3.5.2 Células

As células utilizadas foram macrófagos de camundongos BALB/c e eritrócitos de carneiros do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os

macrófagos foram isolados do peritônio de camundongos BALB/c, de sexo masculino ou feminino, entre 5 a 6 semanas de vida (20 a 25,0 g), provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM/CCS/UFPI).

3.5.3 Citotoxicidade em eritrócitos

Para a avaliação da atividade hemolítica utilizou-se eritrócitos de carneiro, coletado com anticoagulante (EDTA). Os eritrócitos coletados foram diluídos em 80 μL de PBS, a concentração do sangue foi ajustada para 5 % de hemácias. Em seguida, foi adicionado, separadamente, papaína livre e papaína imobilizada, nas concentrações de 800 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$, diluídas num volume de 20 μL de PBS, em seguida a placa foi incubada por 1 h a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de PBS. Logo após, as suspensões foram centrifugadas a 1000 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para leitura a um comprimento de onda de 550 nm, a fim de quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.5.4 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT

Em placa com 96 poços foram adicionados 100 μL de meio RPMI 1640 suplementado com cerca de 2×10^5 macrófagos por poço e, incubados a 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas para adesão celular. Após esse período, foram feitas duas lavagens com RPMI 1640 suplementado para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de meio e das enzimas livre e imobilizada diluídas nas concentrações de 800 a 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata. Após esta etapa, a placa foi incubada por 48 h e, ao término deste período foi adicionando 10 μL de MTT diluído meio RPMI suplementado (5 mg mL^{-1}). A placa foi incubada novamente por 4 horas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de DMSO em todos os poços. A placa foi agitada por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente para dissolução completa do MTT-formazan. Por fim, a leitura foi realizada a 550 nm em leitora de placa, com resultados expressos

em termos porcentagem. O controle negativo foi realizado com meio RPMI a 0,2% de DMSO.

3.5.5 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos pela papaína pura e papaína imobilizada

3.5.5.1 Preparo de soluções

A solução estoque de corante de vermelho neutro foi preparada pela solubilização de 0,002 g de corante em 1 mL de DMSO. A solução de extração utilizada nos dois protocolos consistiu em ácido acético glacial 96% e etanol PA dissolvidos em água bidestilada. O zimosam corado para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 ml da solução estoque e 0,02 g de zimosam não opsonizado em 3 mL de PBS, já o fixador utilizado foi o de Baker formal-cálcio constituído por formaldeído 4% v/v, cloreto de sódio 2% p/v e acetato de cálcio 1% p/v em água destilada.

3.5.5.1 Avaliação e determinação da capacidade fagocítica

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com as soluções de papaína livre e papaína imobilizada por 48 h estufa a 37°C e a 5% de CO₂, após esse período foi adicionado 10 µL de solução de zimosan corado e novamente foram incubados por 30 min a 37°C. Em seguida adicionou-se 100 µL de fixador de Baker para paralisar o processo de fagocitose e após 30 minutos, a placa foi lavada com salina 0,9 % a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitado pelos macrófagos. Após remoção do sobrenadante adicionou-se 100 µL de solução de extração. Feito isso a placa foi agitada para solubilização em agitador de Kline. Por fim as absorbâncias foram medidas a 550 nm.



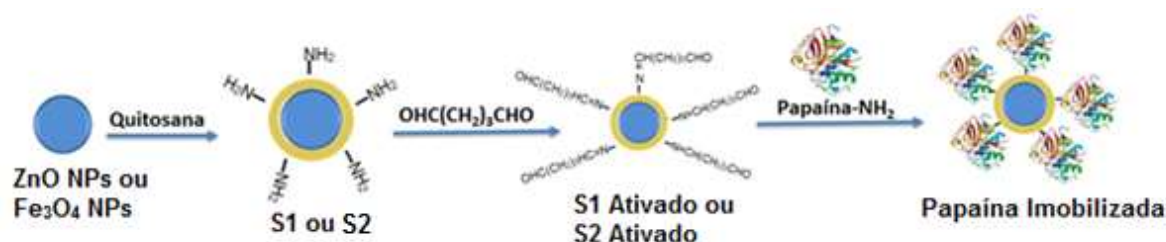
Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese, estrutura molecular e cristalinidade

A papaína foi imobilizada em suportes contendo ZnO NPs e quitosana ou Fe_3O_4 NPs e quitosana, através do método de ativação via glutaraldeído, com vistas na aplicação para a castração química de cães, conforme exposto na parte experimental. A Figura 9 ilustra a representação esquemática para a imobilização da papaína nos suportes híbridos. Inicialmente a quitosana foi dissolvida em ácido acético, pH 5,0 ocorrendo protonação dos grupos $-\text{NH}_2$ presentes na estrutura do biopolímero, em seguida adicionou-se ZnO NPs (ou Fe_3O_4) ocorrendo assim a formação dos suportes S1-ZnO/quitosana (ou S2- Fe_3O_4 /quitosana), provavelmente, através de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio formadas pela interação entre átomos de oxigênio das nanopartículas e nitrogênio da quitosana, que interagem eletrostaticamente com a superfície das nanopartículas de ZnO ou Fe_3O_4 , após ajuste do pH para 14 pela adição de NaOH. Em seguida, os grupos $-\text{NH}_2$ da quitosana são convertidos em grupos aldeídos via adição de glutaraldeído e finalmente a enzima é então ligada covalentemente ao suporte (FAHAMI; BEALL, 2015; QI; XU, 2004).

Figura 9. Representação esquemática para imobilização da papaína no suporte híbrido

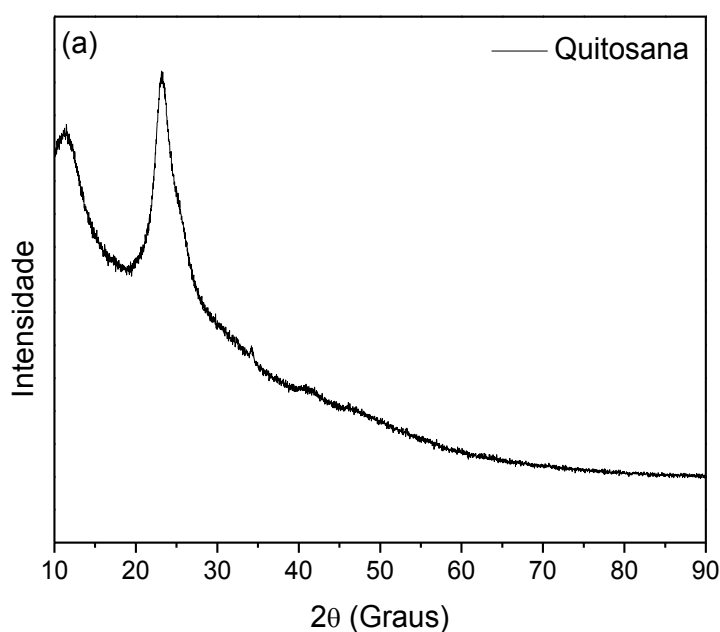


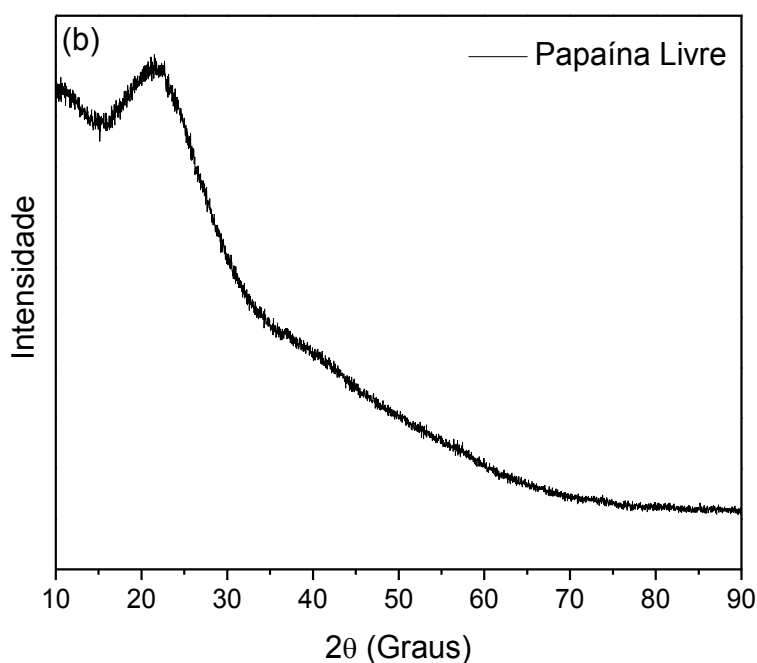
Fonte – Arquivo Pessoal

A organização e estrutura molecular dos materiais sintetizados e de seus precursores foram investigados por difratometria de raios X (DRX). Na Figura 10 estão dispostos os difratogramas da quitosana e papaína. Para a quitosana (Figura 10 (a)) os picos em $2\theta = 12^\circ$ e $2\theta = 23^\circ$ são atribuídos a rede cristalina α desse biopolímero, uma vez que as fortes interações intermoleculares e intramoleculares provenientes das ligações de hidrogênio existentes nos grupamentos hidroxila,

amina e outros grupos funcionais presentes na molécula conferem um perfil semicristalino a esse polímero (KUMAR, 2004; URAGAMI; TOKURA, 2006; KRISHNAMOORTHY et al.,2012). Por outro lado, o pico de difração em $2\theta = 23^\circ$ presente no difratograma da papaína, Figura 10 (b), é referente a larga extensão dos sítios ativos da enzima que podem ser divididos em 7 domínios em que cada um deles acomoda um resíduo de aminoácido do substrato peptídico. Nesses domínios há presença de fendas onde ocorre o encaixe do substrato, o que acaba por conferir um perfil semicristalino a papaína (SCHECHTER, 1967; SCHRBDER et al., 1993).

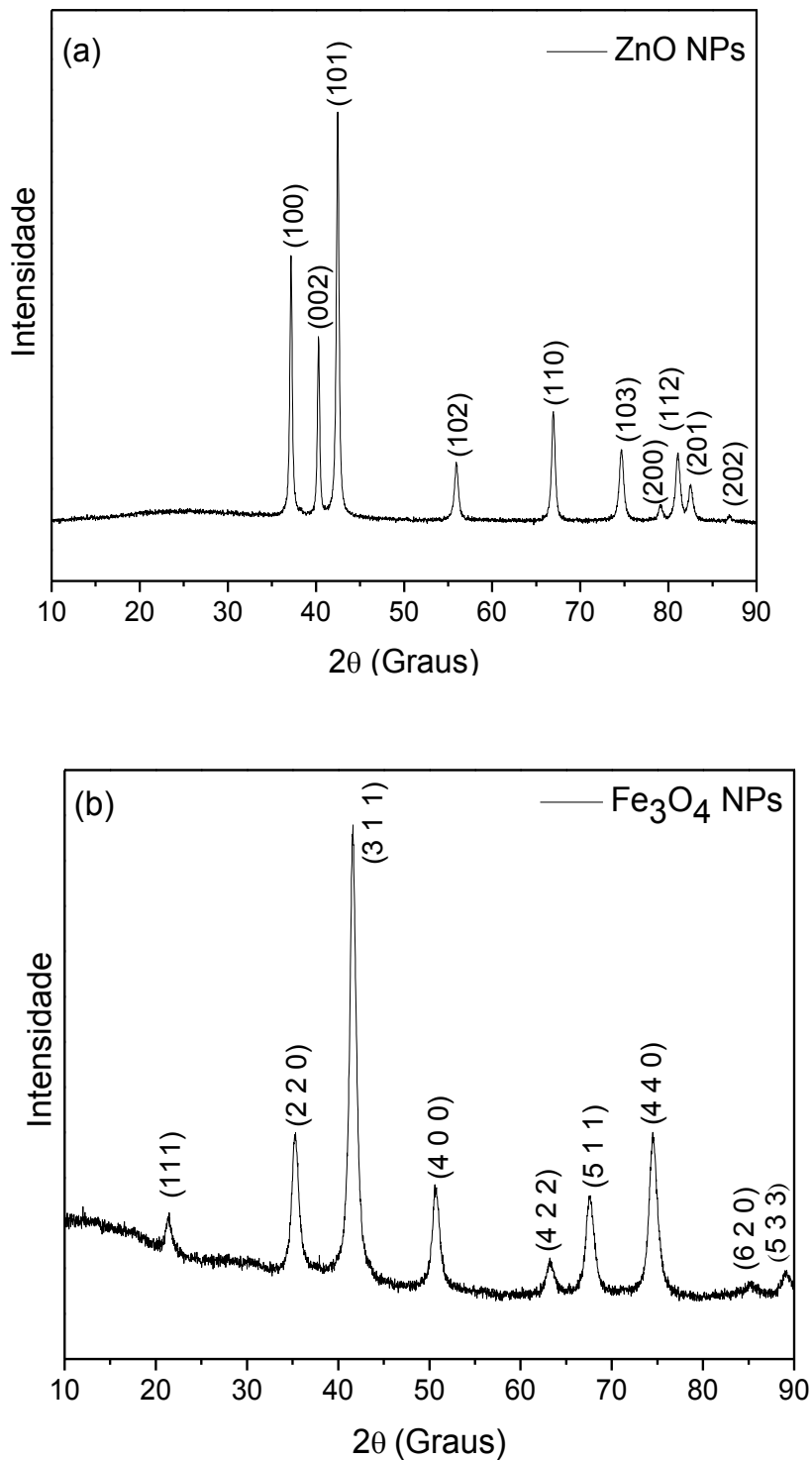
Figura 10. Difratogramas para (a) Quitosana e (b) Papaína Livre





A Figura 11 ilustra os difratogramas para (a) ZnO NPs e (b) Fe₃O₄ NPs. As ZnO NPs apresentam 10 picos cristalinos em $2\theta = 37^\circ, 40^\circ, 32^\circ, 55^\circ, 66^\circ, 74^\circ, 79^\circ, 81^\circ, 82^\circ$ e 87° que são referentes aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201) e (202), respectivamente, correspondendo a estrutura hexagonal do tipo wurtzita de acordo com o padrão JCPDS No. 03-065-3411. O difratograma das Fe₃O₄ NPs, Figura 11 (b), apresentou nove picos em: $2\theta = 21^\circ; 35^\circ; 41^\circ; 50^\circ; 63^\circ; 67^\circ; 74^\circ; 85^\circ$ e 89° referentes aos planos (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620) e (533), respectivamente. A posição e a intensidade dos picos de difração observados para a magnetita correspondem a estrutura cristalina cúbica de espinélio invertido, de acordo com o padrão JCPDS 01-088-0315 (ZHANG et al., 2010).

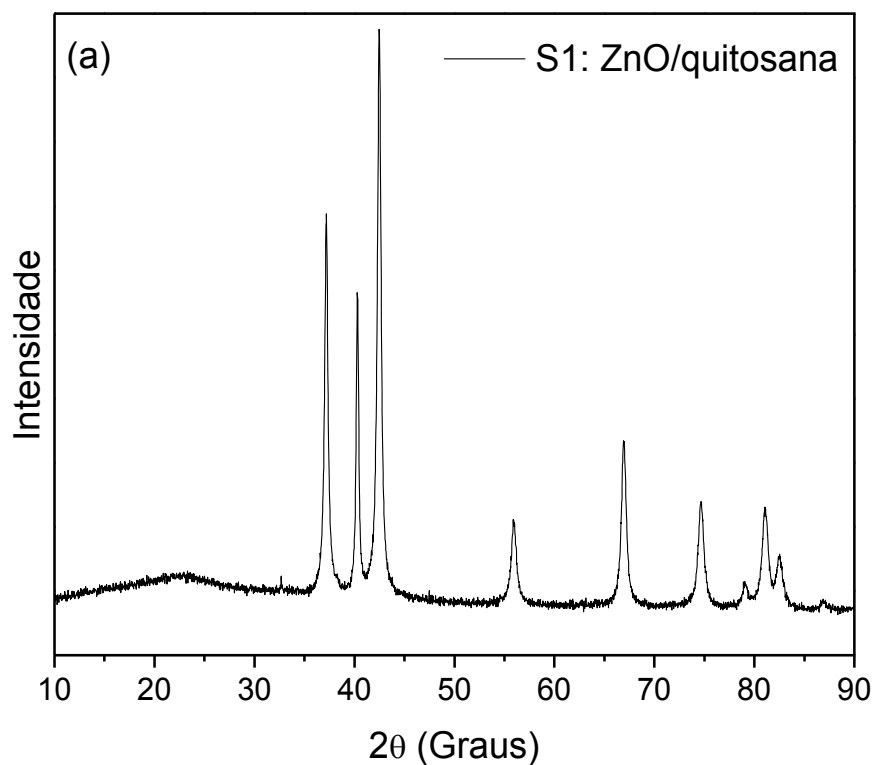
Figura 11. Difractogramas para (a) ZnO NPs e (b) Fe₃O₄ NPs

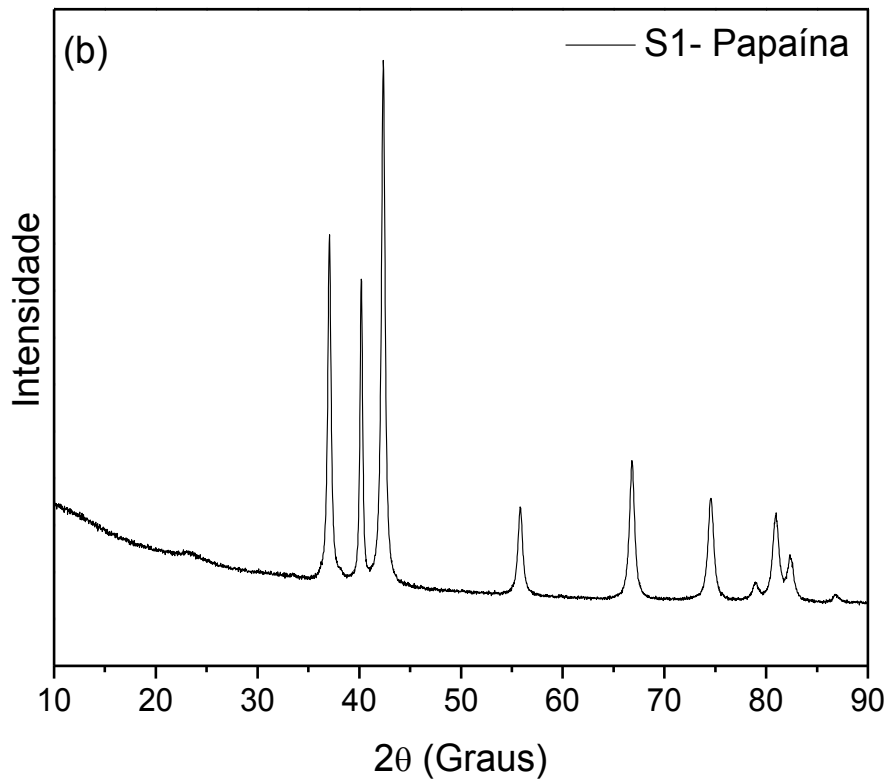


No padrão cristalográfico para o suporte S1: ZnO/quitosana, observou-se a presença de todos os picos cristalinos referentes a fase hexagonal das ZnO NPs (Figura 12 (a)), bem como a presença de um pico de baixa intensidade em $2\theta = 23^\circ$ que foi atribuído a rede cristalina α da quitosana, presente no suporte, S1, uma vez

que esta possui certo grau de cristalinidade (KUMAR, 2004; URAGAMI; TOKURA 2006). No difratograma da papaína imobilizada, S1-Papaína (Figura 12 (b)), a presença do pico em $2\theta = 23^\circ$ provavelmente ocorre devido uma sobreposição dos picos referentes a quitosana e a papaína que também possui certa cristalinidade, entretanto a característica do pico sugere que este seja proveniente da papaína (SCHECHTER, 1967).

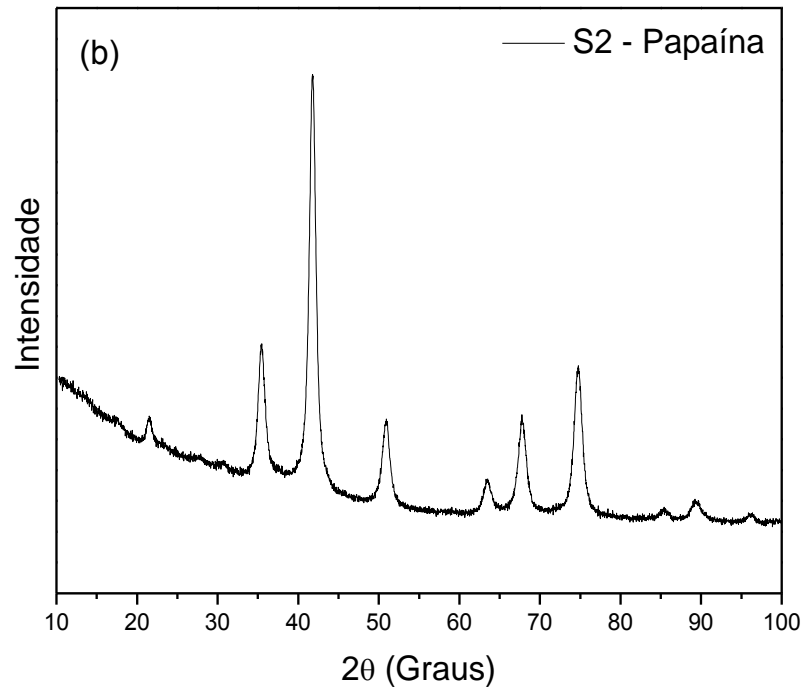
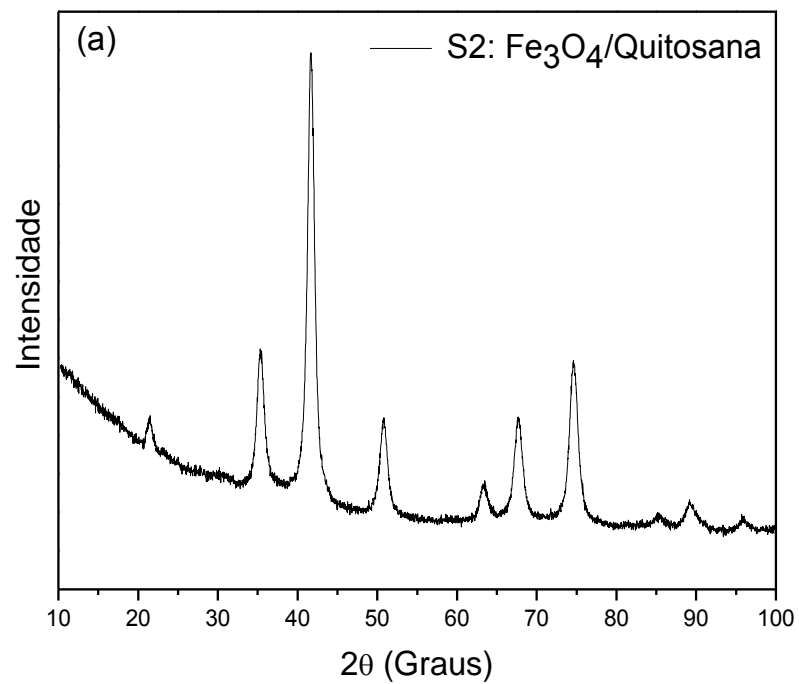
Figura 12. Difratogramas para (a) S1: ZnO/quitosana e (b) S1-Papaína





Nos padrões cristalográficos do suporte S2:Fe₃O₄/quitosana e da S2-Papaína, Figuras 13 (a) e (b) respectivamente, estão presentes todos os picos cristalográficos referentes a estrutura cubica de espinélio invertido das Fe₃O₄ NPs. Não é possível observar o pico característico da quitosana ou da papaína, entretanto a mudança da linha de base em torno de 10° a 20° sugere a incorporação desses materiais na estrutura da magnetita.

Figura 13. Difratomogramas para (a) S2 e (b) S2-papaína



O diâmetro médio estimado pela através da técnica de DRX a partir da formula de Scherrer, Eq. 2, foi de 29 e 13 nm para as ZnO NPs e Fe₃O₄ NPs, respectivamente. Outro fator que pode ser observado pela técnica de DRX é o índice de cristalinidade dos materiais, que foi calculado de acordo com a Eq. 4, em que, Xc

é o índice de cristalinidade, I_c é o somatório das integrais das áreas dos picos da fração cristalina e I_a é a área dos picos da fração amorfa. Para esse cálculo, considerou-se a faixa de 10 a 30° como fração amorfa e de 30° a 90° graus como fração cristalina (LIMA et al., 2012). Na Tabela 2 estão dispostos os índices de cristalinidade para as ZnO NPs, Fe₃O₄ NPs, suportes S1 e S2 e para a enzima imobilizada em S1 e S2.

$$X_c = \frac{I_c}{(I_c + I_a)} * 100 \quad (4)$$

Tabela 2. Índice de cristalinidade dos materiais sintetizados

Material	Índice de Cristalinidade (%) X_c
ZnO NPs	81,18
S1: ZnO/quitosana	83,47
S1-Papaína	86,83
Fe ₃ O ₄ Nps	91,43
S2: Fe ₃ O ₄ /quitosana	92,33
S2-Papaína	90,94

Nota-se pelos difratogramas que os picos cristalinos das ZnO NPs possuem intensidades ligeiramente menores que os picos do suporte S1, sugerindo um aumento no grau de cristalinidade do mesmo com a adição da quitosana às ZnO NPs, sendo confirmado com o valor de X_c . Similar comportamento foi observado para a enzima imobilizada. Além do estreitamento do pico em torno de 23°, que confere maior grau de cristalinidade para a enzima imobilizada em ZnO NPs. O aumento no índice de cristalinidade crescente com a adição de quitosana e papaína às ZnO NPs, respectivamente, sugere uma organização desses materiais na estrutura das ZnO NPs. É interessante destacar que nos difratogramas do S1 e da S1-papaína ocorreu uma alteração no pico referente ao plano 002, indicando que a interação entre esses materiais ocorre através dessa face da célula unitária das ZnO NPs. Sabe-se que o índice de cristalinidade do material está relacionado com o seu tamanho, assim para S1 e S1-papaína, o aumento na largura dos picos de difração, sugere que as nanopartículas possuem menor tamanho, esse fato foi confirmado pela estimativa de tamanho através da equação de Scherrer, Eq. 2, sendo 23 e 22 nm para o S1 e S1-papaína respectivamente.

A inserção de quitosana à estrutura das Fe₃O₄ NPs provocou um leve aumento na cristalinidade da mesma, que pode ser observado pelo incremento das intensidades dos picos de difração. Por outro lado, a adição de papaína ao suporte S2 leva a diminuição desse parâmetro, fato observado pela elevação da linha de base do difratograma, porém a adição desses materiais à sua estrutura não provoca alterações significativas no índice de cristalinidade das mesmas, permanecendo a estrutura cristalina das nanopartículas de magnetita inalterada (ZANG et al, 2014).

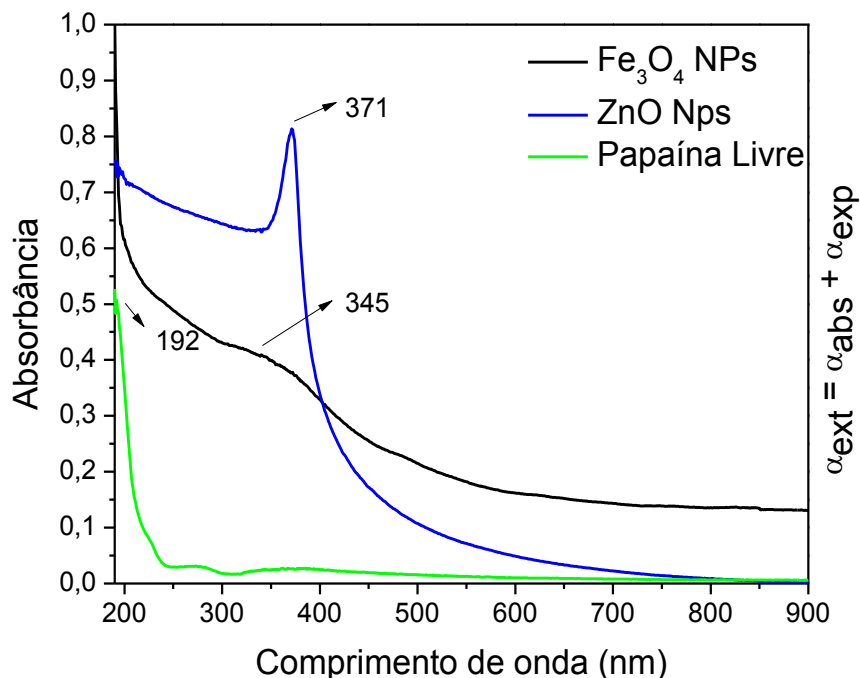
4.2 Investigação espectroscópica e reatividade

A fim de investigar a formação dos materiais em suspensão coloidal, foi realizado medidas de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta visível (UV-Vis). O indicativo da formação de materiais nanoparticulados pode ser evidenciado pelo aumento da linha de base, que é provocado pela dispersão da luz. Assim, de acordo com a lei de Mie, Eq. 5, ao irradiar um feixe de luz sob uma suspensão coloidal a absorção total ou coeficiente de extinção (α_{ext}) será igual ao somatório da radiação absorvida (α_{abs}) com a radiação espalhada (α_{esp}) (LU, 2013), fato esse observado nos espectros de absorção das ZnO NPs e das Fe₃O₄ NPs.

$$\alpha_{ext} = (\alpha_{abs}) + \alpha_{esp} \quad (5)$$

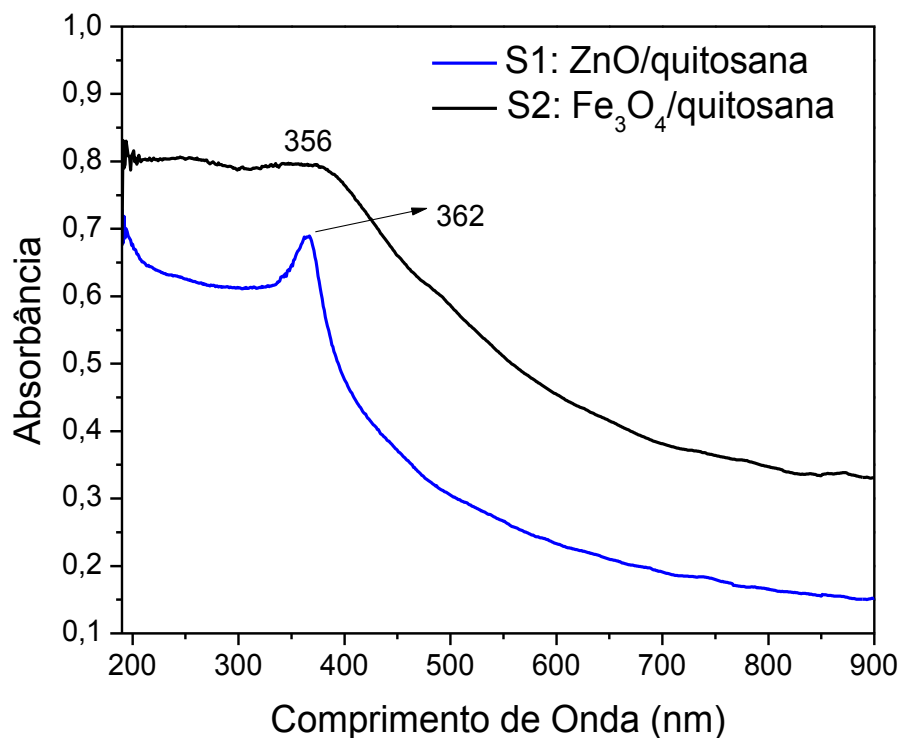
A Figura 14 ilustra os espectros de absorção no UV-vis para papaína livre, ZnO e Fe₃O₄ NPs. A absorção em 192 nm no espectro da papaína foi atribuída a transição eletrônica do orbital não ligante n para o orbital antiligante π desocupado ($n \rightarrow \pi^*$). Esse tipo de transição é possível devido a presença do grupo amina e amida presentes na estrutura da enzima (PAVIA, 2010). Para as ZnO NPs, a banda de absorção em 371 nm foi atribuída à absorção do *band gap* intrínseco do ZnO, característica deste material semicondutor, devido a transições de elétrons da banda de valência para a banda de condução ($O_{2p} \rightarrow Zn_{3d}$) (AZARANG, 2014). As Fe₃O₄ NPs não possuem banda de absorção plasmônica, apenas um aumento na absorção em torno de 350 nm e um aumento na linha de base ocasionado pelo efeito de dispersão pelas partículas em escala manométrica (SANTOS; MELO; CRESPILO, 2014; SILVA, 2015; MELO et al., 2013).

Figura 14. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para Papaína livre ($1,3 \text{ mg.mL}^{-1}$), ZnO ($0,2567 \text{ mol.L}^{-1}$) e Fe_3O_4 NPs



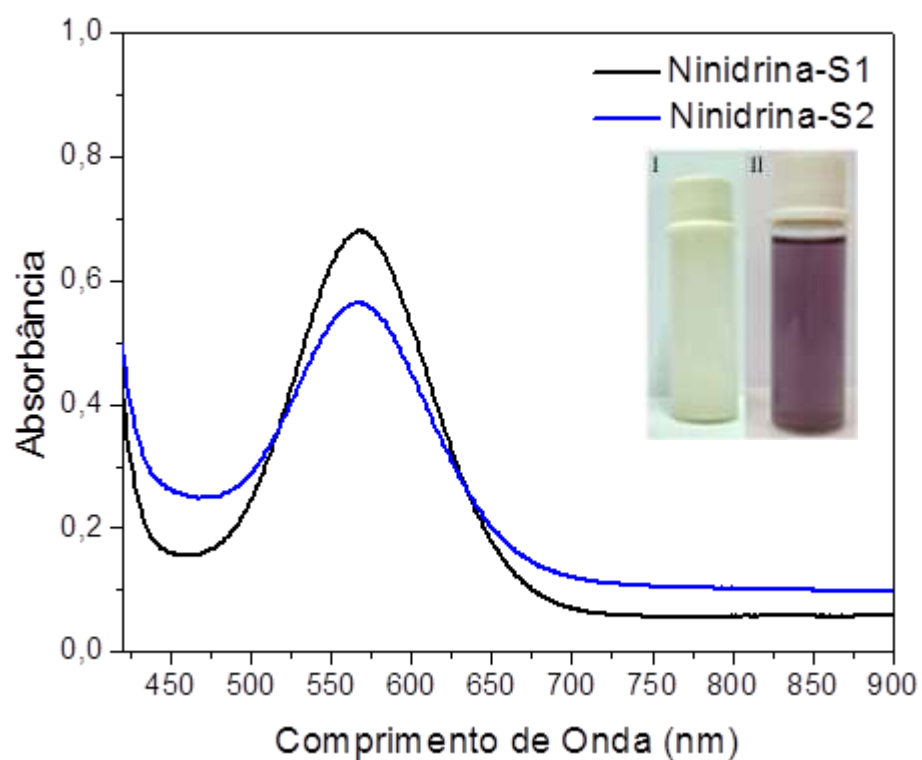
Nos espectros de UV-Vis para os suportes S1 e S2 (Figura 15), é possível notar uma absorção em 192 nm, atribuída a transição ($n \rightarrow \pi^*$) provenientes dos grupos NH_2 presentes na estrutura da quitosana. Também observou-se uma absorção em 362 nm que foi atribuída a transição do *band gap* intrínseco das ZnO NPs presentes no suporte S1. Para ao suporte S2, a elevação na absorção em torno de 356 nm ocorre devido a presença das Fe_3O_4 NPs. Neste caso, ambos materiais provocaram aumento na linha de base decorrente do espalhamento de luz, característico de materiais em escala manométrica (MELO et al., 2013).

Figura 15. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para S1 ($1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$) e S2 ($9,057 \text{ mg. mL}^{-1}$)



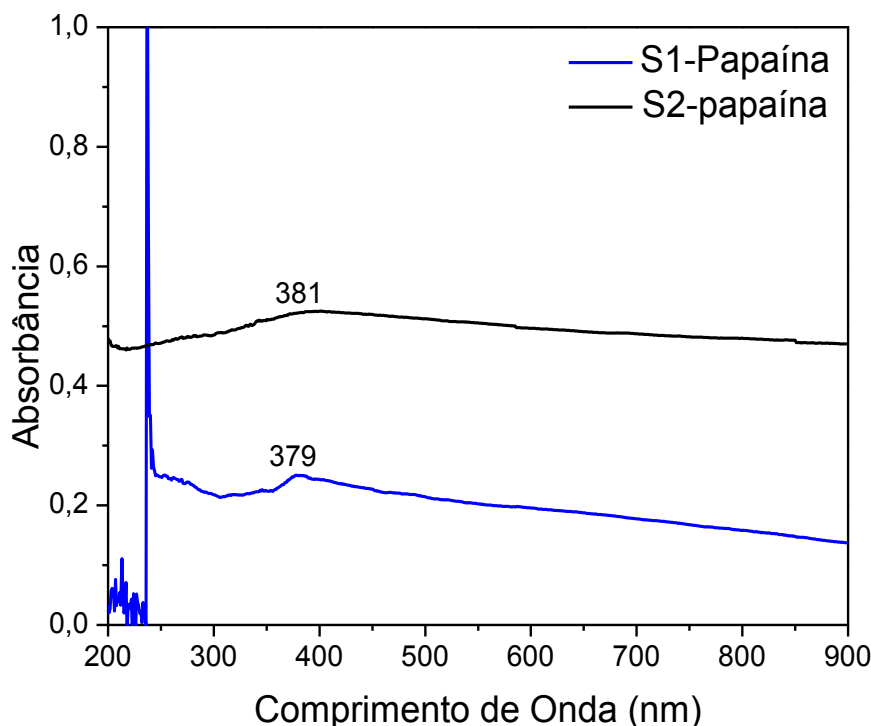
A presença de quitosana nos suportes S1 e S2 também foi evidenciada de maneira qualitativa através da reação com ninidrina, uma vez que, em determinadas condições, a ninidrina reage com grupos NH_2 livres formando um composto de coloração púrpura, o dicetohidríndilideno-dicetohidríndamina, conhecido como Roxo de Ruhemann. Esta reação pode ser confirmada por UV-Vis, uma vez que o Roxo de Ruhemann apresenta absorção característica em torno de 568 nm, como mostrado na Figura 16 (LU, 2013).

Figura 16. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para reação com ninidrina de S1 e S2 (I: Antes e II: Depois da reação com ninidrina).



No espectro eletrônico na região do UV-Vis para a enzima imobilizada (em S1 e S2), ilustrada na Figura 17, observou-se que a absorção características das ZnO NPs e Fe₃O₄ NPs sofreram deslocamento para 379 nm e 381 nm, respectivamente, podendo ser indicativo de interação entre esses materiais.

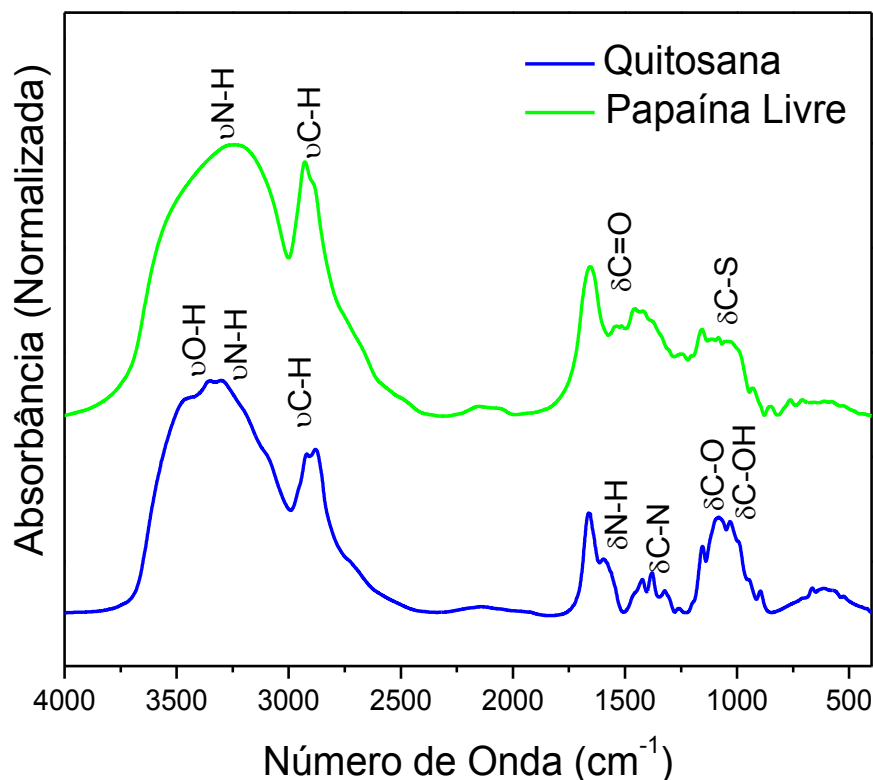
Figura 17. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para S1-Papaína (1,9 mg. mL⁻¹) e S2-Papaína (0,78 mg. mL⁻¹)



Na Figura 18 estão dispostos os espectros de FTIR para a quitosana pura e papaína livre. Para a quitosana o estiramento em torno de 3350 cm^{-1} foi atribuído aos estiramentos O-H e N-H e as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares das moléculas de quitosana. Os estiramentos em 2931 e 2875 cm^{-1} são típicas de $\nu\text{C-H}$, enquanto as vibrações de deformação em 1658 , 1583 , 1418 , 1315 cm^{-1} foram atribuídas a amida I, deformação $\nu\text{N-H}$ presente no grupo NH_2 , deformação axial $\nu\text{C-N}$ e da amida III, respectivamente. As vibrações em 1074 e 1034 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos C-O de C3-OH e C6-OH (DEHAGHI et al, 2014; CAI et al 2015). Para a papaína livre, a banda larga entre 3594 e 3033 cm^{-1} e 2931 cm^{-1} foram atribuídas aos OH, $\nu\text{N-H}$ da amina secundária e $\nu_{\text{ass}}\text{C-H sp}^3$. O espectro de FTIR da papaína também apresentou estiramentos em 1638 e 1532 cm^{-1} , correspondentes a vibrações de estiramento $\nu\text{C=O}$ de amida I e II, respectivamente. Similar atribuições foram atribuídas pela literatura (MAHMOUD et al., 2013). Na região entre 1074 e 928 cm^{-1} notou-se uma sobreposição de diversas bandas, nas quais, encontram-se presentes as deformações em 1050 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} e 844 cm^{-1}

provenientes dos estiramentos C-S de sulfeto e dissulfeto (PERES et al., 2015; SHARMA et al., 2011).

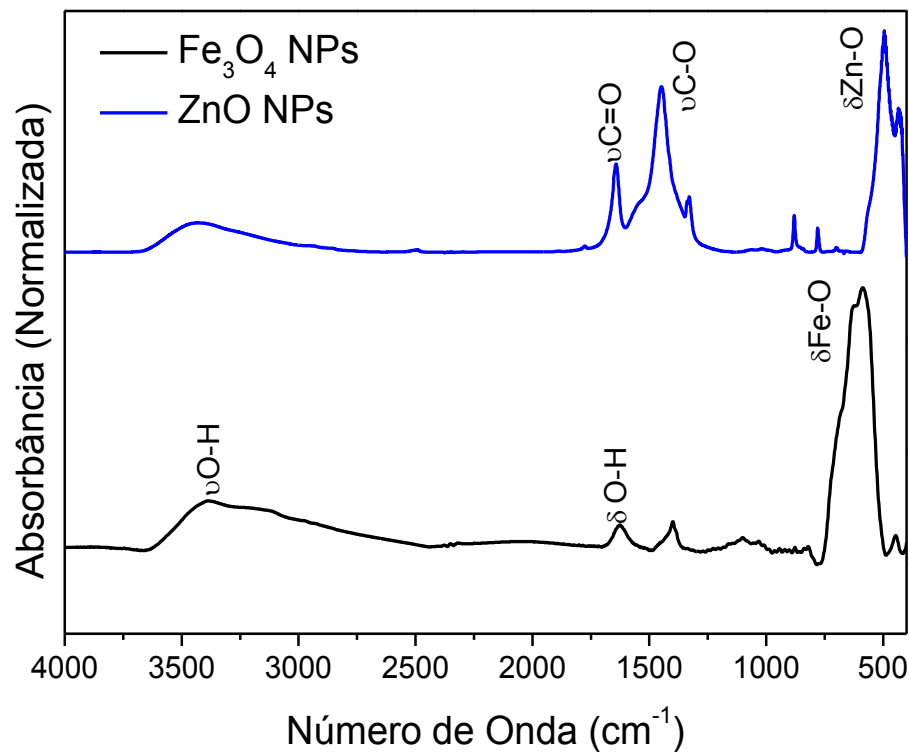
Figura 18. Espectros de FTIR para quitosana pura e papaína livre



A formação da estrutura molecular dos nanomateriais também foi investigada por FTIR. Para as ZnO NPs, Figura 19, o estiramento em 3646 cm⁻¹ foi atribuído a νO-H devido a presença de água de hidratação (MOHAJERANI et al., 2008). Os estiramentos em 1642 cm⁻¹ e 1448 cm⁻¹ são atribuídas as vibrações de C=O assimétrico e simétrico, respectivamente, pertencentes ao grupamento acetato (não removido durante as lavagens) (SHARMA; GHOSE et al, 2015). Um aumento na temperatura de calcinação do material acarretaria numa diminuição acentuada tanto nos estiramentos O-H quanto nas vibrações de C=O (SHARMA; GHOSE et al, 2015), entretanto a elevação da temperatura de calcinação das ZnO NPs acarretaria na formação de nanopartículas com propriedades modificadas e maior tamanho (PUDUKUDY; HETIEQA; YAAKOBA, 2014). A deformação intensa em 497 cm⁻¹ no espectro de FTIR das ZnO NPs foi atribuído a deformação νZn-O confirmando a formação das mesmas. No espectro de FTIR para as Fe₃O₄ Nps, Figura 17, nota-se a presença de estiramentos em 3401 e 1625 cm⁻¹ que foram atribuídos aos

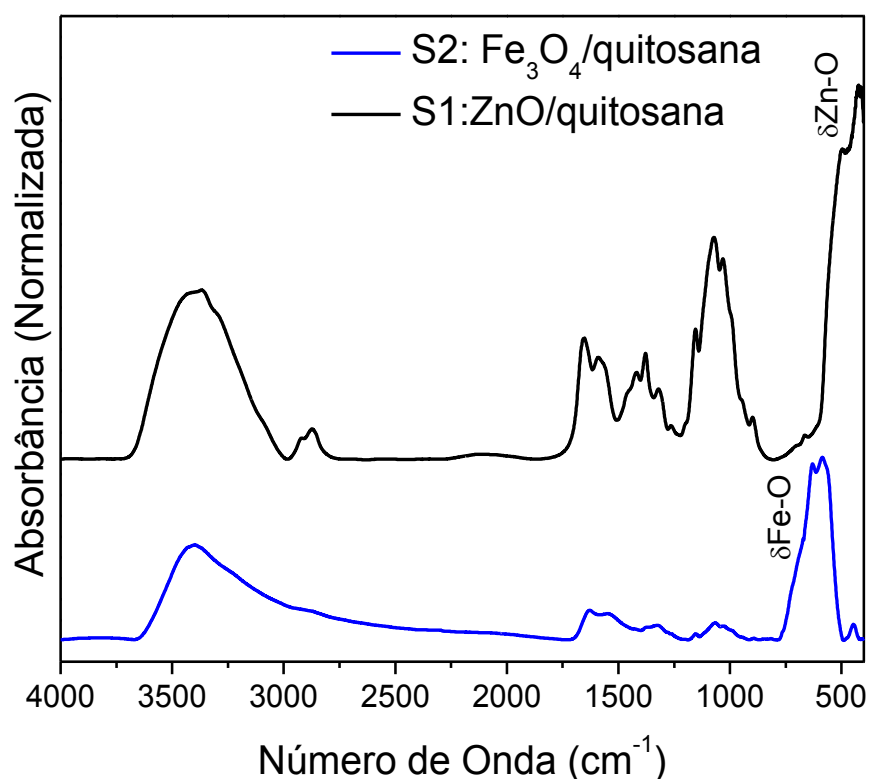
estiramentos da ligação O-H de moléculas OH⁻ adsorvidas na superfície das nanopartículas de magnetita. Já o estiramento em 588 cm⁻¹ foi atribuído a ν Fe-O (WANG et al., 2012; SHARAFI; SEYEDSADJADI, 2013).

Figura 19. Espectros de FTIR para ZnO NPs e Fe₃O₄ NPs



A Figura 20 mostra os espectros de FTIR para os suportes S1 e S2, percebe-se que para o S1 há presença de todos os estiramentos e deformações provenientes da quitosana pura, além de uma nova deformação em 497 cm⁻¹ que foi atribuído a vibração Zn-O, devido a interação eletrostática e a formação de ligações de hidrogênio ente as ZnO NPS e a quitosana (SUGANTHI; RAJAN, 2012; CAI et al., 2015). De maneira similar, no espectro de FTIR para S2 nota-se a presença tanto da quitosana quanto das Fe₃O₄NPs que interagem entre si por meio de interações eletrostáticas (ZANG et al., 2014).

Figura 20. Espectros de FTIR para os suportes S1 e S2



A imobilização da papaína nos suportes propostos, S1: ZnO/quitosana e S2: Fe_3O_4 /quitosana foi confirmada por FTIR, Figuras 21 (a) e (b) respectivamente, visto que o aumento na absorção em 1665 cm^{-1} , para S1-glutaraldeído e S1-Papaína e em 1640 cm^{-1} para S2-glutaraldeído e S2-Papaína confirmaram a formação da ligação N=C entre o suporte, S1 ou S2 e a enzima. A formação da ligação N=C é possível graças a presença dos grupos NH_2 nos suportes e na papaína, já que os grupamentos amina nucleófilos atacam os grupos aldeídos presentes no glutaraldeído formando uma ligação imina, facilmente observada por FTIR (KRAJEWESKA, 2004; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009). A reação que ocorre entre os grupamentos amina da quitosana e da enzima com o glutaraldeído está esquematizada na Figura 22.

Figura 21. Espectros de FTIR para (a) S1-Glutaraldeído e S1-Papaína e (b) S2-Glutaraldeído e S2-Papaína

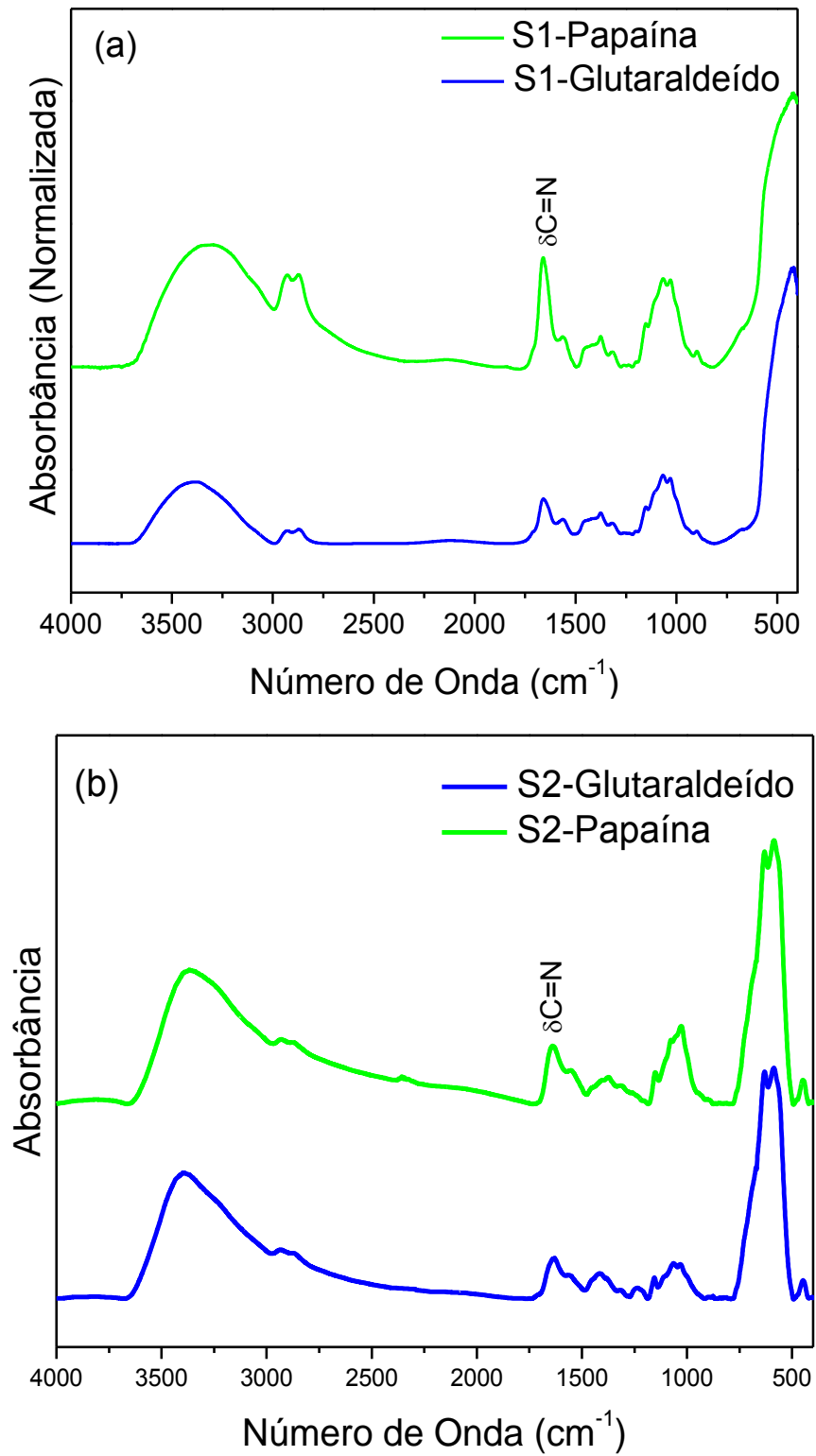
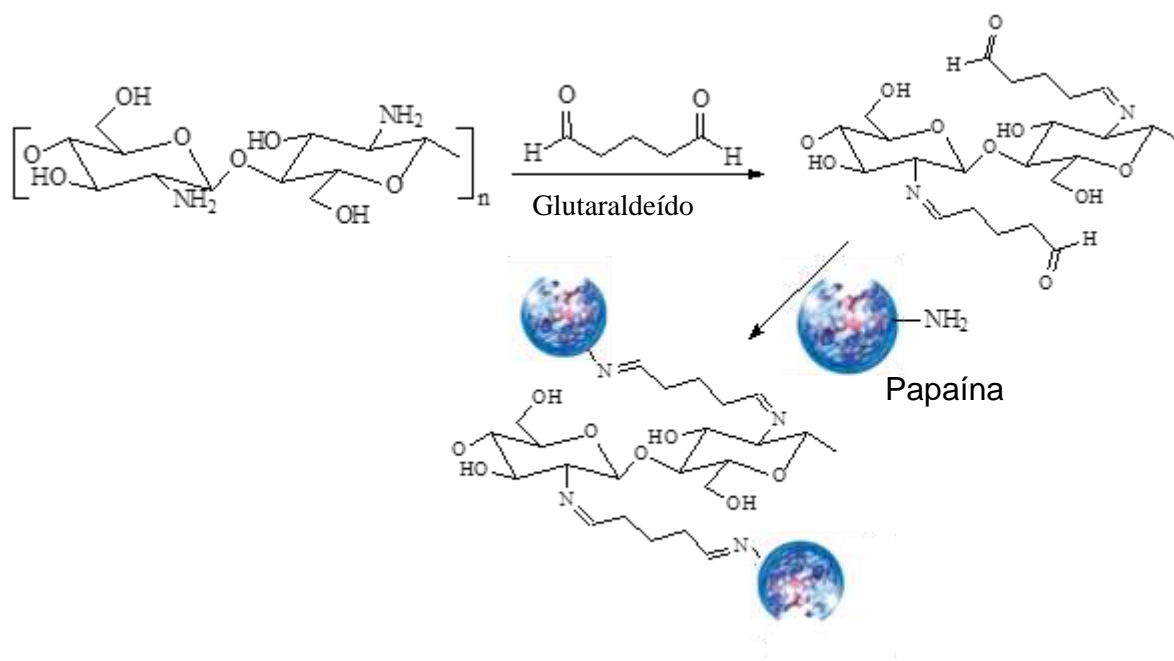


Figura 22. Esquema de reação entre quitosana, glutaraldeído e papaína



Fonte – Arquivo pessoal

4.3 Arranjo supramolecular e tamanho

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada com o intuito de analisar a organização supramolecular, a morfologia e o tamanho dos materiais sintetizados. As ZnO NPs (Figura 23 (a)) apresentaram uma organização polidispersa com forma triangular (nanotriângulos, SALAVATI-NIASARI, 2009) em diferentes tamanhos, com a presença de agregados. O histograma de distribuição do tamanho das partículas dos nanotriângulos ($n = 113$ partículas) revelou um diâmetro médio de 193 nm, com prevalência de nanopartículas com tamanho de aproximadamente 200 nm (Figura 24 (a)). A forma triangular das ZnO NPs pode ser explicada pela capacidade de estabilização do solvente, água, sobre os planos cristalográficos de crescimento do cristal (YILDIRIM; DURUCAN, 2012). A enzima imobilizada em ZnO NPs, S1-papaína (Figura 23 (b)), apresentou uma organização supramolecular semelhante as ZnO NPs, entretanto com tamanho menores, como previsto pela equação de Scherrer. A Figura 24 (b) ilustra o histograma de distribuição de tamanho para S1-papaína que apresentou diâmetro médio dos nanotriângulos de 107 nanômetros. O tamanho médio dos nanotriângulos de S1-papaína estimado com 223 partículas foi de 153 nm.

Figura 23. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para (a) ZnO NPs e (b) S1-papaína com 500 nm

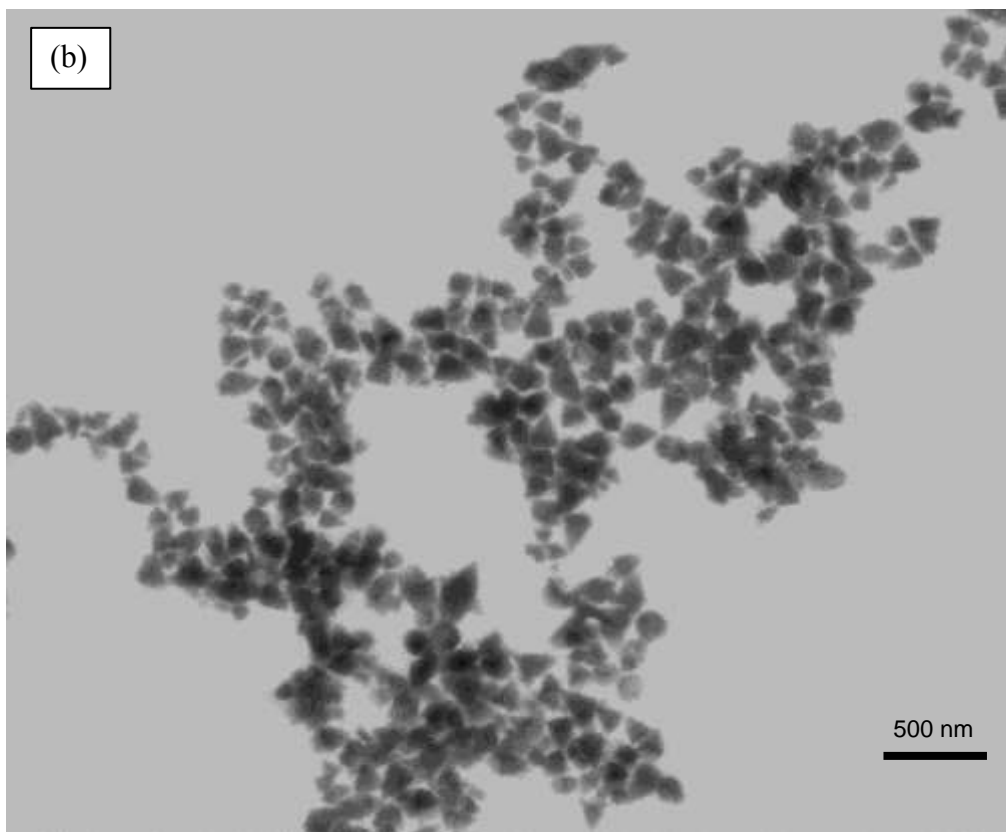
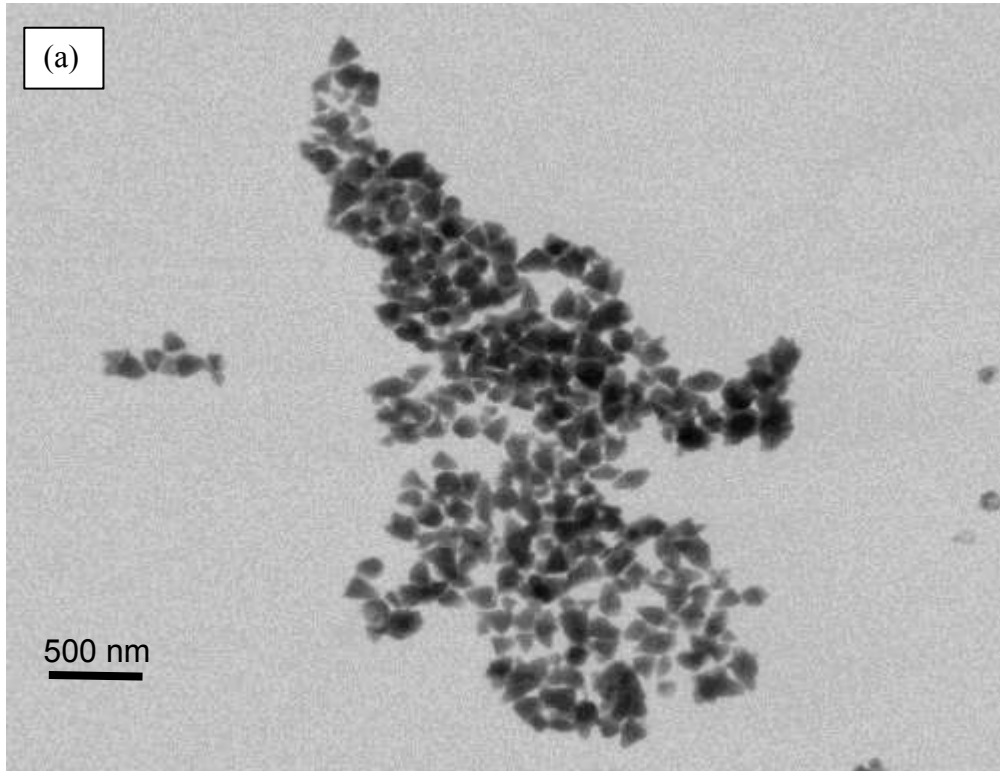
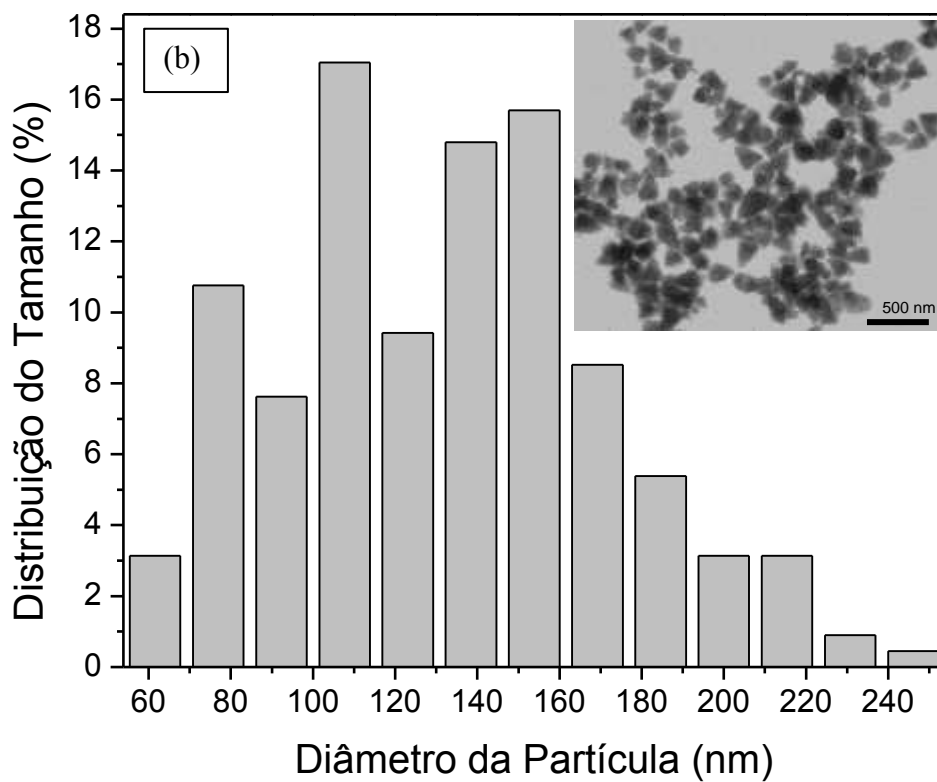
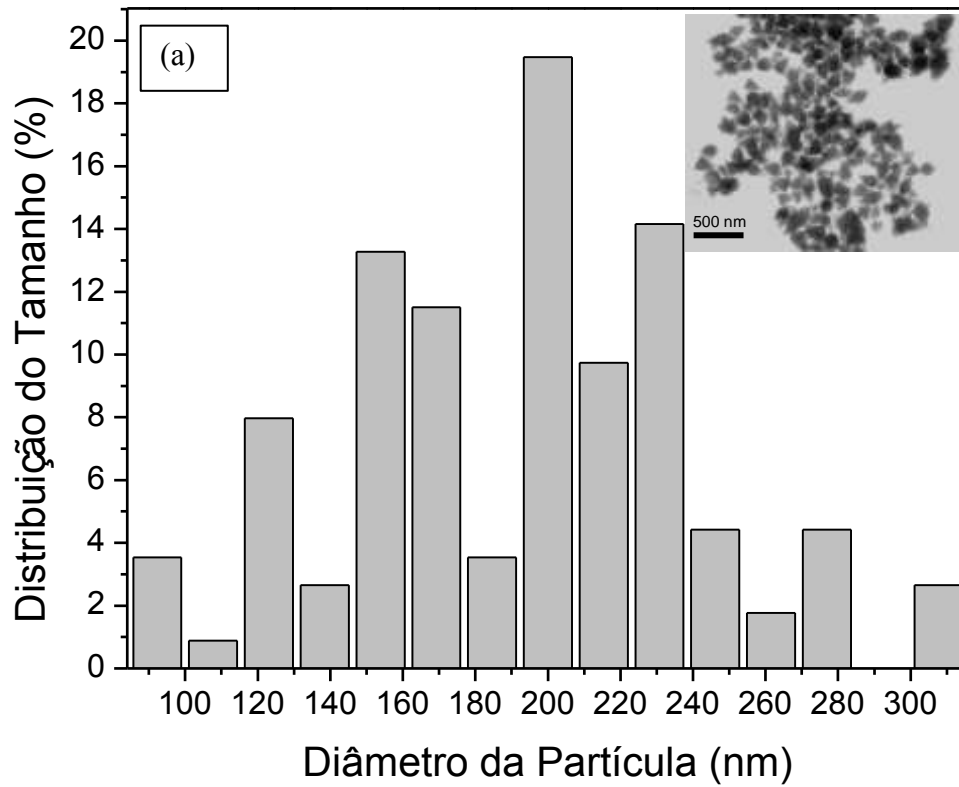
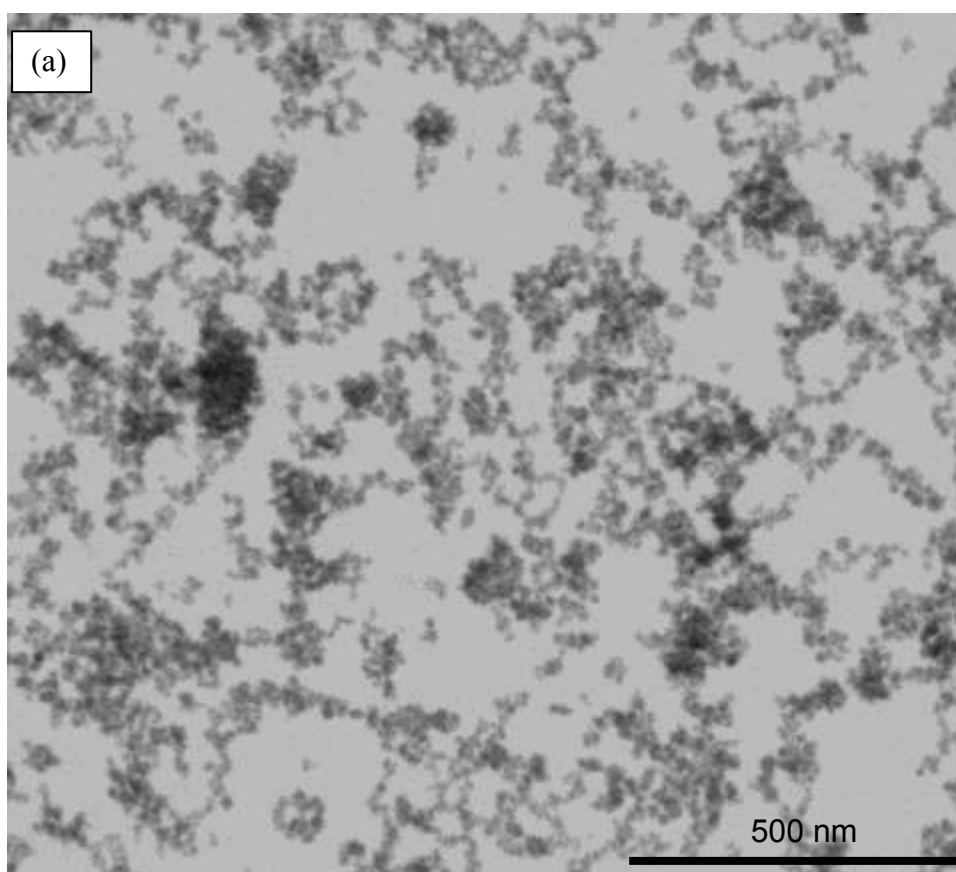


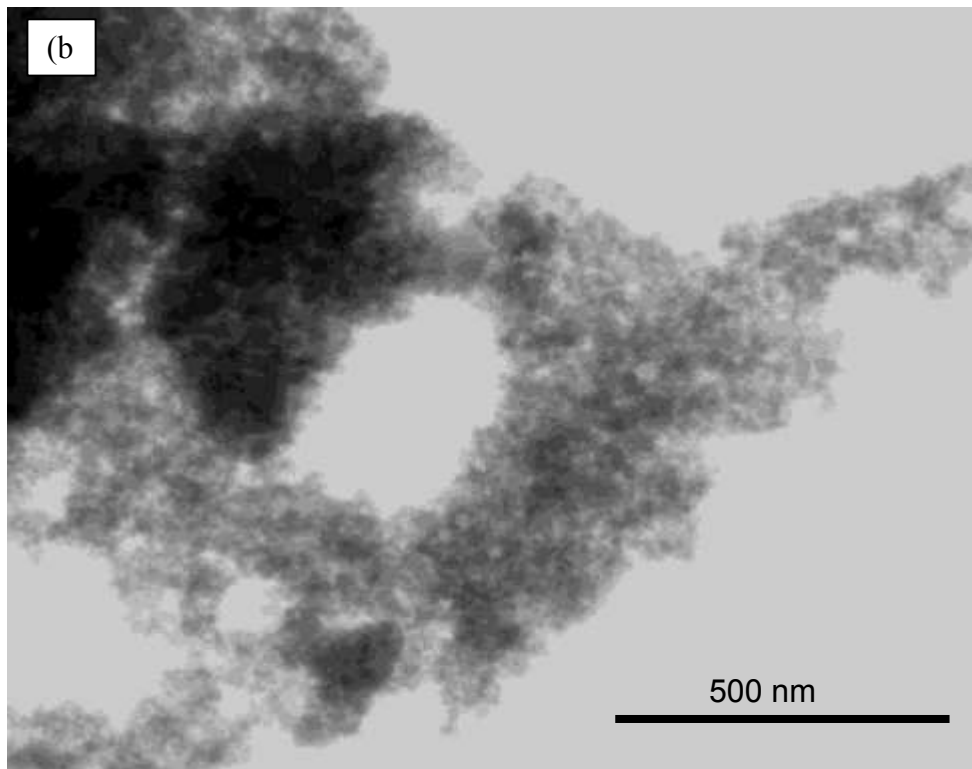
Figura 24. Histogramas de distribuição de tamanho das partículas para (a) ZnO NPs e (b) S1-papaína e as imagens de MET correspondentes



A Figura 25 (a) mostra a formação das Fe_3O_4 NPs em formatos esféricos inferiores a aproximadamente 16 nm. Além disso, as Fe_3O_4 NPs mostram-se polidispersas com formação agregados em virtude de sua natureza magnética, que tendem a atrair umas às outras (ZANG et al., 2014). O mesmo comportamento é observado para S2-papaína, Figura 25 (b) entretanto, a formação de agregados maiores ocorre em virtude da condensação das moléculas de quitosana quando estas são submetidas a reação com glutaraldeído (ZANG et al., 2014). Não foi possível a construção de um histograma de distribuição do tamanho para as Fe_3O_4 NPs e S2-papaína, devido ao seu diminuto tamanho e baixa resolução das imagens de MET.

Figura 25. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para (a) Fe_3O_4 NPs e (b) S2-papaína com 500 nm

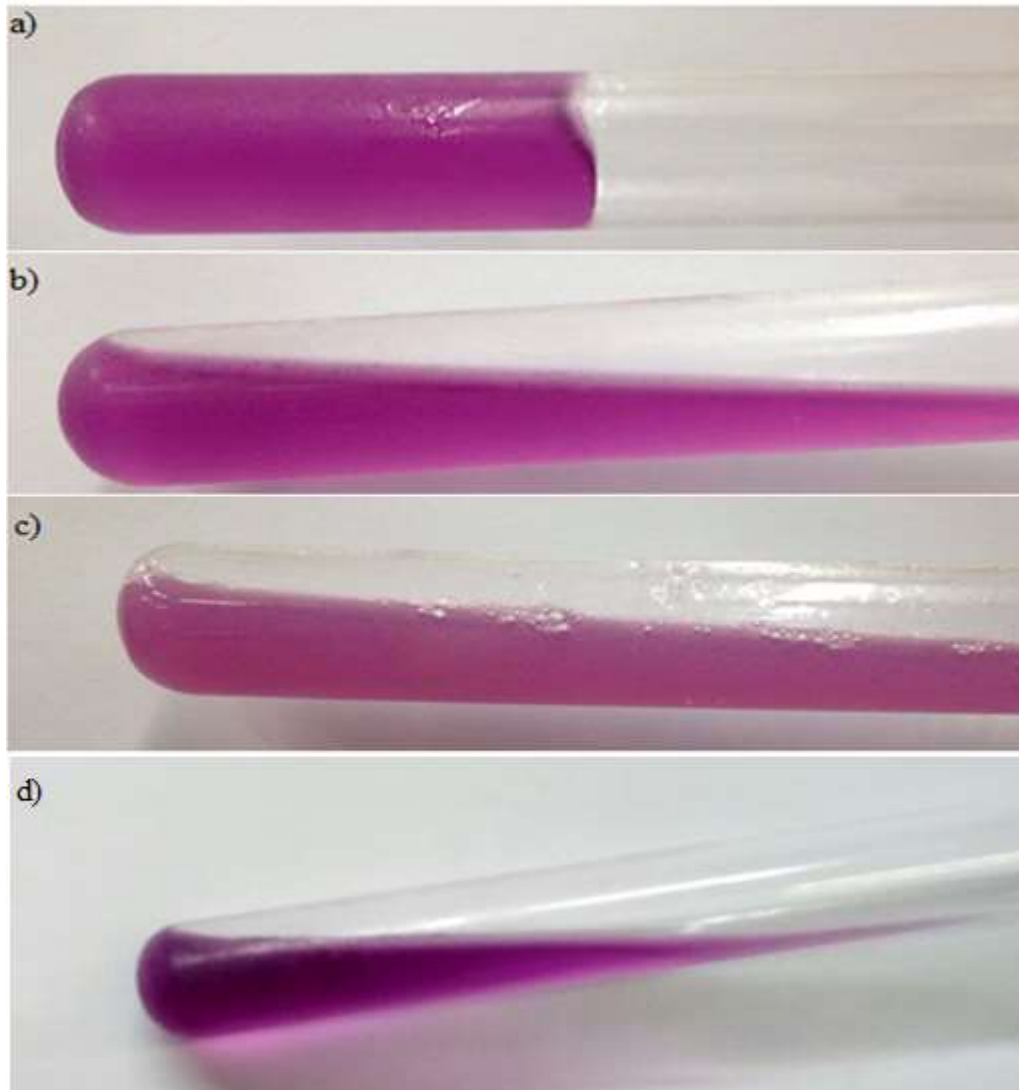




4.4 Ensaio de Atividade Proteolítica

Avaliar a capacidade proteolítica da papaína imobilizada torna-se necessário uma vez que, a imobilização de enzimas via ligação covalente pode piorar o desempenho catalítico da mesma (KRAJEWSKA, 2004). A Figura 26 mostra o resultado do teste qualitativo realizado utilizando gelatina comercial para avaliação da atividade proteolítica da papaína imobilizada. Neste ensaio observou-se que para o controle negativo, Figura 26 (a), houve total gelificação, isso porque não houve hidrólise da proteína presente na gelatina, uma vez que no meio não há a presença de enzima proteolítica (LIMA, 2008). Por outro lado, para o controle positivo, para S1-papaína e S2-papaína, Figuras 26 (b), (c) e (d), respectivamente, a presença de proteólise não acarretou na formação de gel, devido a presença da papaína no meio causar hidrólise das moléculas de proteínas presentes na gelatina, interrompendo o processo de gelificação (LIMA, 2008).

Figura 26. Teste da atividade proteolítica sob a formação da gelatina para: a) controle negativo b) controle positivo - Papaína livre e c) S1-papaína e d) S2-papaína

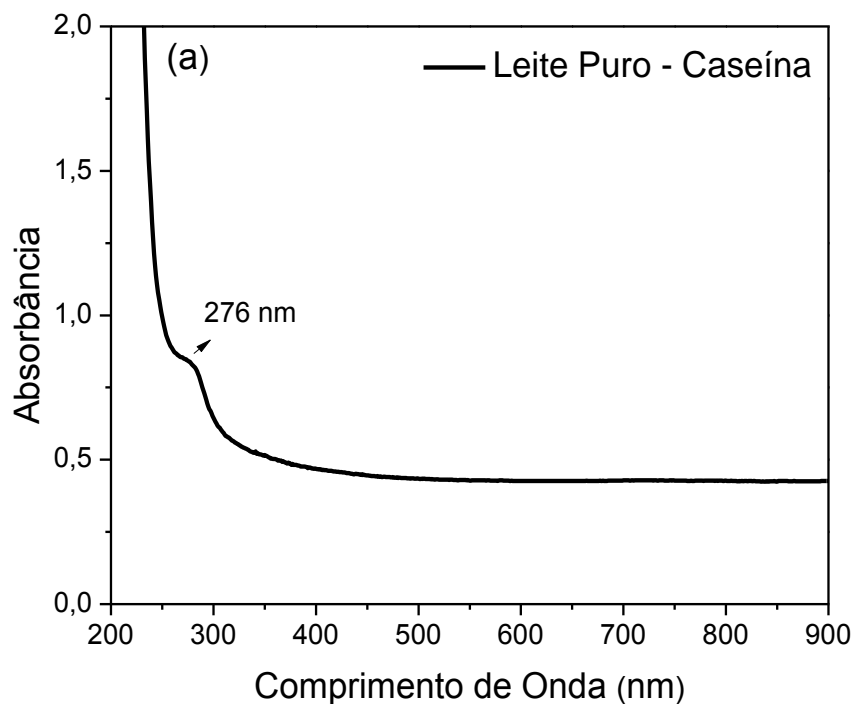


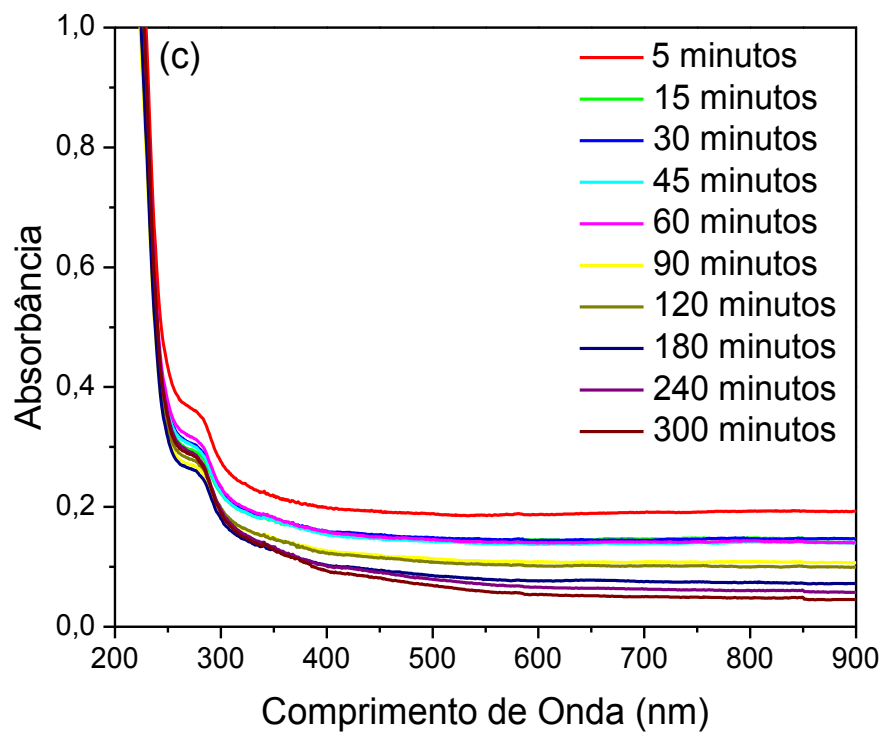
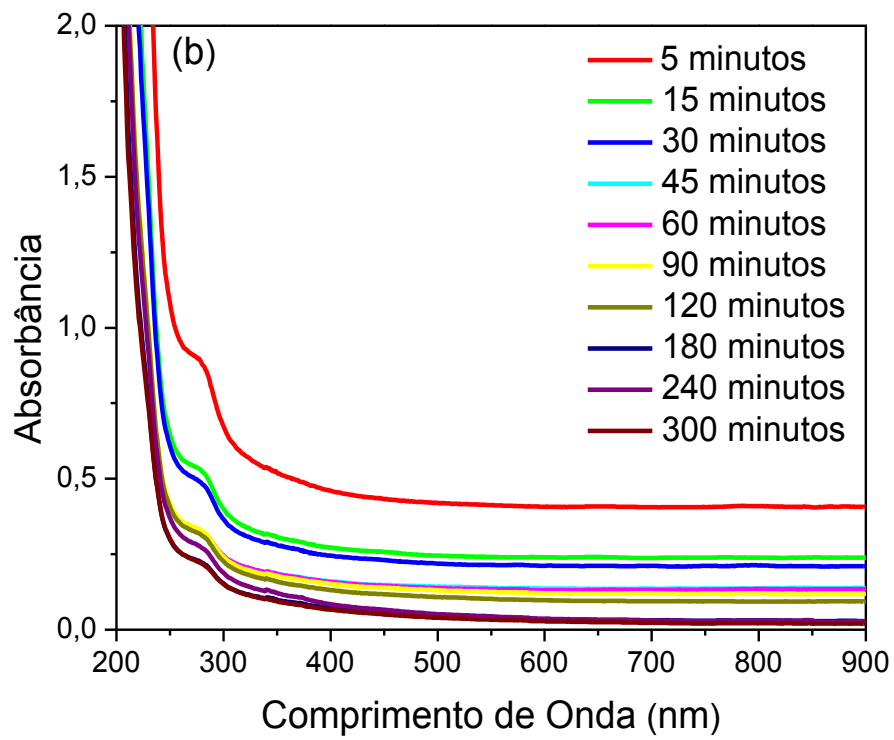
Outra maneira utilizada para avaliar a atividade proteolítica da enzima imobilizada foi através da reação de hidrólise da caseína. Sabe-se que o leite bovino possui alto teor de caseína, sendo, portanto, um material acessível para encontrar essa proteína (CARREIRA, et al., 2003). A Figura 27 (a) mostra o espectro de absorção na região do UV-Vis para uma amostra de leite diluída em água. Observou-se a presença de uma absorção em 235 nm que foi atribuída as moléculas de caseína e aminoácidos aromáticos presentes no leite (CARREIRA, et al., 2003).

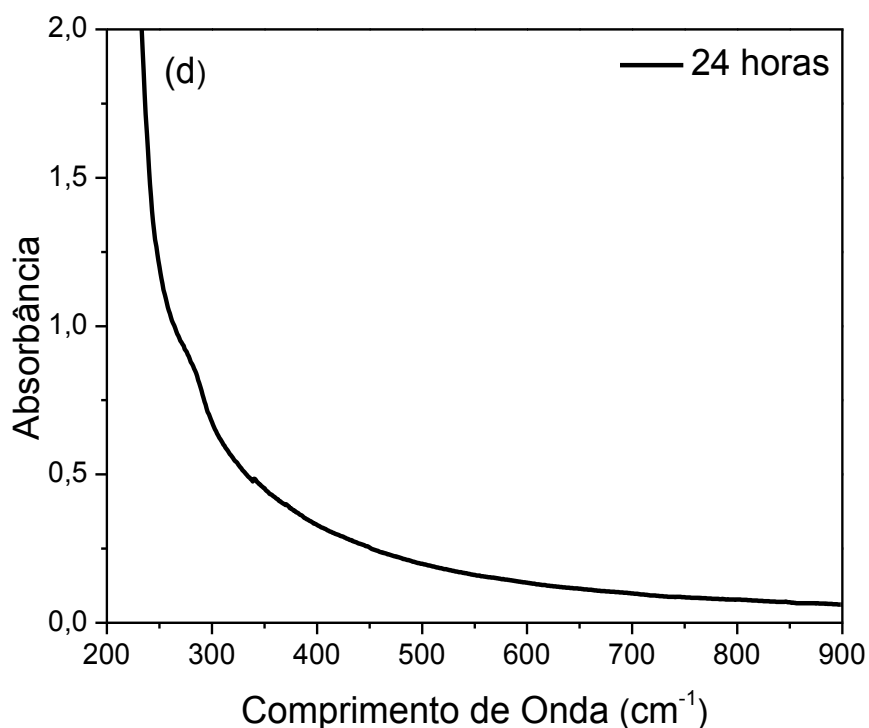
A reação de hidrólise da caseína pela papaína imobilizada em S1 e em S2 foi acompanhada por espectrofotometria na região do UV-Vis. É interessante destacar

que a papaína pode hidrolisar a caseína presente no leite em peptídeos menores (CARREIRA et al., 2003), tornando possível a avaliação de sua atividade proteolítica por esta técnica. É possível observar nas Figuras 27 (b) e (c), reação da S1-papaína e S2-papaína com o leite, respectivamente, que a absorção característica da caseína diminuiu com o tempo até desaparecer completamente em 24 horas para S1-papaína, Figura 27 (d), demonstrando que a enzima imobilizada não perdeu sua atividade.

Figura 27. Espectros eletrônicos na região do UV-Vis para (a) leite puro e teste de atividade proteolítica para (b) S1-papaína (c) S2-papaína e (d) reação com S1-papaína após 24 horas





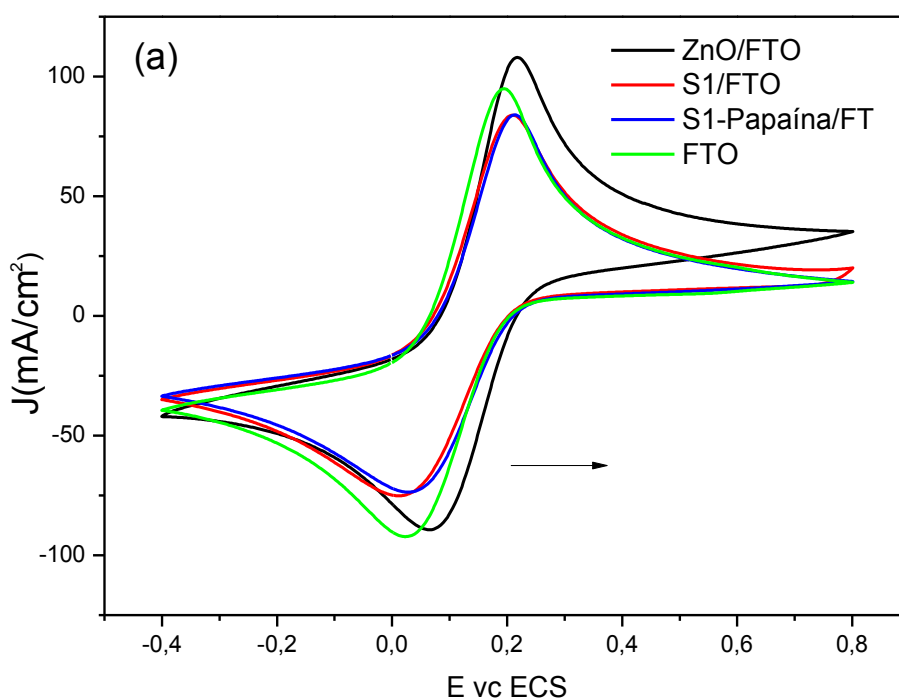


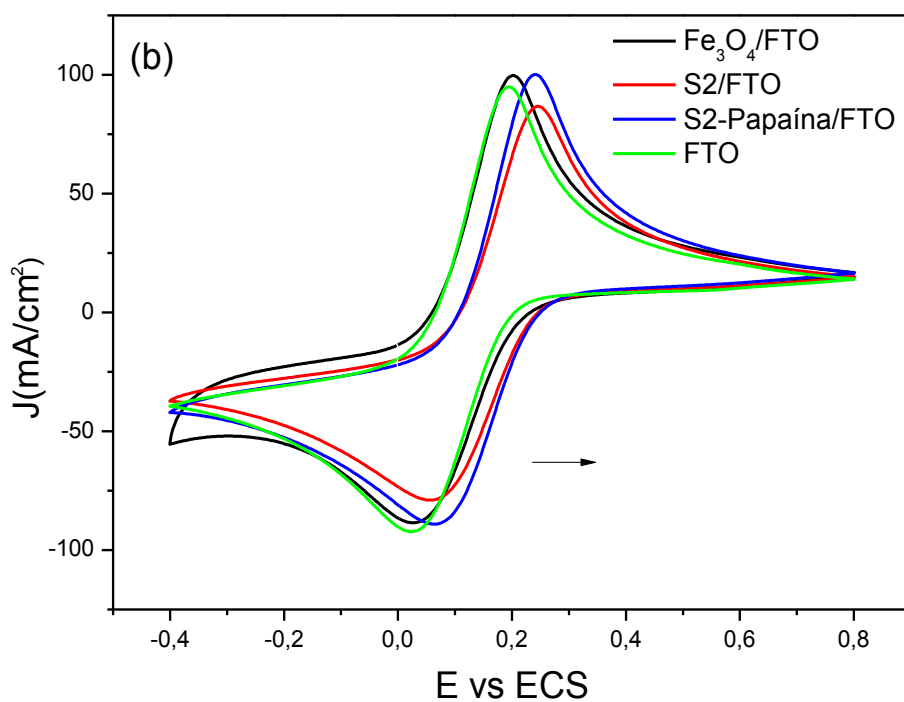
4.5 Propriedades Eletroquímicas de Filmes cast formados por ZnO, quitosana e papaína

Filmes cast constituídos por ZnO NPs, Fe₃O₄ NPs, quitosana e papaína e depositados sobre substratos de FTO foram utilizados com intuito de avaliar se o transporte de carga estava sendo bloqueado após a incorporação da quitosana na superfície das nanopartículas. Para este propósito, filmes de 07 eletrodos foram preparados: a) FTO, b) ZnO/FTO, c) S1/FTO, d) S1-papaína/FTO, e) Fe₃O₄/FTO, f) S2/FTO e g) S2-papaína, utilizando mesma concentração dos materiais. Os eletrodos foram utilizados em experimentos de voltametria cíclica na presença de hexacianoferrato (III) (eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹) uma vez que o sistema Ferro/Ferricianeto tem se mostrado como uma valiosa ferramenta para testar as propriedades eletroquímicas sobre a superfície eletródica (COELHO, 2011). As figuras 28 (a) e (b) ilustram os voltamogramas para FTO, ZnO/FTO, S1/FTO, S1-papaína/FTO e (e) Fe₃O₄/FTO, (f) S2/FTO e (g) S2-papaína, respectivamente, a 50 mV.s⁻¹ na faixa de potencial de -0.4 a 1.0 V (vs ECS). Os sistemas apresentaram um processo redox bem definido com valor $E_{1/2}$ de ~ 0,109 mV atribuído à conversão [Fe^{II}(CN)₆]⁴⁻/[Fe^{III}(CN)₆]³⁻ (COELHO, 2011). As densidades de correntes exibidas pelo filme S1/FTO e S1-papaína/FTO são próximas e menores em relação ao FTO

descoberto, pois a presença de quitosana aumenta a resistividade do filme. O filme ZnO/FTO apresentou aumento nas correntes faradaicas em aproximadamente 16% indicando uma facilidade de transporte de carga das ZnO NPs. O filmes *cast* constituídos de S2/FTO mostrou densidade de corrente inferior a 9% aproximadamente. Filmes constituídos de Fe₃O₄/FTO e S2-papaína/FTO apresentaram um aumento das correntes faradaicas de cerca de 6%. Também observou-se que a imobilização dos diversos materiais sobre o substrato de FTO ocasionou o deslocamento do processo redox para regiões mais positivas, sugerindo ganho de estabilidade com relação à oxidação.

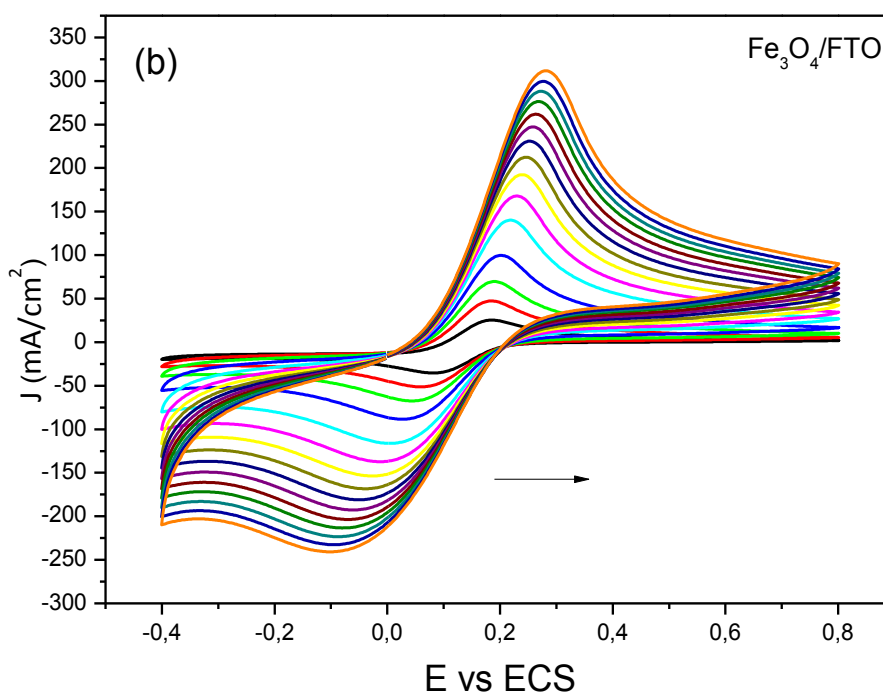
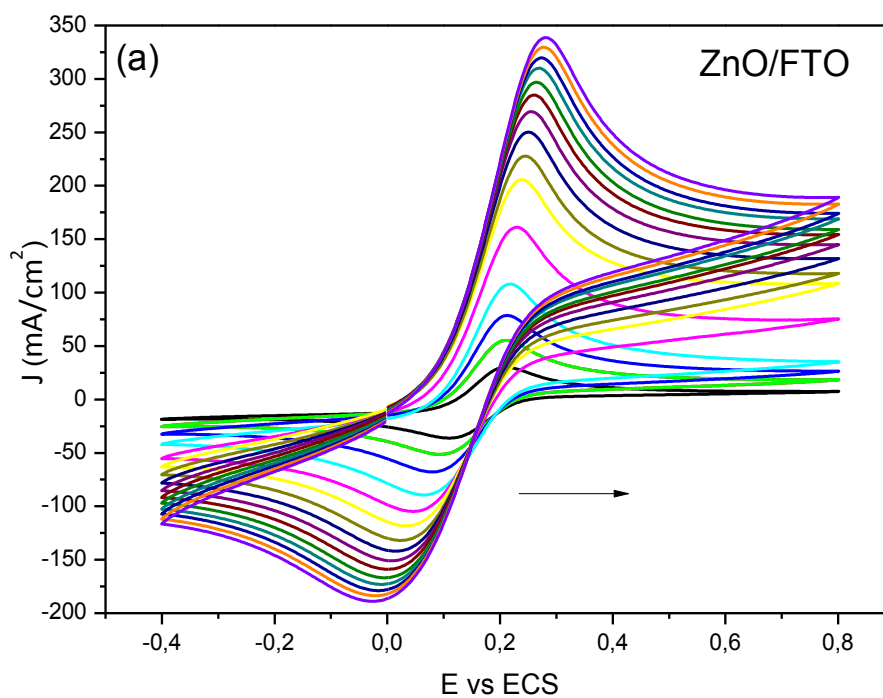
Figura 28. Voltamogramas de filmes *cast* para (a) ZnO/FTO, S1/FTO, S1-papaína/FTO, FTO e (b) Fe₃O₄/FTO, S2/FTO, S2-papaína/FTO e FTO em eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹, na presença de [Fe^{II}(CN)₆]⁴⁻, com velocidade de varredura 50 mVs⁻¹





O estudo realizado com os filmes *cast* constituídos de ZnO/FTO e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{FTO}$, com diferentes velocidades de varredura, Figura 29 (a) e (b) respectivamente, mostra um aumento das correntes faradaicas com o aumento da velocidade de varredura indicando que as ZnO e as Fe_3O_4 Nps respondem rapidamente ao mecanismo de transporte de carga.

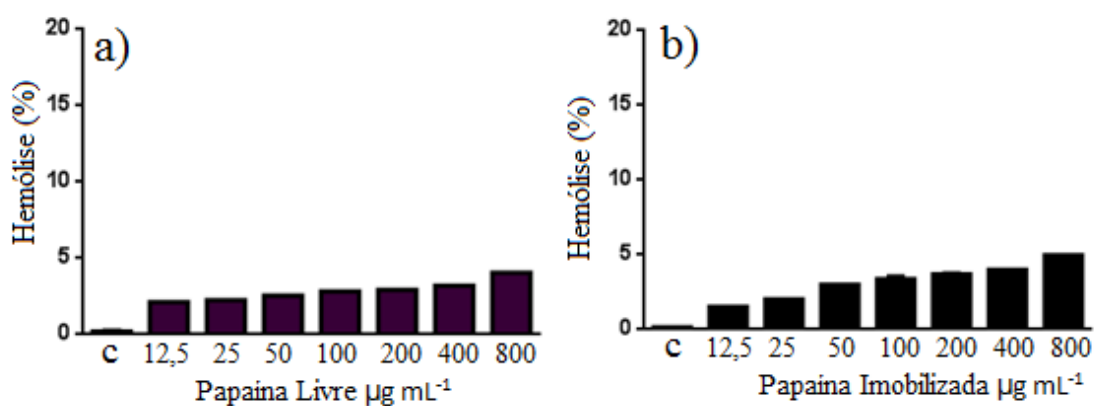
Figura 29. Voltamogramas de filmes cast constituídos de (a) ZnO/FTO e (b) Fe_3O_4 /FTO, em eletrólito KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na presença de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$, em diferentes velocidades de varredura



4.6 Avaliação da atividade citotóxica e de ativação do S1-papaína

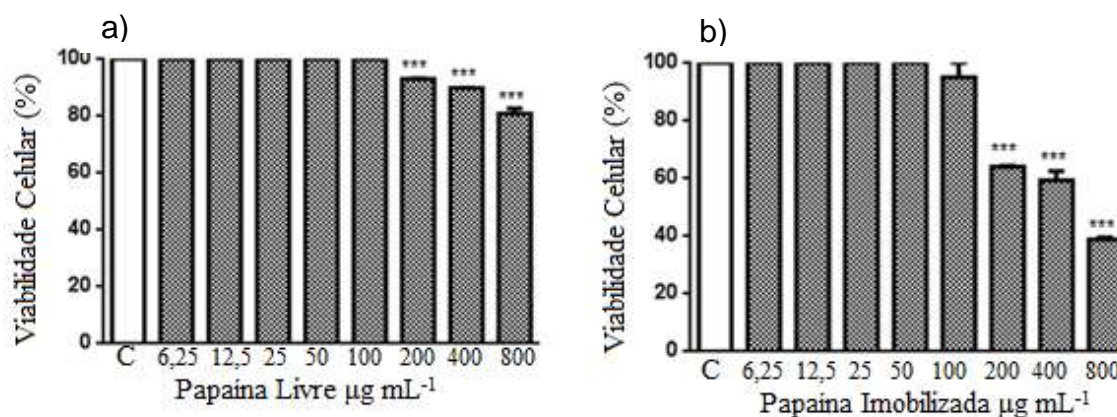
Eritrócitos e macrófagos são células comumente usadas para avaliação de citotoxicidade *in vitro* pois são responsáveis por combater infecções e adaptar-se a corpos estranhos (PARKIN, J.; COHEN, B., 2001), sendo por tanto, importantes no processo imunológico (AUDE-GARCIA et al., 2016). A citotoxicidade da papaína livre e imobilizada em nanopartículas de óxido de zinco (S1-papaína) foi avaliada em cultura de eritrócitos de carneiro. A porcentagem de hemólise aumentou proporcionalmente a concentração após tratamento com enzima livre e S1-papaína. As Figuras 30 (a) e (b) mostram a porcentagem de hemólise em eritrócitos com variação na concentração de papaína livre e S1-papaína, respectivamente. Nota-se que para os testes realizados com diferentes concentrações, ambas amostras mostraram-se poucas citotóxicas. Mesmo na maior concentração testada, 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a porcentagem de hemólise foi inferior a 5%.

Figura 30. Percentual de hemólise em eritrócitos de carneiro após tratamento com (a) Papaína Livre e (b) S1-papaína



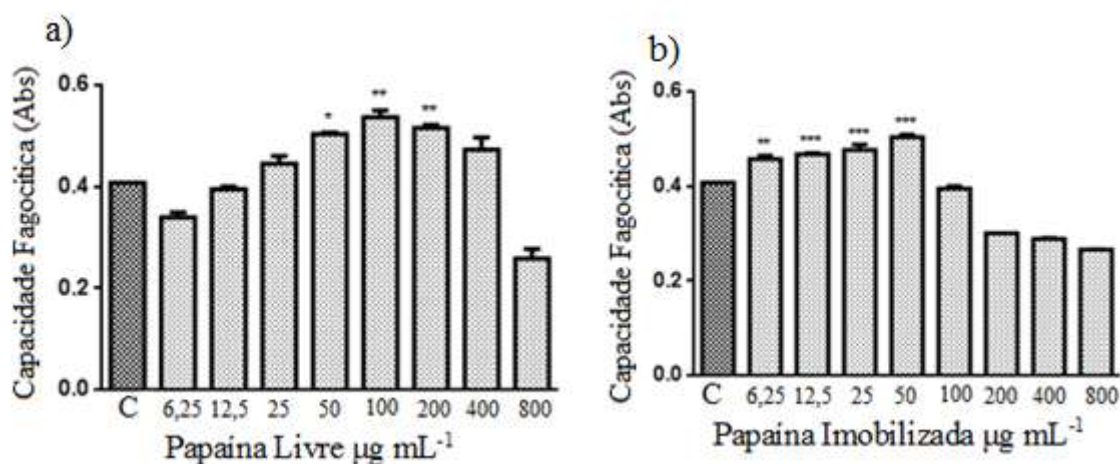
A figura 31 (a) mostra a avaliação da citotoxicidade da papaína livre sobre macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT. Observou-se que a enzima livre mostrou baixa citotoxicidade nas concentrações estudadas e por esse motivo não foi possível determinar a CC_{50} para essa enzima, uma vez que os valores de viabilidade celular permanecem superiores a 80%. O ensaio realizado com S1-papaína resultou no perfil apresentado na Figura 31 (b), em que o nanomaterial se mostrou citotóxico nas quatro últimas concentrações, tal comportamento confirmado pela CC_{50} igual a 488,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 31. Efeito sob macrófagos peritoneais murinos da (a) papaína livre e (b) S1-papaína



Um estudo realizado por Pati e colaboradores (2009) mostrou que a viabilidade celular de macrófagos frente à nanopartículas de óxido de zinco possui relação dependente da concentração, diminuindo em 80% quando expostos a uma concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ZnO NPs (PATI et al., 2016) sendo, portanto, citotóxica as células. Isso porque as ZnO NPs induzem apoptose (ZHANG et al., 2012) e autofagia celular (PATI et al., 2016), contribuindo para elevação na atividade citotóxica da S1-papaína já que nesta há presença de ZnO NPs.

Os macrófagos possuem funções que se tornam aumentadas durante o processo de ativação, dentre elas está a capacidade fagocítica. A fagocitose é um processo crucial para a resistência à invasão de microorganismos (MENDES, et al., 2003). Na Figura 32 estão dispostos os gráficos de avaliação dos parâmetros de ativação dos macrófagos através da capacidade fagocítica pela papaína livre e imobilizada (S1-Papaína). As Figuras 32 (a) e (b) ilustram a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais frente a papaína livre e imobilizada, respectivamente, que aumenta à medida que ocorre o incremento da concentração, entretanto, quando a concentração torna-se bastante elevada há redução deste parâmetro. Esse fator indica que a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais frente a papaína livre e imobilizada é dependente da concentração (LIM et al., 2007). A diminuição da capacidade fagocítica dos materiais em concentrações elevadas está relacionada ao aumento da citotoxicidade, fato observado na Figura 31, isto é, com a elevação da citotoxicidade há uma diminuição na viabilidade celular, logo, com a morte de parte dos macrófagos estes, perdem sua capacidade de fagocitose.

Figura 32. Avaliação da capacidade fagocítica de (a) Papaína Livre e (b) imobilizada

A enzima imobilizada em suporte de ZnO/quitosana possui um perfil de toxicidade celular, sendo capaz de alterar células como macrófagos gerando um processo inflamatório local, entretanto, são necessários estudos para avaliar a toxicidade aguda do material. A enzima imobilizada poderá ser aplicada na castração química de animais, uma vez que, esta pode ser alcançada por meio de fibrose e dano físico causados por meio de indução de uma inflamação aguda no aparelho reprodutor masculino (LOPES; SILVA, 2014; OLIVEIRA et al., 2011).



Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A papaína foi covalentemente imobilizada nos suportes híbridos contendo nanopartículas de óxidos metálicos (ZnO e Fe₃O₄) e quitosana. Por Difractometria de raios-X pode-se confirmar a formação das ZnO NPs e Fe₃O₄ NPs, bem como dos suportes S1 e S2, visto que os difratogramas desses materiais apresentou os planos cristalográficos referentes a estrutura hexagonal do tipo wurtzita, e de espinélio invertido característicos das ZnO NPs e Fe₃O₄ NPs respectivamente.

Os espectros eletrônicos apresentaram as absorções características das ZnO NPs nos espectros das ZnO NPs, S1 e S1-papaína e das Fe₃O₄ NPs nos espectros da Fe₃O₄ NPs, S2 e s2-papaína. O espectro de FTIR para as ZnO NPs e para as nanopartículas de magnetita, confirma a formação das mesmas, assim como dos suportes que apresentaram vibrações e estiramentos relativos a quitosana e as ZnO NPs, para S1, e Fe₃O₄ NPs, para S2. O aumento da intensidade da vibração em 1655 cm⁻¹ e em 1640 cm⁻¹ nos espectros de FTIR para S1-papaína e S2-papaína, respectivamente, sugere que a papaína foi imobilizada nos suportes propostos. Por MET pode-se observar a formação ZnO NPs e das Fe₃O₄ NPs em forma triangular e esférica respectivamente. Todas as técnicas de caracterização sugeriram a imobilização da papaína nos suportes propostos.

O filme *cast* de ZnO/FTO e Fe₃O₄/FTO apresentou maior eficiência no transporte de carga para o sistema Ferro/Ferricianeto quando comparados aos filmes *cast* dos suportes e da enzima imobilizada. Os testes de formação do colágeno e degradação da caseína indicam que a enzima imobilizada não perdeu sua capacidade proteolítica. Os ensaios de citotoxicidade indicaram uma baixa toxicidade da S1-papaína em macrófagos peritoneais murinos. Pode-se observar a ativação dos macrófagos frente a capacidade fagocítica. A papaína imobilizada em suporte de ZnO/quitosana tem potencialidade para ser empregada como agente de castração química em cães e gatos, entretanto mais testes devem ser realizados.



Perspectivas

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar testes de toxicidade aguda *in vivo*;
- ✓ Avaliar a capacidade de castração química da enzima imobilizada;
- ✓ Determinar a quantidade ideal de papaína a ser imobilizada nos suportes;

- ✓ Realizar estudos de estabilidade da enzima imobilizada;
- ✓ Publicação de artigo científico em periódico especializado.



Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ANDRADE NETO, O. et al. Intratesticular hypertonic sodium chloride solution treatment as a method of chemical castration in cattle. **Theriogenology**, v. 82, n. 7, p. 1007–1011, 2014.

AUDE-GARCIA, C. et al. A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages. **Journal of Proteomics**, v. 134, p. 174–185, 2016.

AZARANG, M. et al. Synthesis and characterization of ZnO NPs/reduced graphene oxide nanocomposite prepared in gelatin medium as highly efficient photo-

degradation of MB. **Ceramics International**, v. 40, n. 7 PART B, p. 10217–10221, 2014.

BARKALINA, N. et al. Nanotechnology in reproductive medicine : Emerging applications of nanomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 5, p. e921–e938, 2014.

BARROS, F. C. F. et al. Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 7, n. 4, p. 232–246, 2006.

CAI, J. et al. Preparation and characterization of N-benzoyl-O-acetyl-chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 52–58, 2015.

CAO, L. Immobilised enzymes : science or art?. **Biocatalysis and biotransformation**, v. 9, p. 217–226, 2005.

CARREIRA, R. L. et al. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 625–634, 2003.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso de Sílicas Modificadas Para Imobilização de Lipases. **Química Nova**, v. XY, n. 00, p. 1–11, 2014.

CHUMMING, J.; XIANGQIN, L. Electrochemical synthesis of Fe₃O₄-PB nanoparticles with core-shell structure and its electrocatalytic reduction toward H₂O₂. **Journal of Solid State Electrochem**, v. 13, p. 1273–1278, 2009.

COELHO, A. G. **Nanopartículas de ouro estabilizadas em matriz de quitosana: preparação, caracterização e imobilização em filmes multicamadas**. 2011, 70 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Piauí, 2011.

DEHAGHI, S. M. et al. Removal of permethrin pesticide from water by chitosan-zinc oxide nanoparticles composite as an adsorbent. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 348–355, 2014.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, p. 20–31, 2004.

FAHAMI, A.; BEALL, G. W. Mechanochemical synthesis of carbonate doped chlorapatite–ZnO nanocomposite with negative zeta potential. **Ceramics International**, v. 41, n. 9, p. 12323–12330, 2015.

FAHIM, M. S. et al. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. **Contraception**, v. 47, n. 1, p. 107–122, 1993.

FU, L.; FU, Z. Plectranthus amboinicus leaf extract – assisted biosynthesis of ZnO nanoparticles and their photocatalytic activity. **Ceramics International**, v. 41, p. 2492–2496, 2015.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2009.

- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–251, 2006.
- HOMAEI, A. International Journal of Biological Macromolecules Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 373–377, 2015.
- ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Anal Bioanal Chem**, v. 393, p. 543–554, 2009.
- JANA, K.; SAMANTA, P. K. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. **Contraception**, v. 73, n. 3, p. 289–300, 2006.
- JANA, K.; SAMANTA, P. K. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75, n. 5, p. 390–400, 2007.
- JUTZ, G.; BÖKER, A. Bionanoparticles as functional macromolecular building blocks and new class of nanomaterials. **Polymer**, v. 52, n. 2, p. 211–232, 2011.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126–139, 2004.
- KRISHNAMOORTHY, K. et al. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, 2012.
- KRISHNAMOORTHY, K. et al. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, 2012.
- KUMAR, A. B. V et al. Low molecular weight chitosans: Preparation with the aid of papain and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1670, n. 2, p. 137–146, 2004.
- KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v. 66, p. 514–525, 2006.
- LADERO, M. et al. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 14–24, 2006.
- LEITE, A. P. et al. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. **Rev Gaúcha Enferm.**, v. 33, n. 3, p. 198–207, 2012.
- LIM, H. Y. et al. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. **Immunology**, v. 122, n. 1, p. 47–53, 2007.
- LIMA, S. L. T. DE et al. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. **Química Nova na Escola**, v. 28, p. 2008, 2008.

- LIU, H. K. An overview — Functional nanomaterials for lithium rechargeable batteries , supercapacitors , hydrogen storage , and fuel cells. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 12, p. 4968–4973, 2013.
- LIU, J. et al. Magnetic Nanocomposites with Mesoporous Structures : Synthesis and Applications. **Small**, v. 7, n. 4, p. 425–443, 2011.
- LLOYD, J. R.; BYRNE, J. M.; COKER, V. S. Biotechnological synthesis of functional nanomaterials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 509–515, 2011.
- LOPES, K. R. F.; SILVA, A. R. Castração química de mamíferos machos : revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 1, p. 49–53, 2014.
- LOPES, K. R. F.; SILVA, A. R. Castração química de mamíferos machos : revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 1, p. 49–53, 2014.
- LU, A.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles : Synthesis , Protection , Functionalization , and Application Angewandte. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 46, p. 1222–1244, 2007.
- LU, H.-T. Synthesis and characterization of amino-functionalized silica nanoparticles. **Colloid Journal**, v. 75, n. 3, p. 311–318, 2013.
- MAHMOUD, K. A. et al. Preparation of Well-Dispersed Gold/Magnetite Nanoparticles Embedded on Cellulose Nanocrystals for Efficient Immobilization of Papain Enzyme. **Applied Materials e Interfaces**, v. 5, 2013.
- MELO, A. F. A. A. ET AL. Highly Stable Magnetite Modified with Chitosan, Ferrocene and Enzyme for Application in Magneto-Switchable Bioelectrocatalysis. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 2, p. 285–294, 2013.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.
- MENDES, S. T. D. O. et al. In Vitro Evaluation of the Cytotoxicity of Two Root Canal Sealers on Macrophage Activity So. **Canal Sealers and Macrophage Activity**, v. 29, n. 4, p. 95–99, 2003.
- MONTEIRO JR, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan – glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 119–128, 1999.
- MORENO-CORTEZ, I. E.; ROMERO-GARCÍA, J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, V. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. **Materials Science & Engineering C**, v. 52, p. 306–314, 2015.
- NAGARAJAN, S.; KUPPUSAMY, A. K. Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India. **Journal of nanobiotechnology**, v. 11, p. 39, 2013.
- NISHIMURA, N. et al. Chemical Castration by a Single Intratesticular Injection of lactic acid in rats and dogs. **Journal of Reproduction and Development**, v. 38, n. 4, p. 263–266, 1992.

OLIVEIRA, E. C. S. et al. Castração química de caninos e felinos por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco - Quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 262–265, 2011.

ÖZGÜR, Ü. et al. A comprehensive review of ZnO materials and devices. **Journal os Applied Physics**, v. 041301, n. 98, 2005.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777–1789, 2001.

PAULA, A. V et al. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35–40, 2008.

PAVIA D. L., LAMPMAN G. M., KRIZ G. S., **Introduction to Spectroscopy. A Guide for Students of Organic Chemistry**, 3 ed., S. College.

PERES, R. S. et al. Applied Surface Science Transport and antifouling properties of papain-based antifouling coatings. **Applied Surface Science**, v. 341, p. 75–85, 2015.

PINTO, C. A. S. O. et al. Determination of Papain Activity in Topical Dosage Forms : Single Laboratory Validation Assay. **Latin American Journal of Pharmact**, v. 26, n. 5, p. 771–775, 2007.

POOLE, C. P. JR., OWENS, F. J. **Introduction to nanotechnology**, Willey – Interscience, 2003.

PUDUKUDY, M.; HETIEQA, A.; YAAKOB, Z. Synthesis, characterization and photocatalytic activity of annealing dependent quasi spherical and capsule like ZnO nanostructures. **Applied Surface Science**, v. 319, p. 221–229, 2014.

QI, L.; XU, Z. Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1-3, p. 183–190, 2004.

RAŠKOVIC, B. et al. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage. **Spectrochimica Acta**, v. 150, p. 238–246, 2015.

SAHOO, B. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces A novel approach for efficient immobilization and stabilization of papain on magnetic gold nanocomposites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 280–289, 2013.

SALAVATI-NIASARI, M.; MIR, N.; DAVAR, F. ZnO nanotriangles: Synthesis, characterization and optical properties. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 476, n. 1-2, p. 908–912, 2009.

SANTOS, G. P.; MELO, A. F. A. A.; CRESPILO, F. N. detection via particle – electrode collisions. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, p. 8012–8018, 2014.

SCHECHTER, I. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 3, p. 497–502, 1967.

SCHRBDER, E. et al. X-ray crystallographic structure of a papain-leupeptin complex. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 315, n. 1, p. 38–42, 1993.

SHAHIDI, F. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 37–51, 1999.

SHARAFI, A.; SEYEDSADJADI, M. Modified Superparamagnetic Nanoparticles Fe₃O₄ @ PEG for Drug Delivery. **International Journal of Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials Surface**, v. 2, n. 3, p. 437–441, 2013.

SHARMA, M. et al. Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 6, p. 2097–2111, 2011.

SHARMA, R. K.; GHOSE, R. Synthesis of zinc oxide nanoparticles by homogeneous precipitation method and its application in antifungal activity against *Candida albicans*. **Ceramics International**, v. 41, n. 1, p. 967–975, 2015.

SHELDON, R. A.; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223–6235, 2013.

SILVA, A. T. B. **Nanocubos do análogo de azul da prússia de cobalto modificados por nanopartículas ferromagnéticas**. 2015, 77 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Piauí, 2015.

SILVA, S. S.; MAGALHÃES, F.; SANSIVIERO, T. C. Nanocompósitos semicondutores ZnO/TiO₂. Testes fotocatalíticos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 85–89, 2010.

SUGANTHI, K. S.; RAJAN, K. S. Temperature induced changes in ZnO-water nanofluid: Zeta potential, size distribution and viscosity profiles. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 55, n. 25-26, p. 7969–7980, 2012.

TEIXEIRA, K. S. N. **Nanomaterial híbrido funcional constituído pelo análogo de azul da prússia de cobalto e óxido de zinco: síntese, caracterização e propriedades supramoleculares**. 2016, 98 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Piauí, 2016.

URAGAMI, T.; TOKURA, S. **Material Science of Chitin and Chitosan**, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.

VAFEE, M.; GHAMSARI, M. S. Preparation and characterization of ZnO nanoparticles by a novel sol – gel route. **Materials Letters**, v. 61, p. 3265–3268, 2007.

VANDERSTICHEL, R. et al. Changes in blood testosterone concentrations after surgical and chemical sterilization of male free-roaming dogs in southern Chile. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1021–1027, 2015.

VANNUCCHI, C. I. et al. Effects of intratesticular administration of zinc gluconate and dimethyl sulfoxide on clinical, endocrinological, and reproductive parameters in dogs. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1103–1110, 2015.

- WANG, J. et al. Immobilization of Lipases on Alkyl Silane Modified Magnetic Nanoparticles : Effect of Alkyl Chain Length on Enzyme Activity. **Lipase Immobilization**, v. 7, n. 8, p. 21–25, 2012.
- WANG, Z. L. Zinc oxide nanostructures : growth , properties and applications. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 16, p. 829–858, 2004.
- YANG, C.; WU, J.; HOU, Y. Fe₃O₄ nanostructures: syntesis, growth mechanism, prprties and applications. **Chem. Commun**, v. 47, p. 5130–5141, 2011.
- YILDIRIM, Ö. A.; DURUCAN, C. Effect of precipitation temperature and organic additives on size and morphology of ZnO nanoparticles. **Journal of Materials Research**, v. 27, n. January, p. 1452–1461, 2012.
- ZANG, L. et al. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 9, p. 3448–3454, 2014.
- ZHANG, J. et al. Toxic effect of different ZnO particles on mouse alveolar macrophages. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219-220, p. 148–155, 2012.
- ZHANG, X. et al. Prussian blue modified iron oxide magnetic nanoparticles and their high peroxidase-like activity. **Journal Of Materials Chemistry**, v. 20, p. 5110–5116, 2010.