

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

CAROLINE CUNHA TREVÉLIN

**“Síntese, incorporação e liberação prolongada do tetradecapeptídeo OGP em
celulose bacteriana”**

Araraquara

2012

CAROLINE CUNHA TREVELIN

**“Síntese, incorporação e liberação prolongada do tetradecapeptídeo OGP
em celulose bacteriana”**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara

2012

Dedicatória

*Às três pessoas mais importantes na minha vida, **Fernando, Fátima e Isabela**, os quais eu tenho grande orgulho de chamar de pai, mãe e irmã. Sem vocês, eu jamais teria chegado até aqui. Por vocês essa caminhada foi possível. Obrigada pelo apoio incondicional, pela grande confiança em mim, por me ensinarem a fazer as melhores escolhas e por me guiarem sempre pelos melhores caminhos. A vocês devo tudo o que sou hoje e tudo o que serei daqui para frente. AMO MUITO VOCÊS!*

Agradecimentos

À Deus, pela presença constante em minha vida e por iluminar meus passos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, pela oportunidade de aprendizado, pelo apoio à pesquisa e pela paciência.

Aos meus familiares, que mesmo com a distância sempre me incentivaram e enviaram suas palavras de apoio.

Às minhas grandes amigas nessa jornada, Mariana, Clau e Cris, pela ótima companhia, amizade, conselhos, confiança e aprendizado.

Aos amigos da faculdade, os quais foram minha segunda família por todos esses anos.

Às amigas de laboratório, Sybele e Larissa, por toda atenção dedicada, ensinamentos, paciência e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Síntese de Peptídeos, pela troca de conhecimentos e convívio agradável.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela colaboração e pelo incentivo.

Às amigas de infância, Fabiana, Bruna e Juliane, pelo apoio essencial, mesmo que distante.

Ao Alexandre da Seção Técnica de Graduação, por todo auxílio e paciência nos trâmites acadêmicos.

A todos os docentes e funcionários da Faculdade de Farmácia, por contribuírem para minha formação e crescimento.

Ao CNPq, pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

A vocês, meus sinceros agradecimentos!

***“Por mais longa que seja a caminhada,
o importante é dar o primeiro passo.”***

Vinícius de Moraes

SUMÁRIO

RESUMO	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistemas de liberação de fármacos	1
1.1.1 Microemulsões	2
1.1.2 Lipossomas	6
1.2 Celulose Bacteriana (CB)	10
1.3 Fator de Crescimento	14
1.3.1 Peptídeo de crescimento osteogênico – (OGP)	15
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Síntese química do peptídeo OGP	20
3.2 Síntese do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína	22
3.3 Purificação dos compostos	23
3.4 Caracterização dos compostos	24
3.4.1 Espectrometria de massas	24
3.4.2 Análise de aminoácidos	25
3.5 Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana	25
3.6 Preparação da microemulsão (ME) contendo o OGP-CF	26
3.6.1 Preparo do sistema tensoativo	27
3.7 Preparação dos lipossomas contendo o OGP-CF	27
3.8 Incorporação do peptídeo OGP-CF e dos sistemas de liberação na CB	28
3.9 Determinação da liberação do peptídeo na CB	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1	Síntese e purificação do peptídeo OGP e OGP-CF	31
4.2	Adsorção do peptídeo OGP-CF e dos sistemas de liberação às membranas de celulose	36
4.3	Determinação da liberação do peptídeo OGP-CF	41
5	CONCLUSÕES	48
6	PERSPECTIVAS	49
7	REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo de dois sistemas de liberação prolongada, microemulsão e lipossomas, contendo peptídeo regulatório de fatores de crescimento, “osteogenic growth peptide” OGP, para aplicação em regeneração óssea. A base de adsorção para estes sistemas de liberação foi a celulose bacteriana (CB) produzida pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*. Foi escolhida devido às suas propriedades físicas e químicas, tais como alta resistência à corrosão química, bio-absorção, biocompatibilidade, porosidade e ainda boa resistência mecânica, o que a torna um biopolímero com grande potencial a ser explorado pela ciência biomédica. Estudos *in vitro* foram realizados para avaliar o perfil de liberação do peptídeo dos diferentes sistemas de liberação prolongada. O peptídeo OGP foi sintetizado pelo método da fase sólida (estratégia SPFS-Fmoc); foi purificado e caracterizado por HPLC, espectrometria de massas e análise de aminoácidos e, em seguida, marcados com 5,6-carboxifluoresceína (CF) para análise por espectroscopia de fluorescência. O peptídeo marcado foi incorporado aos sistemas de liberação no momento do respectivo preparo, foram adsorvidos na CB por um período de 72h, seguido de sua liberação prolongada em sistema fechado de fluxo constante contendo tampão PBS pH 7,4, por um período de 24h. Após a análise da liberação, observou-se que o sistema que obteve melhor resultado foi a microemulsão, sendo sua liberação prolongada nas primeiras 6,5 h, liberando 21,5% do valor teórico de peptídeo incorporado, seguido de uma liberação constante a partir desse período. Dessa forma, tem-se que a microemulsão pode ser um sistema promissor para liberação prolongada do OGP em processos de regeneração óssea.

Palavras-chaves: microemulsão, lipossomas, sistemas de liberação prolongada, celulose bacteriana, peptídeos regulatórios, regeneração óssea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de uma microemulsão.	03
Figura 2 - Representação esquemática de lipossomas. Em (a) modelo de lipossomas unilamelar e multilamelar. Em (b) mostrando a base de sua classificação em termos de tamanho, numero de lamelas e sua posição relativa.	08
Figura 3 - Fórmula estrutural do DPPC.	09
Figura 4 - Estrutura primária dos peptídeos OGP e OGP [10-14].	17
Figura 5 - Fórmula estrutural da fluoresceína.	22
Figura 6 - Sistema utilizado para os estudos de liberação. A) Sistema completo. B) Aproximação do recipiente contendo as membranas e o tampão PBS para fluxo contínuo, assim como as mangueiras de silicone responsáveis pelo fluxo de entrada e saída do tampão. C) Aproximação do interior do espectrofotômetro onde está localizada a cubeta e detalhe para local de entrada e saída da cubeta, proporcionando o fluxo e leituras contínuas.	30
Figura 7 - Cromatogramas do peptídeo OGP bruto (a) e após purificação (b).	32
Figura 8 - Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP-CF bruto (a) e purificado (b).	35
Figura 9 - Espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF (a) e Curva padrão OGP-CF em solução tampão PBS pH 7,4 (b).	39
Figura 10 - Curva de liberação do peptídeo OGP-CF adsorvido na membrana de CB, com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata.	42

Figura 11 - Curva de liberação da microemulsão, contendo o peptídeo OGP-CF, adsorvida na membrana de CB, com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata. 44

Figura 12 - Curva de liberação do lipossoma, contendo o peptídeo OGP-CF, adsorvida na membrana de CB, com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fosfolipídios utilizados na formulação de lipossomas	08
Tabela 2 - Grupos protetores dos aminoácidos utilizados na síntese do OGP.	20
Tabela 3 - Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP.	33
Tabela 4 - Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP-CF.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

1. Aminoácidos

Ala (A) - Alanina

Arg (R) - Arginina

Phe (F) - Fenilalanina

Gly (G) - Glicina

Gln (Q) - Glutamina

Leu (L) - Leucina

Lys (K) - Lisina

Pro (P) - Prolina

Tyr (Y) - Tirosina

Thr (T) - Treonina

2. Fosfolípidios

DLPC - Dilaurilfosfatidilcolina

DMPC - Dimiristoilfosfatidilcolina

DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina

DSPC - Diestearoilfosfatidilcolina

DOPC - Dioleilfosfatidilcolina

DMPE - Dimiristoilfosfoetanolamina

DPPE - Dipalmitoilfosfoetanolamina

DOPE - Dioleilfosfoetanolamina

3. Outras

α 2-M -	α 2-macroglobulina
A -	Absorvância
ALP -	Fosfatase alcalina
Boc -	t-Butiloxicarbonila
BMP -	Proteína morfogenética óssea
CB -	Celulose bacteriana
CF -	5,6-carboxifluoresceína
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCM -	Diclorometano
DIC -	N,N-Diisopropilcarbodiimida
DIEA -	Diisopropiletilamina
DMF -	Dimetilformamida
DPPC -	Dipalmitoil fosfatidil colina
EDT -	Etanoditiol
EM -	Emulsão
ES-MS -	Espectrometria de massas
FGF -	Fator de crescimento fibroblástico
Fmoc -	9-fluorenilmetiloxicarbonila
GUV -	Vesícula unilamelar gigante
HOBt -	1-hidroxibenzotriazol
IGF -	Fator de crescimento similar à insulina
LUV -	Vesícula unilamelar grande
ME -	Microemulsão

MLV -	Vesícula multilamelar
MVL -	Lipossoma multivesicular
MUV -	Vesícula unilamelar média
OGP -	Peptídeo de crescimento osteogênico
OGP [10-14] -	Peptídeo de crescimento osteogênico [10-14])
OGPBP -	Proteína de ligação ao OGP
OLV -	Vesícula oligolamelar
PBS -	Solução tampão fosfato
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PLGA -	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
ROG -	Regeneração óssea guiada
SPFS -	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
SUV -	Vesícula unilamelar pequena
t-Bu -	Tert-butílico
TA -	Temperatura ambiente
TFA -	Ácido Trifluoracético
TGF -	Fator de transformação de crescimento
UDP -	Uridina difosfato
UDPG -	Uridina difosfato-glicose
UV -	Ultravioleta
VEGF -	Fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas de liberação de fármacos

A tecnologia de liberação de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como sistemas de liberação de fármacos, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros sistemas de liberação convencional. De fato, os trabalhos aplicados a este tipo de sistema de liberação modificada de fármacos fornecem inúmeras evidências tais como (LUNDON, 1994):

i. Maior eficácia terapêutica, devido à liberação ser de acordo com as necessidades clínicas e farmacocinéticas do fármaco;

ii. Diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;

iii. Natureza e composição variada dos veículos e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);

iv. Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;

v. Substâncias hidrofílicas e lipofílicas podem ser incorporadas;

Estas novas estratégias para a veiculação incluem aplicações importantes da ciência de colóides, nas suas mais variadas formas, tais como emulsões múltiplas e inversas, cristais líquidos, lipossomas, micro e nanopartículas biodegradáveis. O

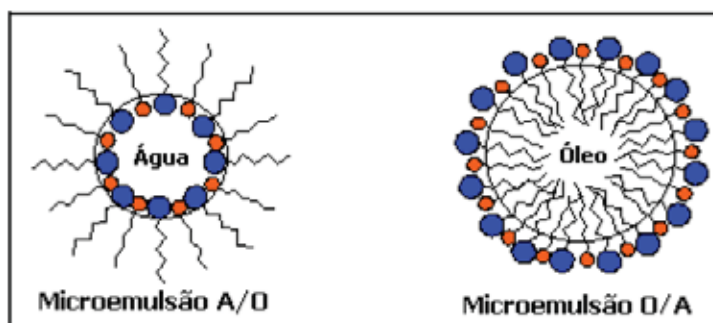
empenho por parte de pesquisadores do mundo se justifica, pois sistemas de liberação prolongada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos. Nas formas de administração convencionais, como spray, injeção e drágea, a concentração do fármaco na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge a concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e após essa etapa ocorre a diminuição da sua concentração plasmática. Todo fármaco possui uma faixa de ação terapêutica, porém acima dessa faixa terapêutica o fármaco é tóxico e abaixo dessa, seu efeito é subterapêutico (LUNDON, 1994).

O objetivo principal dos sistemas de liberação prolongada é manter a concentração plasmática do fármaco na faixa terapêutica por um período prolongado.

1.1.1 Microemulsões

Microemulsões (ME) podem ser definidas como sistemas transparentes, no qual um óleo é disperso em um meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (OLIVEIRA et al., 2004). A Figura 1 mostra a estrutura de uma microemulsão.

Figura 1 - Estrutura de uma microemulsão (CASTILLO, 2002).



Na prática, as diferenças importantes entre microemulsões e emulsões (EM) é que estas são opacas enquanto microemulsões são transparentes ou translúcidas (LAWRENCE et al., 2000). A literatura denomina sistemas translúcidos de nanoemulsões ou subemulsões como sendo emulsões com tamanho de gotículas em escala nanométrica (20 a 200 nm) finamente dispersas com longo tempo de estabilidade contra sedimentação quando comparado às emulsões. Podem ser chamadas de emulsões ultrafinas ou emulsões submicrônicas. (SOLANS et al., 2005).

As microemulsões são sistemas reservatórios, nos quais a fase interna constitui um microambiente de dimensões restritas, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades (WARGAFTIG, 2001; CERA, 2002). A principal característica do sistema é formar espontaneamente a fase interna por homogeneização dos componentes da mistura. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e as emulsões, podendo ser utilizada por tempo muito mais amplo (CONSTANTINIDES, 1995; DALMORA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004).

Ácidos graxos saturados e insaturados têm sido utilizados como fase oleosa na preparação de microemulsões com o intuito de promover aumento da permeabilidade de fármacos. Nesses sistemas, os tensoativos utilizados como agentes de permeabilidade são de natureza anfifílica como é o caso dos fosfolipídios tais como a fosfatidilcolina de ovo e a de soja (KOGAN e GARTI, 2006).

Em relação à preparação de microemulsões é necessário conhecer as características dos tensoativos utilizados, assim como suas propriedades e avaliar quais tensoativos são mais adequados para determinadas aplicações (CONSTANTINIDES, 1995). O tensoativo pode ser puro, uma mistura ou uma combinação com outros componentes, cuja função é a estabilização da microemulsão através da redução da tensão interfacial (CRUZ et al., 2001).

Os tensoativos podem associar-se na presença de excesso de água produzindo vários tipos de agregados supramoleculares tais como microemulsões do tipo O/A, A/O, estruturas bicontínuas cuja quantidade de água e de óleo é praticamente semelhante, e estruturas lamelares, a qual apresenta maior quantidade de tensoativos. As microemulsões do tipo O/A ou A/O podem ser invertidas variando as condições de emulsificação. As estruturas bicontínuas se formam provavelmente nesse processo de inversão de fases (LAWRENCE et al., 2000).

Aquecimento e sonicação são frequentemente utilizados, particularmente em sistemas contendo tensoativos não iônicos, para acelerar o processo de formação de microemulsões (FENDLER, 1982; SIROTTI, 2002).

Os fosfolipídios como a fosfatidilcolina de soja são muito utilizados. A fosfatidilcolina de soja é um tensoativo que possui biocompatibilidade, independente da via de administração, e não apresenta problemas com toxicidade, sendo bastante

utilizada para medicamentos via oral (ALBOOFAZELI et al., 1994). É um tensoativo natural e devido a esta característica é rapidamente difundida na interface óleo-água. Microemulsões compostas de fosfolípido tem mostrado melhorar as lesões gástricas induzidas por fármacos anti-inflamatórios não esteróides (CRUZ et al., 2001).

Para aumentar o domínio de existência da região de microemulsão, um quarto componente que atua como co-tensoativo para ambos, água e óleo é frequentemente adicionado. Geralmente co-tensoativos hidrofílicos são mais indicados para produzir uma grande região isotrópica e opticamente transparente (TROTTA et al., 1999). Atualmente, a incorporação de co-tensoativos se justifica pelo expressivo aumento da extensão da região isotrópica da solução, especialmente naquelas em que se tem tensoativos iônicos. Uma possível explicação para isso é que o co-tensoativo interage com a cauda apolar do tensoativo, possibilitando a formação de uma curvatura adequada da interface que separa a fase oleosa da fase aquosa. Essa curvatura se dá pela fluidez interfacial por penetrar no filme do tensoativo e ocupar lacunas existentes entre suas moléculas. Além de aumentar a extensão da região de microemulsão, a quantidade e tamanho do co-tensoativo apresenta influência na estrutura da microemulsão (OLLA et al., 1999). A adição de um co-tensoativo pode causar uma maior redução da tensão interfacial, podendo conduzir a valores transientes negativos, no qual a interface se expande para formar gotículas dispersas, e subsequentemente adsorve mais tensoativo e co-tensoativo até o ponto em que a tensão interfacial se torna próxima a zero. Este processo denominado emulsificação espontânea, forma as microemulsões.

Neste trabalho, optou-se pela preparação de uma microemulsão O/A para obter uma liberação prolongada do peptídeo estudado, devido ao seu caráter lipossolúvel. A preparação deste tipo de microemulsão foi propiciada devido às concentrações dos componentes utilizados na sua composição (10% de fase oleosa, 10% de sistema tensoativo e 80% de fase aquosa, como descrito no item 3.6). Dessa forma, o peptídeo em estudo marcado com a carboxifluoresceína poderia ser englobado no interior lipofílico da micela, aumentando a liberação.

1.1.2 Lipossomas

As primeiras tentativas para obtenção de um sistema transportador eficaz tiveram como base o encapsulamento das biomoléculas em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos (CHANG, 1964). No entanto, esta abordagem mostrou-se totalmente inadequada, visto que estas vesículas produzidas a partir de material artificial se acumulavam no organismo.

O primeiro grande passo nesta área ocorreu em 1965, com o trabalho desenvolvido por Alec Bangham e colaboradores, no qual foi realizada a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas as quais, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas (BANGHAM, 1965; SESSA & WEISSMANN, 1968).

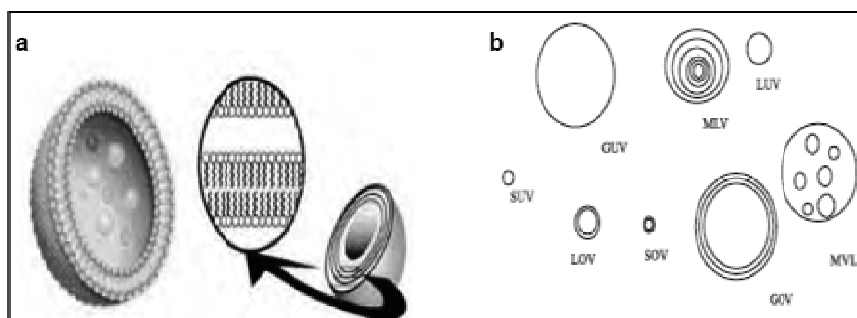
Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez, a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área (GREGORIADIS et al., 1971). Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídios

anfílicos, que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas do tipo “*concha esférica*”. Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídios sintéticos, disponíveis comercialmente.

Os lipossomas podem ser classificados em termos de tamanho, número de lamelas (e sua posição relativa), constituição lipídica (o que também condiciona a sua carga), estabilidade e modo de preparação (LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988). A partir da década de 80, foi adotada uma nomenclatura para os lipossomas baseada no número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho (SZOKA & PAPAHA DJOPOULOS, 1980). Assim, para os lipossomas de preparação mais imediata, ficou consagrado o nome de vesículas multilamelares ou *multilamellar vesicles* (MLV). Como o nome indica, estas vesículas são constituídas por várias bicamadas lipídicas, aproximadamente concêntricas, podendo o seu diâmetro variar entre 400 e 3500 nm. Dentre os lipossomas, os mais utilizados são as vesículas unilamelares grandes ou *large unilamellar vesicles* (LUV), de diâmetro superior a 200 nm, bem como as vesículas unilamelares pequenas ou *small unilamellar vesicles* (SUV), com diâmetros entre 20 e 200 nm. Existem ainda as vesículas unilamelares gigantes ou *giant unilamellar vesicles* (GUV), com dimensões superiores a 1 µm, podendo chegar a dezenas de micrômetros, tamanho comparável ao de uma célula eucariota, e as vesículas unilamelares médias ou *medium-sized unilamellar vesicles* (MUV), com dimensões compreendidas entre os SUV e os LUV. De menor importância, mas também caracterizados, encontram-se os lipossomas multivesiculares ou *multivesicular liposomes* (MVL) e as vesículas oligolamelares ou *oligolamellar vesicles* (OLV) que, a semelhança das unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas, grandes e gigantes (SOV, LOV e GOV) (LICHTENBERG

e BARENHOLZ, 1988). A Figura 2 representa de maneira esquemática os vários tipos de lipossomas.

Figura 2 - Representação esquemática de lipossomas. Em (a) modelo de lipossomas unilamelar e multilamelar. Em (b) mostrando a base de sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa (LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988).



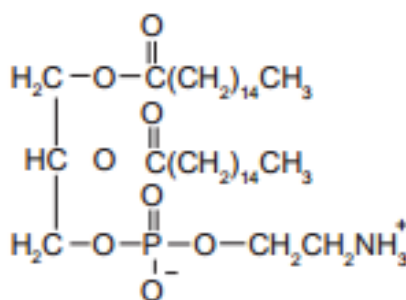
Alguns dos fosfolipídios utilizados na formulação de lipossomas podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 - Fosfolipídios utilizados na formulação de lipossomas (Informação obtida da *Avanti Polar Lipids*)

Fosfolipídios	Carbonos:Insaturação	Temperatura de transição (°C)	Carga líquida em pH 7,4
DLPC	12:0	-1	0
DMPC	14:0	23	0
DPPC	16:0	41	0
DSPC	18:0	55	0
DOPC	18:1	-20	0
DMPE	14:0	50	0
DPPE	16:0	63	0
DOPE	18:1	-16	0

O fosfolípido empregado na preparação dos lipossomas utilizados nesse trabalho foi o dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) (Avanti Polar Lipids®), conforme mostra a Figura 3, devido a sua estrutura química favorecer a interação com grupos hidroxilas da CB.

Figura 3 - Fórmula estrutural do DPPC (CHANG e YEH, 2012).



A larga aceitação da utilização de lipossomas para os mais diversos fins criou a necessidade de desenvolver métodos preparativos eficientes, reprodutíveis e com a simplicidade possível para aplicação em escala laboratorial e industrial. O tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação. Assim, a composição química, o número de camadas, a distribuição de tamanhos, o número de lamelas e o volume encapsulado influenciam consideravelmente na aplicação de lipossomas (LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988).

A preparação de vesículas lipídicas é realizada através da dissolução da fase lipídica em um solvente orgânico, evaporando-se em seguida este solvente para a formação de um fino filme lipídico. Posteriormente ocorre a hidratação do lipídio com uma fase aquosa. Nesta etapa, ocorre a formação de vesículas multilamelares grandes. Na maioria dos sistemas, um processamento secundário como extrusão ou

sonicação é necessário para a obtenção de um produto final com tamanho de partícula menor e bem definido (WOODLE e PAPAHAADJOPOULOS, 1989).

Neste trabalho, optou-se pela não definição do tamanho das partículas, podendo haver, portanto, partículas MLV, LUV e SUV.

1.2 Celulose Bacteriana (CB)

A celulose é o biopolímero mais abundante no mundo, com uma produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas (YU et al., 2008). A maior parte da produção ocorre a partir das paredes celulares das plantas, entretanto, pode ser obtida química e enzimaticamente por ação bacteriana. A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de β -D-glicopiranosose unidas em cadeias longas, não ramificadas, por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Este polímero pode ser dividido em duas formas nativas: a celulose pura, obtida diretamente de seu estado natural, por exemplo, do algodão, da celulose bacteriana, da celulose produzida por algumas algas; e a celulose complexa, que inclui a maior parte da celulose presente na natureza, componente fundamental da parede celular de plantas superiores, que contém impurezas como a lignina, a pectina e a hemicelulose (ATALLA e VANDERHART, 1999).

Atualmente acredita-se que a CB, um dos biopolímeros mais promissores, possa se tornar um dos produtos biotecnológicos mais importantes tanto para área da saúde quanto para o setor industrial, pois pode ser obtida em larga escala com baixo custo de fabricação a partir de rotas biossintéticas de bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*. Esta celulose é

quimicamente pura, livre de componentes biogênicos como as ligninas, as hemiceluloses e outros polissacarídeos encontrados embebidos na celulose vegetal, fator que diminui o custo final da produção.

Gluconacetobacter xylinus (*Acetobacter xylinum*) é uma bactéria gram-negativa quimioheterotrófica, que secreta celulose como camada de exopolissacarídeos; esta celulose extracelular está disposta em forma de fitas compostas de microfibrilas flutuantes organizadas de forma linear ao longo do eixo axial da bactéria (BROWN JR et al., 1976). Vigorosos tratamentos com bases fortes em altas temperaturas permitem a remoção das células bacterianas embebidas na trama e é possível conseguir um biomaterial não pirogênico, atóxico e biocompatível (CZAJA et al., 2006).

A membrana formada em condições de cultura estática resulta em uma estrutura tridimensional constituindo em um sistema ultrafino de nanofibras (10-50 nm), cujas fibras são orientadas uniaxialmente, o que não ocorre em celulose vegetal, cuja dimensão das fibras é micrométrica. Esta estrutura 3-D da CB resulta em uma celulose altamente cristalina (60-80%) quando comparado à celulose vegetal (~40%) e similar à cristalinidade do algodão (~70%) (YU et al., 2008), além disso, apresenta uma maior resistência à tração (CZAJA et al., 2004). As ligações de hidrogênio inter e intra-molecular é que mantêm as cadeias de celulose juntas conferindo essas propriedades, além de baixa solubilidade e alta retenção de água (VALLA et al., 1989).

A síntese da celulose pelo *Gluconacetobacter xylinus* é catalisada por quatro enzimas (VALLA et al., 1989):

- glicoquinase, responsável pela fosforilação da glicose ($C_6H_{10}O_5$)_n;
- fosfoglicomutase, a qual catalisa a isomerização da glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato;
- glicose-1-fosfato uridiltransferase, que sintetiza UDP-glicose (UDPG);
- celulose sintase, a qual produz celulose a partir da UDP-glicose.

Na ausência ou na carência da enzima glicose-1-fosfato uridiltransferase, não ocorre a formação das microfibrilas de celulose (VALLA et al., 1989).

Diferentemente de outros tipos de membrana sintética, a membrana de CB exibe uma alta resistência à corrosão química, é bio-inerte, biocompatível, porosa, e, ainda possui boa resistência à tração (GEYER et al., 1994), propriedades únicas que a tornam um biopolímero com grande potencial a ser explorado pela biotecnologia e outras áreas da ciência. Soma-se a isso, o seu potencial de uso em outros produtos comerciais, no campo alimentício (aditivo de baixo valor calórico, estabilizante, modificador de textura), nos setores farmacológicos (curativo temporário, excipiente, entre outros), na indústria de opto-eletrônicos (papel eletrônico), entre outras (KLEMM et al., 2005; BODHIBUKKANA et al., 2006; PERCORARO et al., 2008; EICHHORN et al., 2010).

No Brasil, nas décadas de 80 e 90, o curativo de CB (Biofill[®]) foi usado como instrumento na reconstrução e substituição temporária da pele, em queimaduras e outras situações como úlceras crônicas e enxertos (REBELLO et al., 1987; FONTANA et al., 1990; MAYALL et al., 1990; WOUK et al., 1998; ANDRADE et al., 2010), apresentando características importantes, sendo biocompatível, inerte e seletivamente permeável, permitindo assim, trocas gasosas. Atuou também como

uma barreira contra os micro-organismos, proporcionando uma recuperação mais rápida e menos dolorosa ao paciente, reduzindo as cicatrizes provocadas por esses tipos de ferimentos. De acordo com FARAH (1990), a membrana de CB aplicada sobre a região lesionada com perda de tecido epitelial agiu como uma nova pele, eliminando a sintomatologia dolorosa (pela isolação de terminações nervosas) e acentuando a absorção dos exudatos da ferida. Em odontologia, a membrana de CB foi empregada em regeneração óssea guiada em defeitos periodontais ou peri-implantares (NOVAES et al., 1990; NOVAES & NOVAES, 1993; NOVAES & NOVAES 1995; DOS ANJOS et al., 1998; SIMONPIETRI et al., 2000). A CB funcionou como uma barreira mecânica impedindo que células fibroblásticas e tecido conjuntivo fibroso invadissem o local dos defeitos ósseos, promovendo uma neoformação óssea efetiva no local, além de ser um tratamento de baixo custo. Mundialmente, a CB também vem sendo extensivamente alvo de estudos tanto no desenvolvimento de novos materiais quanto nos estudos “*in vitro*” e “*in vivo*”, devido a suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas. KLEMM et al. (2001) utilizaram membranas tubulares de CB “*in vivo*” (BASYC[®]) em regeneração de artérias em microcirurgias, as quais foram efetivas servindo como um ótimo scaffold para microcirurgias vasculares. WIPPERMANN et al. (2009) também relataram que enxertos tubulares de CB em artéria carótida de porcos foram eficazes. Estudos “*in vivo*” em subcutâneo de ratos verificaram que a CB foi biocompatível, podendo ser usada como scaffold para produtos de engenharia tecidual (HELENIUS et al., 2006; MENDES et al., 2009).

De acordo com os resultados da literatura citados anteriormente, a CB tem servido como uma eficiente matriz para aplicação na regeneração e na engenharia tecidual.

1.3 Fator de Crescimento

A reparação óssea é um processo fisiológico complexo envolvendo muitos fatores regulatórios locais e sistêmicos, como fatores de crescimento e diferenciação celular, hormônios, citocinas, e proteínas da matriz extracelular. Essas moléculas interagem com células pré-osteoblásticas desencadeando o processo de formação tecidual. Porém, os estágios de migração, de proliferação, de quimiotaxia, de diferenciação celular e de síntese de proteína extracelular podem ser afetados, já que cada uma dessas etapas é dependente das condições no local da injúria, como nível de fatores de crescimento, hormônios, nutrientes e pH (TSIRIDIS et al., 2007).

A maioria dos fatores de crescimento atua como mediadores locais desempenhando sua função a concentrações muito baixas nos líquidos corporais, da ordem dos picogramas. A função dos fatores de crescimento é regulada por diferentes mecanismos que controlam a ativação genética. Após o estímulo inicial fornecido pelas plaquetas frente a uma injúria, o próprio tecido é capaz de sintetizar algumas das substâncias necessárias para dar continuidade ao processo de reparo, como citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento da superfamília TGF- β (transforming growth factor- β), entre outros fatores, bem como, fatores angiogênicos (TSIRIDIS et al., 2007).

Células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos estão sujeitas à ação de fatores de crescimento. A função dos fatores de crescimento não é somente de estimular a proliferação de células mediante a regulação do ciclo celular, iniciando a mitose, mas também de manter a sobrevivência celular, além de estimular a migração, a diferenciação e também a apoptose celular. Os osteoblastos se proliferam mediados por fatores de crescimento liberados por si próprios e pelo osso

durante o processo de re-absorção; dentre os mais importantes estão o TGF- β e os fatores liberados pela matriz óssea, como o fator de crescimento similar a insulina (IGF-1 e 2), o fator de crescimento fibroblástico (FGF-2) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (AMADEI et al., 2006; TSIRIDIS et al., 2007), os quais são mitogênicos potentes (ASSOIAN et al., 1983; BIELBY et al., 2007). Além disso, outros fatores são secretados durante o processo de reparação, tais como os morfogenéticos (BMPs) e fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BIELBY et al., 2007).

Nos últimos anos, a tendência tem sido o emprego de peptídeos sintéticos, pela facilidade de reconhecimento e ligação aos sítios específicos das proteínas da matriz extracelular, aumentando a interação célula-material, e por não promoverem reação imunogênica (OLIVIER et al., 2004; KIM et al., 2008).

Desta forma, neste presente trabalho, a sequência peptídica reguladora de fator de crescimento ósseo, OGP, foi escolhida para testar sua eficiência de liberação a partir de alguns sistemas de liberação prolongada de fármacos, adsorvidos a uma matriz de CB, de forma a se elucidar a melhor maneira de conferir à CB propriedade de osteoindução.

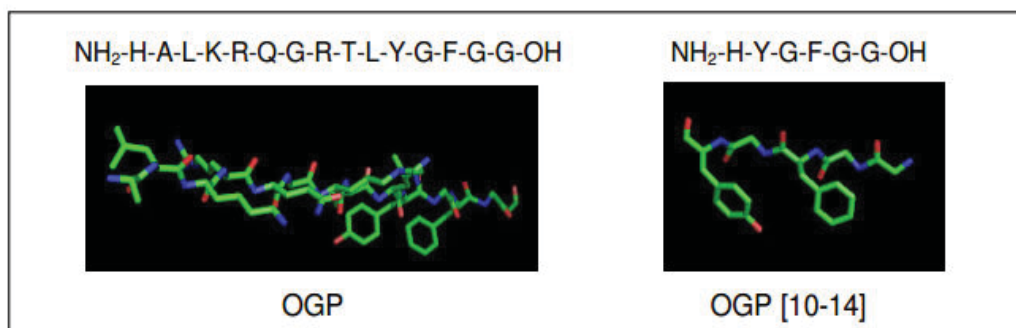
1.3.1 Peptídeo de crescimento osteogênico – (OGP)

O peptídeo de crescimento osteogênico (OGP – *osteogenic growth peptide*) foi descoberto no início dos anos 90, e trata-se de um peptídeo de ocorrência natural cuja estrutura primária (Figura 4) é idêntica à sequência C-terminal da histona H4. Está presente fisiologicamente no soro humano, de ratos, e aparentemente de

outras espécies de mamíferos em concentração micromolar (BAB et al., 1992), ou seja, esta conservação evolucionária indica a importância biológica do OGP (GREENBERG et al., 1995). Cerca de 90% do OGP sérico encontra-se especialmente na forma de um complexo de ligação à proteína, denominado proteína de ligação ao OGP-OGP (OGPBP-OGP) (BAB et al., 1992). O OGP pode se ligar não covalentemente a α 2-macroglobulina (α 2-M) do soro, em ambas as formas, nativa e ativada. A forma ativada gera ligações covalentes com as proteinases, em um processo que envolve uma mudança conformacional, tornando a molécula mais compacta, desta forma, diminui a disponibilidade do OGP para o sistema. A forma nativa aumenta imediatamente a disponibilidade do OGP para o sistema circulatório (GAVISH et al., 1997). Além disso, α 2-M parece ser a principal, se não o único complexo OGPBP plasmático.

A concentração do OGP sérico é aumentada transitoriamente durante uma injúria local ao tecido ósseo, medula óssea ou a reações osteogênicas sistêmicas, e também quando baixas doses de OGP exógeno, requerido para a estimulação da formação óssea, sugerem uma função auto-regulativa para os complexos OGPBPs (BAB et al., 1992; GUREVITCH et al., 1996; GREENBERG et al., 1997). BAB et al. (1999) verificaram que o OGP endógeno é um produto da clivagem proteolítica do PreOGP, o qual é traduzido do mRNA da H4(85-103). Este mecanismo biossintético aparentemente está presente em muitas, se não em todas, as células, podendo desempenhar uma função crucial no circuito de feedback positivo do OGP, controlando a proliferação e diferenciação celular. Ainda, a clivagem proteolítica do OGP pode gerar o pentapeptídeo OGP [10-14] (BAB et al., 1999).

Figura 4 - Estrutura primária dos peptídeos OGP e OGP [10-14]. (SASKA et al, 2011)



A função do OGP e de seus derivados, como o pentapeptídeo OGP [10-14] (Figura 4) é de estimular a osteogênese e a hematopoiese. Age na proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras e de células progenitoras hematopoiéticas. A regeneração hematopoiética está relacionada a um efeito secundário do OGP (CHEN et al., 2000; BAB & CHOREV, 2002; HUI et al., 2007).

Os peptídeos OGP e OGP [10-14], “*in vitro*”, possuem excelente potencial mitogênico para células de linhagem osteoblástica e fibroblásticas (BAB et al., 1992; GREENBERG et al., 1993; BAB e EINHORN, 1994), favorecem o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e da mineralização da matriz óssea (ROBINSON et al., 1995; BAB e CHOREV, 2002); além disso, o OGP mostrou ter uma melhor atividade da ALP quando comparado aos hormônios de crescimento e ao FGF (ROBINSON et al., 1995). Ainda, tanto o OGP quanto o OGP [10-14] regulam diretamente a diferenciação de células mesenquimais de medula em osteoblastos favorecendo assim a neoformação óssea (CHEN et al., 2007; VANELLA et al., 2010).

CHEN et al. (2000) verificaram que a preservação da sequência C-terminal, principalmente das cadeias laterais da Tyr e Phe, bem como, os resíduos de Gly são importantes para se ter uma ótima bioatividade. Outros estudos “*in vivo*” demonstraram que a administração diária via sistêmica do OGP estimulou a ossificação endocondral em locais de fratura tanto em ratos quanto em coelhos, reduzindo o tempo de reparação óssea (SUN e ASHHURST, 1998; BRAGER et al., 2000; GABET et al., 2004). Além disso, aumentou a densidade trabecular óssea e estimulou a modelação óssea de osso imaturo para osso lamelar (BAB et al., 1992; GREENBERG et al., 1995).

“*In vivo*”, o OGP regula a expressão dos fatores de crescimento de transformação TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, fator de crescimento fibroblástico FGF-2, fator de crescimento insulínico IGF-1 e do colágeno tipo I (BRAGER et al., 2000). Além disso, o OGP favorece a reparação da medula óssea recém-transplantada ou irradiada, com aumento considerável das células hematopoiéticas (GUREVITCH et al., 1996), e ainda com a vantagem de ser prontamente sintetizado, pode substituir ou suplementar a terapia convencional, a qual é muito cara. Defeitos ósseos tratados com scaffolds de PLGA com OGP sintético adsorvido foram reparados em um menor tempo em relação aos animais que receberam o OGP por via sistêmica; este estudo apontou um importante resultado na via de administração destes peptídeos, revelando um efeito terapêutico mais eficaz quando aplicado localmente (SHUQIANG et al., 2008). Desta forma, este peptídeo apresenta um grande potencial para ser utilizado na medicina regenerativa e, com seu estudo em diferentes sistemas de liberação de fármacos proposto neste trabalho, esse potencial pode ser ainda maior, vistas as vantagens desses sistemas já apresentadas no item 1.1.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada contendo OGP e incorporação destes à celulose bacteriana, para avaliar a capacidade de incorporação e velocidade de liberação destas formulações em meio fisiológico, buscando-se o controle da dose terapêutica diária para potencializar seus efeitos osteoindutores.

Objetivos específicos

- Síntese do OGP e posterior marcação com o fluoróforo 5,6-carboxifluoresceína (CF);

- Desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada, tais como microemulsão e lipossoma;

- Análise da liberação prolongada do peptídeo OGP-CF livre e contido nos sistemas, empregando Espectroscopia de Fluorescência;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese química do peptídeo OGP

O peptídeo OGP (Figura 4) foi sintetizado manualmente pelo método da fase sólida (STEWART e YOUNG, 1984), segundo o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN e WHITE, 2000). Partiu-se de 1 g de uma resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de 0,55 mmol/g) (Novabiochem[®]) e diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) (Fluka[®] e Advanced Chem Tech[®], respectivamente) como agentes de condensação. Os grupos protetores das cadeias laterais dos Fmoc-aminoácidos estão representados na Tabela 2. Os Fmoc-aminoácidos utilizados na síntese foram adquiridos da Novabiochem[®] ou da Advanced Chem Tech[®].

Tabela 2 - Grupos protetores dos aminoácidos utilizados na síntese do OGP

Fmoc - Aminoácido	Abreviação	Protetor da cadeia lateral
Arginina	Arg, R	pmc: 2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonila
Glutamina	Gln, Q	trt: tritila
Lisina	Lys, K	boc: tert-butiloxycarbonila
Tirosina	Tyr, Y	tbu: tert-butila
Treonina	Thr, T	tbu: tert-butila

Na etapa de condensação de cada aminoácido (acoplamento), foi utilizado um excesso molar, em relação ao grau de substituição inicial de três equivalentes para cada Fmoc-aminoácido e três equivalentes para DIC e HOBt, em uma mistura contendo diclorometano (DCM) e dimetilformamida (DMF) (1:1) (DCM, Synth[®] e DMF, Synth[®]). Na desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo Fmoc), foi empregada uma solução de piperidina 20% (v/v) (Merck[®]) em DMF.

A eficiência das etapas de condensação foi monitorada pelo teste de Kaiser (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (presença de grupos aminos livres), o processo de acoplamento era repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

A clivagem final do peptídeo da respectiva resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada utilizando uma parte da massa total obtida, empregando uma solução contendo 94,5% ácido trifluoracético (TFA), 2,5% etanoditiol (EDT), 0,5% tioanisol e 2,5% água deionizada a 25°C por 2 h sob agitação. Os reagentes desta solução foram adquiridos respectivamente da Fluka[®], Sigma[®] e Acros[®]; a água deionizada foi obtida através do sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos.

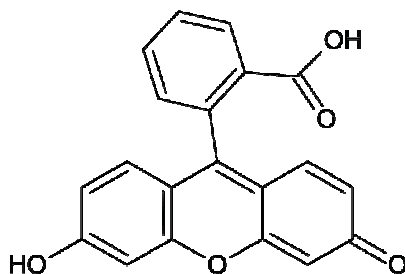
Após o procedimento de clivagem foi realizada a extração com ácido acético 10% em sistemas de seringas de polipropileno de 5 mL, equipadas com um filtro de polietileno poroso acopladas a um sistema de vácuo com frasco coletor para o peptídeo extraído. O extrato bruto do peptídeo foi liofilizado, obtendo-se ao final um material branco e floculoso.

O material obtido foi purificado utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e caracterizado por meio da análise de aminoácidos e espectrometria de massas (ES-MS positivo), conforme descrito posteriormente.

3.2 Síntese do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína

Para a obtenção do peptídeo OGP marcado e viabilizar os estudos de fluorescência, a sonda fluorescente fluoresceína foi acoplada ao peptídeo OGP. Para tanto, a molécula 5,6-carboxifluoresceína (CF, Sigma[®]) (Figura 5), foi acoplada à extremidade N-terminal do peptídeo.

Figura 5 - Fórmula estrutural da fluoresceína.



A síntese do peptídeo OGP marcado com CF foi desenvolvida pela metodologia da fase sólida nos mesmos moldes que a síntese descrita anteriormente, sendo utilizada parte da massa de peptidil-resina armazenada previamente. O protocolo sintético empregado para marcação da peptidil-resina foi o mesmo adotado durante todo processo sintético, utilizando CF como eletrófilo e

DIC/HOBt (Fluka[®]), como agentes de condensação, com um excesso molar em relação ao grau de substituição da peptidil-resina calculado (0,16 mmol/g) de cinco equivalentes para cada reagente em uma mistura de DMF e DCM (9:1); a reação de acoplamento ocorreu a temperatura ambiente por 2 h.

A clivagem final do OGP-CF da respectiva resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada com uma solução contendo 95% TFA, 2,5% Tioanisol e 2,5% água deionizada, a 25°C por 2 h sob agitação.

O peptídeo bruto OGP-CF foi precipitado e lavado com éter etílico gelado e centrifugado (seis vezes), foi extraído empregando uma mistura acetonitrila e água deionizada (1:1) a qual foi posteriormente concentrada em rota-evaporador. O extrato bruto do peptídeo foi liofilizado obtendo-se ao final um material amarelo e floculoso.

O material obtido também foi purificado utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e caracterizado por meio da análise de aminoácidos e espectrometria de massas (ES-MS positivo), conforme descrito a seguir.

3.3 Purificação dos compostos

Os produtos isolados foram analisados e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na escala analítica e semi-preparativa, respectivamente. Primeiro, o material bruto foi analisado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A, com

uma coluna C18 de fase reversa (Kromasil, 150 x 4,6 mm; d = 5 μm ; 300 Å). Nesta análise foram utilizados solventes A (água ultrapura contendo 0,045% de TFA) e B (acetonitrila, Mallinckrodt, contendo 0,036% de TFA) empregando um gradiente de 5 a 95% de B em 30 min com fluxo de 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, com detecção em 220 nm.

Após análise, o peptídeo bruto foi purificado em modo semi-preparativo utilizando um Cromatógrafo System Gold BECKMAN, com coluna C18 de fase reversa (Phenomenex, 250 x 21,20 mm; d = 5 μm ; 100 Å). Foram utilizados os solventes A e B empregando um gradiente ajustado de acordo ao perfil e ao pico de eluição obtidos no cromatograma analítico, que foi de 15 a 60% de B em 120 min com fluxo de 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para o peptídeo não marcado e 20 a 60% de B em 120 min com fluxo de 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o peptídeo marcado, com detecção em 220 nm.

3.4 Caracterização dos compostos

3.4.1 Espectrometria de massas

Análises das massas moleculares dos peptídeos foram realizadas por injeção direta em um aparelho Fison Plataforma ESI ("*eletrospray ionization*"), com injeção direta com uma bomba Shimadzu LC-10AD, sistema este controlado por uma Workstation Compaq modelo AP 200. A técnica baseia-se na ionização da amostra empregando uma fonte ESI e respectiva análise em um analisador quádruplo, obtendo-se ao final um espectro com picos na qual é possível determinar a razão massa molecular/carga (m/z) da molécula.

3.4.2 Análise de aminoácidos

Os peptídeos foram previamente pesados (aproximadamente 1,0 mg) e hidrolisados em 1 mL de HCl 6 mol.L⁻¹ e 160 µL de fenol 5% em água a 110°C por 72 horas em atmosfera de N₂ sob agitação. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido posteriormente em tampão de diluição citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 2,2 e filtrado em unidade GV Millex (0,22 µm) (Millipore) antes de ser injetado no aparelho.

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo Cromatógrafo Líquido Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A, empregando o método de funcionalização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA). O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de eluição de cada aminoácido e o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra. Para cálculo da proporção relativa dos aminoácidos das amostras determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média.

3.5 Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana

As mantas de celulose bacteriana (CB) foram fornecidas pela empresa Fibrocel – Produtos Biotecnológicos LTDA, situada em Ibiporã (PR). O cultivo das bactérias *Gluconacetobacter xylinus* foi realizado em meio de cultura estática em frascos *erlenmeyers* de 500 mL com tempo de cultivo de 120 h a 28°C (5 mm de espessura). O meio de cultura foi composto de 2% (m/v) glicose, 0,5% (m/v)

peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,27% (m/v) fosfato dissódico anidro e 0,115% (m/v) ácido cítrico monohidratado.

A celulose foi obtida em forma de uma membrana gelatinosa formada na interface meio de cultura/superfície. Para remover as bactérias, a membrana passou por tratamento químico empregando solução de hidróxido de sódio 2% a 80°C por 1 h e em seguida utilizou-se solução de hipoclorito de sódio 1% por 30 min, sendo posteriormente lavada exaustivamente com água destilada e acondicionada em água deionizada. Após várias trocas de água deionizada as membranas foram autoclavadas por 15 minutos a 120°C.

3.6 Preparação da microemulsão (ME) contendo o OGP-CF

A microemulsão foi preparada com 10% de colesterol (Sigma-Aldrich, USA) como fase oleosa, 10% de sistema tensoativo (oito partes de óleo de rícino 400E, seis partes de oleato de sódio e três partes de fosfatidilcolina de soja 100% Lipoid) e 80% de fase aquosa, a qual era composta por tampão fosfato pH 7,4 e peptídeo OGP-CF já solubilizado em quantidade suficiente para concentração final de 10^{-5} mol.L⁻¹.

Estes reagentes foram sonicados em sonicador de haste (Sonics®, Vibra-Cell), seguindo os seguintes parâmetros: amplitude = 21 - 22%; tempo = 20 minutos; e pulsos *on* = 59 segundos e *off* = 30 segundos.

3.6.1 Preparo do sistema tensoativo

O sistema tensoativo foi preparado com oito partes de óleo de rícino 400E (Eumulgin® HRE-40, Pharma Special), seis partes de oleato de sódio e três partes de fosfatidilcolina de soja 100% Lipoid (Gerbras).

Em graal de porcelana, foi adicionado o oleato de sódio e macerou-se bem. Em seguida, adicionou-se a fosfatidilcolina de soja e homogeneizou. Por último, foi adicionado o óleo de rícino e misturou-se até obtenção de uma pasta homogênea. Esse tensoativo deve ser armazenado à temperatura de -8 °C, ao abrigo da luz, quando não utilizado.

3.7 Preparação dos lipossomas contendo o OGP-CF

A incorporação do peptídeo OGP-CF nos lipossomas foi realizada de acordo com o seguinte procedimento (MORAES et al., 2010): uma solução de concentração 10^{-5} mol/L⁻¹ do peptídeo em metanol foi diluída em solução de DPPC a 1 mmol.L⁻¹ em metanol/clorofórmio (1:9). Após a diluição, a evaporação dos solventes foi feita em N₂ até a obtenção de um filme formado nas paredes do tudo de centrifugação. Posteriormente o filme formado foi hidratado com água ultrapura por 2 h, sendo que a solução obtida após hidratação foi utilizada para incorporação na CB. A proporção utilizada entre o fosfolípídeo e o peptídeo foi de 10:1 respectivamente.

3.8 Incorporação do peptídeo OGP-CF e dos sistemas de liberação na CB

A incorporação do peptídeo e dos sistemas de liberação foi realizada pelo processo de adsorção. Por este processo o peptídeo interage com a CB por ligações de hidrogênio e/ou iônicas, cuja liberação ocorre com a elevação da força iônica do meio (condições biológicas). De acordo com BAB et al. (1992) e Spreafico et al. (2006), concentrações do peptídeo menores que 10^{-14} mol.L⁻¹ resultam em acentuada proliferação celular, sendo que a concentração de 10^{-9} mol.L⁻¹ promove uma melhor atividade da fosfatase alcalina, maior formação e mineralização de nódulos de osso neoformado. Porém, em análises prévias empregando diversas soluções de OGP-CF, observou-se a baixa sensibilidade do espectrofluorímetro utilizado, para estas concentrações, porém com sensibilidade para concentrações entre 10^{-5} mol.L⁻¹ e 10^{-8} mol.L⁻¹. Portanto, para viabilizar a análise das amostras neste equipamento, partiu-se de uma solução 10^{-5} mol. L⁻¹ de OGP-CF para adsorção direta na CB e para o preparo dos sistemas de liberação também estudados (ME e lipossomas). Para este processo de incorporação, cada amostra de CB (5 mm de diâmetro) foi imersa em 10 mL da solução de OGP-CF e também dos sistemas de liberação ME e lipossomas, por 72 h a 10°C.

Após esse período de 72 h, as membranas foram secas em estufa a 37 °C por mais 72 h para posterior análise de liberação do peptídeo. Todos os ensaios de incorporação foram feitos em triplicata.

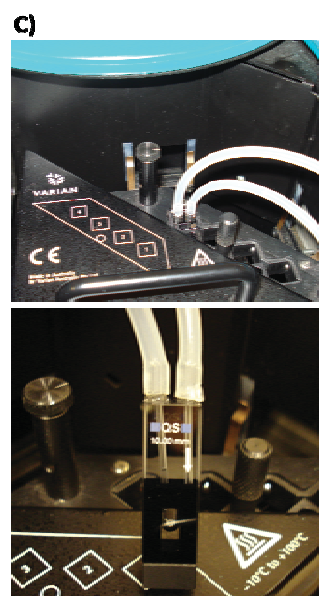
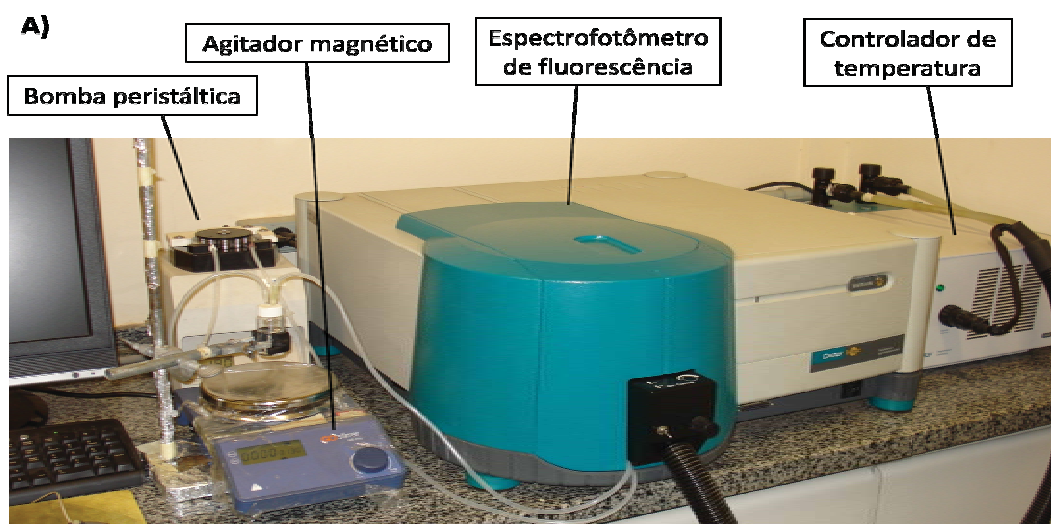
3.9 Determinação da liberação do peptídeo na CB

Cada amostra já seca, foi imersa em 30 mL de solução tampão fosfato (PBS) (pH 7,4), volume capaz de preencher todo circuito do equipamento. A amostra foi mantida sob agitação a uma temperatura de 37°C durante o período de análise. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram de 492 e 520 nm, respectivamente, com medidas em triplicata para cada amostra. A aquisição dos dados de intensidade de fluorescência foi realizada em um sistema fechado acoplado a um espectrofotômetro de fluorescência VARIAN CARY ECLIPSE (Analysis Package *software*) por meio de mangueiras de silicone ajustadas a uma cubeta de fluxo de 450 µL (Hellma QS 10 x 4 mm), sendo todo fluxo da solução mantido por uma bomba peristáltica. O sistema utilizado está demonstrado na Figura 6.

O tempo de aquisição dos dados foi de 24 h, monitorado da seguinte maneira: a primeira medida em tempo inicial ($T = 0$ min), posteriormente seguido de medidas a cada 1 min durante 60 min, depois a cada 5 min durante a segunda hora e a cada 15 min durante 300 min. Após 5 h de aquisição, as medidas foram realizadas a cada 30 min até completar as 24 h de análise.

A concentração de peptídeo foi obtida através da curva padrão obtida com o peptídeo marcado livre em solução PBS.

Figura 6 - Sistema utilizado para os estudos de liberação. A) Sistema completo. B) Aproximação do recipiente contendo as membranas e o tampão PBS para fluxo contínuo, assim como as mangueiras de silicone responsáveis pelo fluxo de entrada e saída do tampão. C) Aproximação do interior do espectrofotômetro no qual está localizada a cubeta e detalhe para local de entrada e saída da cubeta, proporcionando o fluxo e leituras contínuas.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e purificação do peptídeo OGP e OGP-CF

Para a obtenção da sequência peptídica estudada neste trabalho empregou-se um método de síntese química conhecido como Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS). Este nome é devido ao fato de que o grupo α -carboxílico do aminoácido C-terminal encontra-se covalentemente ligado a um suporte polimérico ou resina (MERRIFIELD, 1984). Um reagente químico, denominado ativador ou agente de acoplamento é utilizado para ativar o grupo carboxílico de um aminoácido, o qual sofre ataque nucleofílico do grupo α -amino de um aminoácido ou do aminoácido N-terminal de um fragmento peptídico ligado à resina, resultando deste modo na formação de uma ligação amida (peptídica) entre eles.

A estratégia de síntese utilizada foi a Fmoc/tBu, isto é, os grupos α -amino dos aminoácidos estão protegidos por uma molécula estável ao TFA e lábil a bases orgânicas, como a piperidina. Nesta estratégia, as cadeias laterais reativas dos aminoácidos trifuncionais, estão protegidas por grupos t-butílicos ou derivados, os quais são estáveis a bases orgânicas e lábeis ao TFA.

A SPFS é empregada para a obtenção de peptídeos sintéticos devido a sua praticidade, rapidez e possibilitar a síntese individual ou em paralelo. Essa inovadora metodologia conduziu Bruce Merrifield ao Prêmio Nobel de Química em 1984.

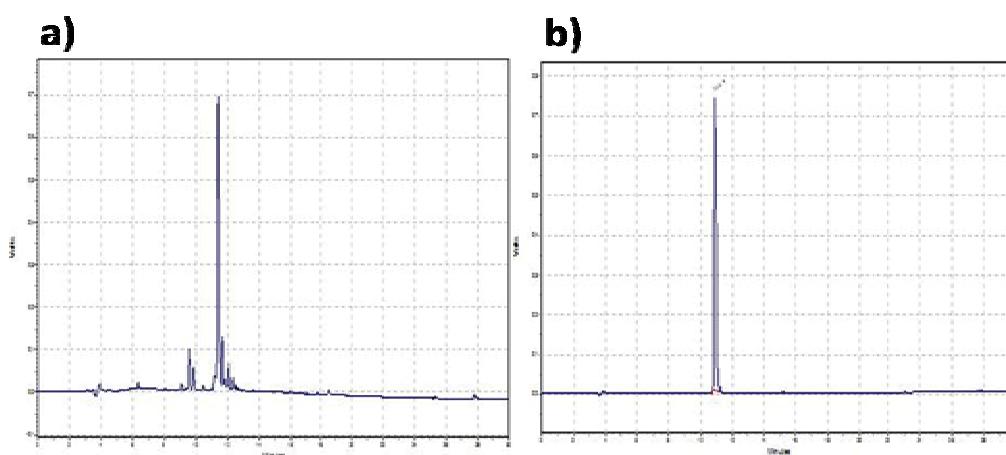
Ao término da síntese do OGP, a massa obtida foi de 1,73 g, a qual foi dividida em partes, sendo uma delas submetida ao processo de clivagem. Após o procedimento de clivagem, foi realizada a extração do peptídeo OGP com ácido

acético 10%. O extrato bruto foi liofilizado e o produto (63 mg) foi submetido à análise em CLAE em modo analítico.

A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do OGP, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa.

O composto bruto (63 mg) foi purificado em modo semi-preparativo com um programa gradiente na faixa de 15 a 60% de solvente B em 120 minutos com fluxo de 5 ml por minuto. O material foi detectado em um comprimento de onda de 220 nm, sendo as frações puras caracterizadas em modo analítico com programa isocrático de 25% de solvente B com fluxo de 1 mL por minuto. Obtiveram-se três frações (1a, 1b e 2a), que diferiram no tempo de retenção e na pureza. A fração 1a foi repurificada, obtendo-se um material com pureza maior (Figura 7).

Figura 7 - Cromatogramas do peptídeo OGP bruto (a) e após purificação (b).



O rendimento da purificação foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. A Tabela 3 mostra os valores de rendimento da purificação e a pureza relativa do peptídeo. O resultado de pureza relativa do peptídeo indica que os métodos desenvolvidos com essa finalidade foram executados adequadamente.

Tabela 3 - Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP.

Peptídeo	Massa – bruto (mg)	Massa – purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
OGP	63,0	39,7	63	100

A identidade molecular do peptídeo OGP foi confirmada por determinação da correspondente massa molecular, 1.523,8 g/mol, determinada pela técnica ES-MS positivo [ES $m/z = 763 (M + 2H)^{+2}$].

Os resultados obtidos por intermédio da análise de aminoácidos para determinação da proporção relativa de cada um dos aminoácidos utilizados na síntese do OGP foram condizentes com o teórico esperado (1.523,8 g/mol).

Os resultados mostraram que os procedimentos utilizados desde a síntese até a purificação foram executados com sucesso, levando à obtenção da sequência desejada, sendo confirmada através dos dados de pureza relativa, massa molecular e análise de aminoácidos do peptídeo OGP sintetizado.

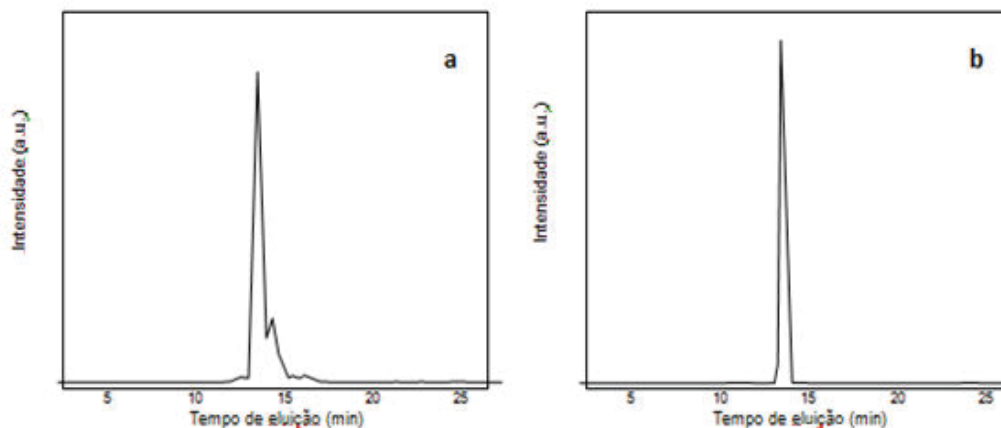
A síntese do peptídeo OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína foi desenvolvida pela metodologia de fase sólida nos mesmos moldes que a síntese

descrita anteriormente. Da massa total de peptidil-resina, uma parte (968 mg) foi utilizada para acoplar a carboxifluoresceína (CF). Decorrido o acoplamento da CF foi realizado o processo de clivagem de uma fração da peptidil-resina marcada (200 mg), seguido da extração do peptídeo OGP-CF. O extrato bruto do peptídeo foi liofilizado e o valor da massa obtida OGP-CF foi de 87 mg.

Em seguida, o peptídeo foi submetido à análise em CLAE em modo analítico, resultando no perfil cromatográfico do extrato bruto apresentado na Figura 8a. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do OGP-CF, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa, com um programa de 20 a 60% de B em 120 min com fluxo de $3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. O cromatograma obtido após o processo de purificação está representado na Figura 8b.

O perfil cromatográfico do OGP-CF puro apresentou um pico único em relação ao cromatograma observado a partir da análise do extrato bruto. O parâmetro tempo de retenção do OGP-CF purificado foi mantido em relação ao pico correspondente ao OGP-CF bruto.

Figura 8 - Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP-CF bruto (a) e purificado (b).



O rendimento da purificação foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. O valor de rendimento da purificação e o valor da massa do OGP-CF (Tabela 4) foram baixos, evidenciando alguma perda no processo de purificação de peptídeos. Os resultados de pureza relativa do peptídeo indicam que os métodos desenvolvidos com essa finalidade foram executados adequadamente.

Tabela 4 - Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP-CF.

Peptídeo	Massa – bruto (mg)	Massa – purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
OGP-CF	87,0	29,0	33,3	95

A análise do espectro de massas obtido no modo positivo confirmou a obtenção do produto esperado. O valor da massa molecular obtida [ES $m/z = 942,00$ ($M+2H$)⁺², 628,51 ($M+3H$)⁺³ e 471,72 ($M+4H$)⁺⁴] foi correspondente ao valor teórico esperado (1.882,50 g/mol).

Os resultados mostraram que os procedimentos utilizados para a síntese da sequência, desproteção, clivagem e purificação foram realizados satisfatoriamente, levando à obtenção da sequência desejada, sendo confirmada através dos dados de pureza relativa, massa molecular e análise de aminoácidos do produto sintetizado.

4.2 Adsorção do peptídeo OGP-CF e dos sistemas de liberação às membranas de celulose

A espectroscopia de luminescência foi escolhida para monitorar a liberação do peptídeo em solução a partir das membranas de celulose bacteriana, pois é uma ferramenta analítica extremamente sensível e tem sido amplamente aplicada na resolução de problemas que requerem baixos limites de detecção, podendo ser facilmente encontrados na literatura trabalhos mostrando análises em nível de traços (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A luminescência envolve vários tipos de fenômenos ópticos, sendo que os mais difundidos referem-se à fluorescência molecular, à fosforescência e à quimiluminescência.

O fenômeno fotoluminescência ocorre quando uma molécula é excitada através da absorção de fótons de luz ($h\nu_{ex}$) e promovida para um estado eletrônico

de maior energia, cujo retorno ao estado fundamental é acompanhado pela emissão de radiação eletromagnética (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

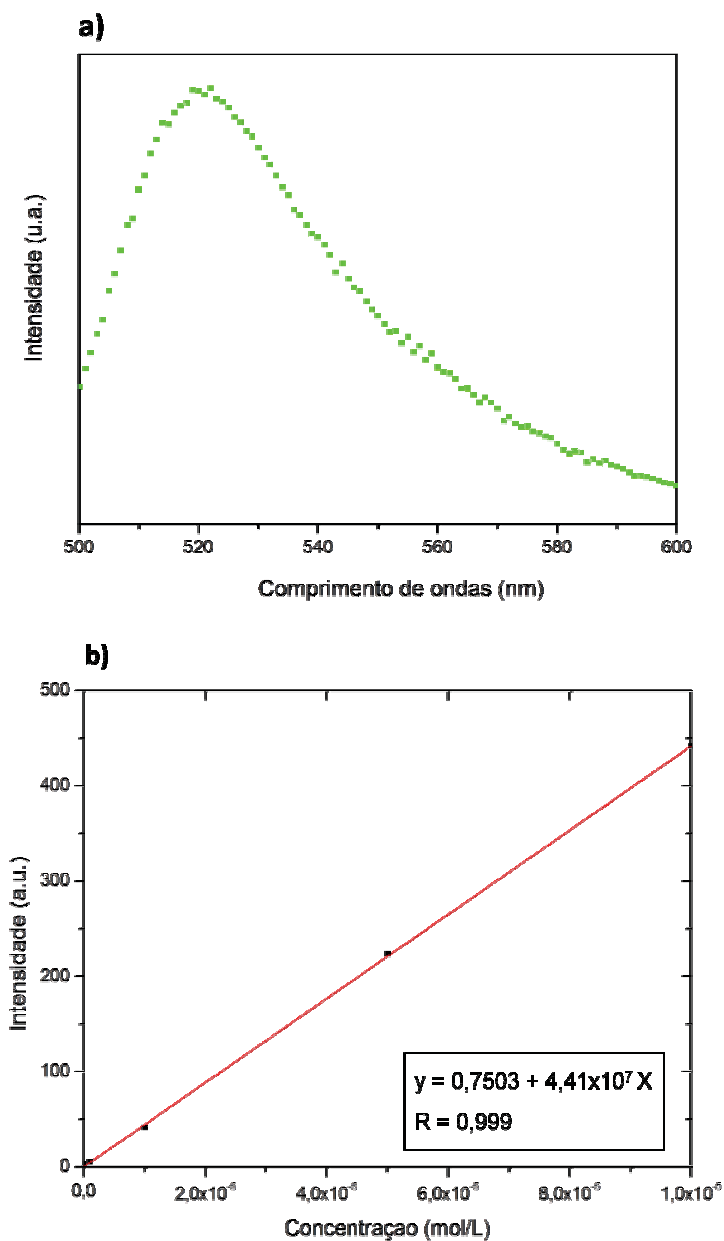
A luminescência molecular é dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. A energia eletrônica responsável pela transição fluorescente não envolve uma mudança no número quântico do spin do elétron, e passa do nível $S_0 \rightarrow S_1$, emitindo radiação desde o nível excitado S_1 para algum dos níveis vibracionais do estado eletrônico S_0 . Como consequência, a fluorescência possui tempos de vida extremamente curtos, com a luminescência cessando quase que imediatamente, por volta de 10^{-9} a 10^{-6} s (ns a μ s) (SOTOMAYOR et al., 2008). A fluorescência é emitida em comprimentos de onda maiores àqueles de excitação, deslocando-se entre 50 e 150 nm, quando comparado ao comprimento de onda da luz usado para a excitação da molécula, conhecido como *deslocamento de Stokes* (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996).

Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto, T_n) (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996). Contudo, este tipo de transição é menos provável que a transição envolvendo dois estados singletos (fluorescência), pois processos paralelos de desativação como a conversão interna e externa e o relaxamento vibracional podem competir com a fosforescência. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples, além de possuir grande sensibilidade (SOTOMAYOR et al., 2008).

Como o peptídeo estudado não apresenta fluorescência intrínseca, para tornar possível o emprego da técnica foi acoplada à extremidade N-terminal do peptídeo uma sonda fluorescente.

Primeiramente, foi traçado um espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF livre para determinar o comprimento de onda máximo de emissão (Figura 9a), sendo fixado o monocromador de excitação a 492 nm (λ máximo de absorção) e obtendo-se, portanto, λ máximo de emissão de 520 nm. Desta forma, fixando os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) em 492 nm e de emissão (λ_{em}) em 520 nm, foi obtida a curva padrão de fluorescência do OGP-CF (em tampão fosfato pH 7,4 a temperatura ambiente) para auxiliar na quantificação do peptídeo adsorvido no material analisado (Figura 9b).

Figura 9 - Espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF (a) e Curva padrão OGP-CF em solução tampão PBS pH 7,4 (b).



Para o conhecimento exato da eficiência da liberação, era necessário quantificar o quanto do peptídeo livre ou presente nos sistemas de liberação estavam sendo adsorvidos na membrana de celulose. Após o ensaio de cinética de

adsorção, percebeu-se que não havia diferenças entre as leituras inicial (T_{0h}), intermediária e final (T_{72h}). Como a solução de peptídeo livre utilizada na adsorção direta e na preparação dos sistemas de liberação para o mesmo fim estava na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹, ou seja, na maior concentração que o equipamento conseguia detectar de acordo com os parâmetros utilizados para análise, deduziu-se que a quantidade de peptídeo livre ou nos sistemas de liberação adsorvidos nas membranas fosse tão pequena que o equipamento, nos parâmetros selecionados, não era sensível o suficiente para detectar tal alteração em um meio tão concentrado.

Frente a isso, analisou-se a possibilidade de realizar a adsorção com soluções mais diluídas do peptídeo. Porém, quando essas membranas fossem para os ensaios de liberação, o qual possui um volume de 30 mL de tampão fosfato no sistema, o que diluiria ainda mais o peptídeo adsorvido, as leituras seriam imprecisas, visto que o limite mínimo de detecção do equipamento para este peptídeo nos parâmetros utilizados era de 10^{-8} mol.L⁻¹, como assegurado pelos limites da curva de calibração.

Assim, como o objetivo principal desse trabalho era comparar o comportamento da liberação do peptídeo livre e contido em sistemas de liberação, através de membranas de celulose bacteriana, optou-se por prosseguir com a adsorção sem os valores de sua cinética, ou seja, sem saber ao certo qual era a concentração máxima de peptídeo que a membrana adsorveria, mas utilizando a solução com a maior concentração possível (10^{-5} mol.L⁻¹) a fim de que a quantidade adsorvida fosse maior e, conseqüentemente, maior a quantidade liberada posteriormente, para detecção do equipamento. Desse modo, mesmo não sabendo a concentração máxima de peptídeo adsorvida na membrana, seria possível

observar o comportamento das curvas de liberação e saber em qual sistema (livre, ME ou lipossoma) o peptídeo apresentaria liberação mais eficaz e prolongada.

Para tanto, partiu-se do pressuposto de que 100% do número de mols de OGP-CF contido na solução de adsorção foram adsorvidos na membrana, para possibilitar os cálculos de liberação e permitir a visualização do comportamento de liberação.

As amostras foram imersas na solução de peptídeo livre em solução PBS pH 7,4, na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹ e os sistemas de liberação preparados com mesma solução e mantidas nesse contato por 72 h, a 4 °C. Após o período de incorporação, as membranas foram retiradas e levadas para secagem em estufa a 37 °C por mais 72 h.

4.3 Determinação da liberação do peptídeo OGP-CF

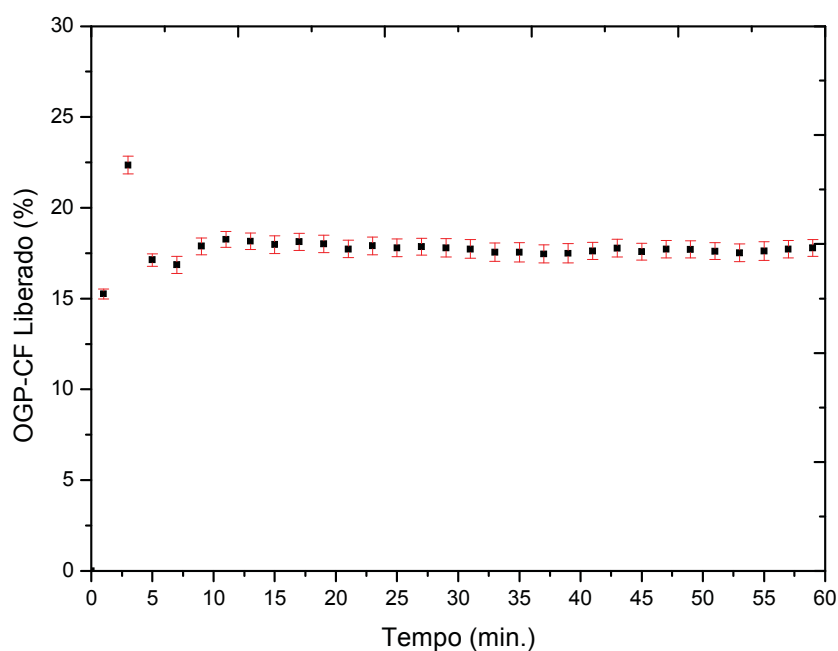
A liberação “*in vitro*” do peptídeo OGP-CF da membrana de CB foi monitorada por espectroscopia de fluorescência ($\lambda_{exc} = 492$ nm e $\lambda_{em} = 520$ nm) a 37°C por um período de 24 h em circuito fechado com fluxo contínuo em solução PBS (pH 7,4).

Os perfis de liberação cumulativos plotados em função do tempo são apresentados nas Figuras 10, 11 e 12 para o peptídeo livre em PBS, na microemulsão e no lipossoma, respectivamente.

A Figura 10 mostra que a quantidade adsorvida de OGP-CF livre foi liberada da membrana nos primeiros 5 minutos, equivalendo a aproximadamente 22% do valor teórico de 100% incorporado à membrana de CB; a partir desse período, a

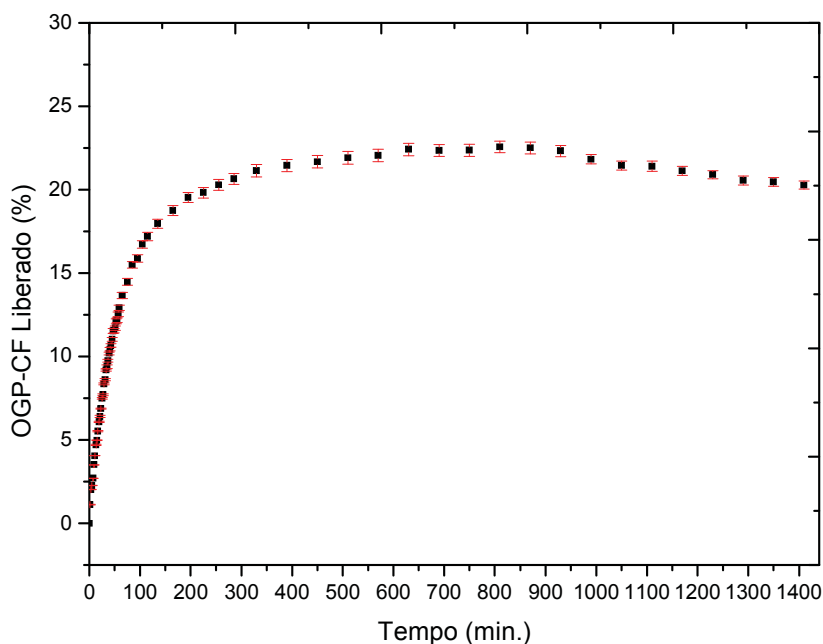
liberação do peptídeo cessa e a concentração se mantém constante já na primeira hora, por volta de 17%, devido à diluição pelo volume contido no sistema. Essa rápida liberação do peptídeo livre nos primeiros minutos de análise pode estar relacionada à sua ligeira solubilidade em meio aquoso; além disso, a alta hidrofiliabilidade da CB pode fazer com que o meio aquoso rapidamente penetre em sua rede de nanofibras, interagindo com o peptídeo que foi adsorvido na membrana. Esse tipo de comportamento de liberação não é desejado quando se busca uma liberação prolongada, uma vez que esta deve manter a liberação da molécula por um período de tempo determinado durante o tratamento, evitando administrações sucessivas e melhorando a terapia (UHRICH et al., 2009).

Figura 10 - Curva de liberação do peptídeo OGP-CF adsorvido na membrana de CB, com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata.



Na Figura 11 observa-se a liberação do OGP-CF a partir do sistema de ME. Nota-se uma liberação acelerada do peptídeo nas primeiras 2,3 h, alcançando um valor de 18% do valor teórico incorporado à membrana de CB; a partir desse período, observa-se uma liberação mais lenta do peptídeo até aproximadamente 6,5 h, com liberação máxima de 21,5% do OGP-CF teórico incorporado, seguido de uma liberação constante nas próximas 24 h. Esse comportamento é típico de um sistema de liberação prolongada, podendo a liberação inicial ser mais rápida pelo fato de uma fração do OGP-CF estar interagindo com a interface da ME, fazendo com que essas moléculas sejam rapidamente liberadas. Esse comportamento inicial é seguido por uma liberação lenta, a qual corresponde às moléculas do peptídeo que interagem mais fortemente à estrutura interna da ME (KARAVELIDIS et al., 2011). Além disso, moléculas do OGP-CF podem estar dissolvidas na fase interna da ME O/A pelo fato da molécula de carboxifluoresceína possuir caráter lipofílico, o que proporciona uma liberação mais lenta em relação ao fármaco livre, mostrando que esse tipo de sistema atua como reservatório, proporcionando um efeito prolongado (OLIVEIRA et al., 2004).

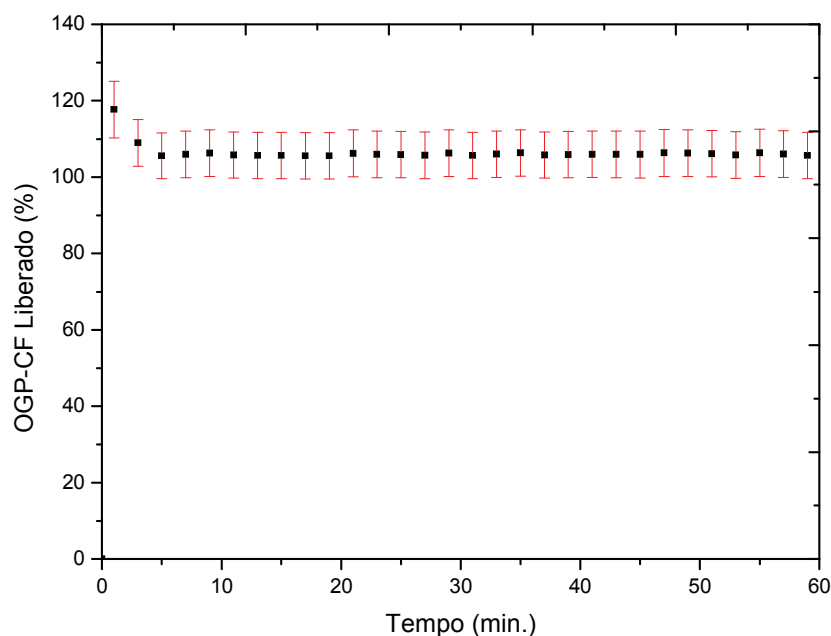
Figura 11 - Curva de liberação da microemulsão, contendo o peptídeo OGP-CF, adsorvida na membrana de CB, com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata.



A Figura 12 mostra a liberação do OGP-CF a partir do sistema de lipossoma, cujo máximo de liberação é de aproximadamente 120% do valor teórico incorporado à membrana de CB após aproximadamente 2 minutos; a partir desse período, a concentração do peptídeo liberado se manteve constante. A metodologia utilizada pode gerar vesículas com variabilidade de tamanhos, podendo chegar de 50 a 400 nm, uni ou multilamelar. Na Figura 12 pode-se observar uma liberação acima de 100%, ou seja, uma liberação maior do que a quantidade teórica de OGP-CF incorporada na formulação. Esse efeito pode ser explicado pelo fato da eficiência de incorporação dos lipossomas na CB ter sido muito baixa. Os lipossomas foram preparados sem um controle de tamanho, gerando em sua maioria vesículas de tamanho superior aos poros da CB, levando a uma baixa incorporação. Dessa

forma, as vesículas não incorporadas que interagem com a superfície do lipossoma podem ser responsáveis por um efeito denominado espalhamento de luz, no qual a luz incidida sobre a amostra é espalhada devido à alta concentração de partículas no meio e gera uma intensificação da fluorescência, o que não condiz com o valor real de liberação, levando ao rápido equilíbrio na liberação e valores constantes, como demonstrado na Figura 12.

Figura 12 - Curva de liberação do lipossoma, contendo o peptídeo OGP-CF, adsorvido na membrana de CB, com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em triplicata.



Comparando-se as três análises, fica evidente que o uso de um sistema de liberação prolongada é vantajoso para a incorporação do OGP, visando futuramente seu uso médico. Por se tratar de um peptídeo, o OGP pode sofrer degradação

enzimática quando em contato com fluidos biológicos e, estando em um sistema de liberação prolongada, isso lhe confere proteção contra esse tipo de obstáculo, o que pode aumentar a sua atividade terapêutica na regeneração óssea, necessitando de uma menor concentração do peptídeo na formulação dos sistemas, gerando economia e eficácia no tratamento, uma vez que a liberação por parte de um dispositivo de $6,0 \times 10^{-12}$ mol de OGP é suficiente para estimular a proliferação das células osteoblásticas (BAB et al., 1992; UHRICH et al., 1999; LAWRENCE & REES, 2000; SASKA et al., 2011; SASKA et al., 2012).

Mesmo não sabendo exatamente a capacidade de incorporação do peptídeo livre e dos sistemas de liberação na CB, nota-se uma melhora substancial no perfil de liberação do OGP quando presente na microemulsão. Essa melhora é tanto em relação à quantidade liberada, que se mostrou maior, quanto ao tempo de liberação que também foi mais prolongado em relação ao peptídeo livre. Devido à característica anfifílica dos tensoativos utilizados na ME e dos fosfolípidios utilizados nos lipossomas, esses sistemas podem incorporar uma maior quantidade do peptídeo, uma vez que este também possui características anfifílicas devido aos vários resíduos de aminoácidos, podendo aumentar conseqüentemente a concentração incorporada na CB. (LAWRENCE e REES, 2000; RAWAT et al., 2008).

Além disso, a grande presença de poros na rede de nanofibras da CB pode permitir uma maior aglomeração das partículas dos sistemas de liberação, que levam consigo uma maior concentração do peptídeo, indicando que a CB pode ser utilizada com sucesso como matriz de ancoragem para os sistemas de liberação.

SASKA et al. (2011 e 2012) demonstraram que mesmo uma concentração menor de peptídeo livre incorporado à CB, no valor de 10^{-8} mol.L⁻¹, pela mesma

metodologia aqui descrita, foi capaz de desenvolver uma ação osteoindutiva considerável “*in vivo*”. Isso mostra que o aumento da concentração de OGP carregado pelos sistemas de liberação e o prolongamento da sua liberação decorrente do microemulsionado levam a avanços benéficos na terapia de regeneração óssea.

5. CONCLUSÕES

A partir da formulação dos sistemas de liberação prolongada contendo o peptídeo OGP-CF e da análise do perfil de liberação desses sistemas e do peptídeo livre a partir da matriz de celulose bacteriana, conclui-se que:

- A metodologia de espectroscopia de fluorescência utilizada para análise de liberação do OGP-CF mostrou-se sensível para a sonda fluorescente de caboxifluoresceína;
- Apesar da imprecisão nos ensaios de adsorção, foi possível se observar com clareza que os sistemas de liberação são mais efetivos do que a simples liberação do peptídeo livre quando se trata de uma liberação prolongada do OGP para um meio externo;
- O sistema de ME mostrou um melhor desempenho quando comparado ao lipossoma, uma vez que liberou uma maior concentração do peptídeo em um maior intervalo de tempo;
- A CB pode ser utilizada com sucesso como matriz de ancoragem para o sistema microemulsionado, uma vez que após os ensaios de 24 h, mostrou-se íntegra, o que vai ao encontro do maior tempo necessário para os sistemas liberarem o peptídeo ao meio externo;
- Tendo em vista a melhora da liberação do OGP pelos sistemas, a ME pode ser alvo futuro para desenvolvimento clínico de formulações indicadas para biomateriais para regeneração óssea, tendo a CB como matriz.

6. PERSPECTIVAS

Como proposta para estudos futuros, pode-se citar:

- Melhoramento da metodologia de adsorção do peptídeo livre e dos sistemas de liberação prolongada na CB, a fim de se determinar precisamente as quantidades adsorvidas e liberadas nos ensaios, para obtenção de informações mais completas;
- Estudo "*in vivo*" com as membranas de CB contendo os sistemas de liberação prolongada com o peptídeo OGP, para avaliar se há melhora da liberação dos mesmos "*in vivo*", conseqüentemente controlando a concentração liberada, na tentativa de se conseguir uma dose terapêutica diária ideal para potencializar os efeitos osteoindutores deste peptídeo;
- Estudo desses sistemas de liberação prolongada a partir de compostos à base de CB e que contenham, por exemplo, colágeno e hidroxiapatita incorporados à membrana;

7. REFERÊNCIAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **APPS PharmSci**, v. 2, n. 3, p. 398-400, 2000.

AMADEI, S. U. et al. Influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

ANDRADE, F. K. et al. Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 4034-4041, 2010.

ASSOIAN, R. K. et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 11, p. 7155-7160, 1983.

ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. The role of solid state C-13 NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 15, n. 1, p. 1-19, 1999.

AVANTI POLAR LIPIDS, The phospholipids and sphingolipid people home page. Disponível em: < <http://avantilipids.com/> > Acesso em: 02 jan 2013.

BAB, I.; CHOREV, M. Osteogenic growth peptide: from concept to drug design. **Biopolymers**, v. 66, n. 1, p. 33-48, 2002.

BAB, I. A.; EINHORN, T. A. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone-marrow repair. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 358-365, 1994.

BAB, I. et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP) - a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. **Embo Journal**, v. 11, n. 5, p. 1867-1873, 1992.

BAB, I. et al. Biosynthesis of osteogenic growth peptide via alternative translational initiation at AUG(85) of histone H4 mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 14474-14481, 1999.

BANGHAM, A. D. et al. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. **Methods in Membrane Biology**, vol. 1, p. 61-68, 1974.

BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38, p. S26-32, 2007, Suppl. 1.

BIO FILL PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS (BRASIL). L. F. X. Farah. **Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby artificial skin graft and its use.** US 4912049, 30 Sept. 1990, 10 June 1986.

BODHIBUKKANA, C. et al. Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 1, p. 43-56, 2006.

BRAGER, M. A. et al. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 18, n. 1, p. 133-139, 2000.

BROWN, R. M. Jr.; WILLISON, J. H. M.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 12, p. 4565-4569, 1976.

CASTILLO, R. Surfactants and Microemulsions, 2002. [On-line] Disponível em: <http://www.fisica.unam.mx/liquids/tutorials/microemulsions.htm>. Acesso em: 15 jun. 2011.

CERA, L. F. R.; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil, 2002.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. **New York: Oxford University Press**, 2000.

CHANG, H. I. & YEH, M. K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 49-60, 2012.

CHANG, T. M. Semipermeable microcapsules. **Science**, v. 146, n. 3643, p. 524-525, 1964.

CHEN, J. et al. Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, on line, DOI: 10.3109/03639045.2012.668912, 2012.

CHEN, Y. C. et al. Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)]. **Journal of Peptide Research**, v. 56, n. 3, p. 147-156, 2000.

CHEN, Z. X. et al. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Regulatory Peptides**, v. 142, n. 1-2, p. 16-23, 2007.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 11, p. 1561-1572, 1995.

CRUZ, D'J. O.; UCKUN, M. F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, Stoneham, v. 64, p. 113-123, 2001.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3-4, p. 403-411, 2004.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

DALMORA, M. E.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 184, n. 2, p. 157-164, 1999.

DOS ANJOS, B. et al. Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of Class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. **Journal of Periodontology**, v. 69, n. 4, p. 454-459, 1998.

EICHHORN, S. J. et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 1, p. 1-33, 2010.

FENDLER, R. et al. On the investigation of D.C. plasmatron discharges by optical emission spectrometry. **Thin Solid Films**, v. 96, p. 235-240, 1982.

FONTANA, J. D. et al. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, p. 253-264, 1990.

GABET, Y. et al. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 65-73, 2004.

GAVISH, H. et al. Human alpha(2)-macroglobulin is an osteogenic growth peptide-binding protein. **Biochemistry**, v. 36, n. 48, p. 14883-14888, 1997.

GEYER, U. et al. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, n. 6, p. 343-347, 1994.

GREENBERG, Z. et al. Mitogenic action of osteogenic growth peptide (OGP) - role of amino and carboxy-terminal regions and charge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1178, n. 3, p. 273-280, 1993.

GREENBERG, Z. et al. Structural and functional-characterization of osteogenic growth peptide from human serum - identity with rat and mouse

homologs. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 8, p. 2330-2335, 1995.

GREENBERG, Z. et al. Isolation of osteogenic growth peptide from osteoblastic MC3T3 E1 cell cultures and demonstration of osteogenic growth peptide binding proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 359-367, 1997.

GREGORIADIS, G. & RYMAN, B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. **The Biochemical Journal**, v. 124, n. 5, 58p, 1971.

GUREVITCH, O. et al. Osteogenic growth peptide increases blood and bone marrow cellularity and enhances engraftment of bone marrow transplants in mice. **Blood**, v. 88, n. 12, p. 4719-4724, 1996.

HELENIUS, G. et al. *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 431-438, 2006.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. 6. ed. Porto Alegre: **Bookman**, 2009.

HUI, Z. et al. C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide regulates hematopoiesis in early stage. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 6, p. 1423-1429, 2007.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KARAVELIDIS, V. et al. Evaluating the effects of crystallinity in new biocompatible polyester nanocarriers on drug release behavior. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 3021-3032, 2011.

KIM, T. I. et al. Biomimetic approach to dental implants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 22, p. 2201-2211, 2008.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 16, p. 123-126:369-85, 2006.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 33, p. 337-462, 1988.

LUNDON, K. et al. The long-term effect of ovariectomy on the quality and quantity of cancellous bone in young macaques. **Bone and Mineral**, v. 24, p. 135-149, 1994.

MAYALL, R. C. et al. Tratamento das úlceras tróficas dos membros com um novo substituto de pele. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 80, n. 4, p. 257-283, 1990.

MENDES, P. N. et al. In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 12, 2009.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. 2th ed. New York: **Pierce Chemical**, 1984.

MORAES, M. L. et al. Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated in liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, p. 268-274, 2010.

NOVAES JUNIOR, A. B.; NOVAES, A. B. Bone formation over a TiAl6V4 (IMZ) implant placed into an extraction socket in association with membrane therapy (Gengiflex). **Clinical Oral Implants Research**, v. 4, n. 2, p. 106-110, 1993.

NOVAES JUNIOR, A. B.; NOVAES, A. B. Immediate implants placed into infected sites: a clinical report. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 10, n. 5, p. 609-613, 1995.

NOVAES JUNIOR, A. B.; MORAES, N.; NOVAES, A. B. Uso do BioFill como membrana biológica no tratamento de lesão de furca com e sem a utilização de hidroxiapatita porosa. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 47, n. 5, p. 29-32, 1990.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, p.131-138, 2004.

OLIVIER, V.; FAUCHEUX, N.; HARDOUIN, P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 18, p. 803-811, 2004.

OLLA, M. et al. Microemulsions and emulsions in DDAB/W/oil systems. **Colloids and Surfaces A**, v. 160, p. 23–36, 1999.

PERCORARO, E. et al. Bacterial cellulose from *Gluconacetobacter xylinum*: preparation, properties and applications. In: BALGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). Monomers, polymers composites and renewable resources. Amsterdam: **Elsevier**. v. 1, cap. 17, p. 369-383, 2008.

RAWAT, M. et al. Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides. **The Pharmaceutical Society of Japan**, v. 128, n. 2, p. 269-280, 2008.

REBELLO, C. et al. Bio-fill, um novo substituto de pele: nossa experiência. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 77, n. 6, p. 407-414, 1987.

ROBINSON, D.; BAB, I.; NEVO, Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 5, p. 690-696, 1995.

SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **International Journal of Biomaterials**, DOI:10.1155/2011/175362, 2011.

SASKA, S. et al. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 23, n. 9, p. 2253-2266, 2012.

SESSA, G. & WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 9, n. 3, p. 310-318, 1968.

SHUQIANG, M. et al. Osteogenic growth peptide incorporated into PLGA scaffolds accelerates healing of segmental long bone defects in rabbits. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 61, n. 12, p. 1558-1560, 2008.

SIMONPIETRI, C. J. et al. Guided tissue regeneration associated with bovine-derived anorganic bone in mandibular class II furcation defects. 6-month results at re-entry. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 6, p. 904-911, 2000.

SIROTTI, C. et al. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. **Journal of Membrane Science**, v. 204, p. 401-412, 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 7th ed. Philadelphia: Saunders College, 1996.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102 – 110, 2005.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

SPREAFICO, A. et al. Osteogenic growth peptide effects on primary human osteoblast cultures: potential relevance for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 4, p. 1007-1020, 2006.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D.; RB, M. Solid phase peptide synthesis. 2nd ed. New York: **Pierce Chemical**, 1984.

SUN, Y. Q.; ASHHURST, D. E. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits. **Cell Biology International**, v. 22, n. 4, p. 313-319, 1998.

SZOKA, F. Jr. & PAPAHAADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 9, p. 467-508, 1980.

TROTTA, M. et al. Investigation of the phase behaviour of systems containing lecithin and 2-acyl lysolecithin derivatives. **International journal of pharmaceutics**, v. 190, n. 1, p. 83-89, 1999.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, p. S11-S25, 2007. Suppl 1.

UHRICH, K. E. et al. Polimeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 3181-3198, 1999.

VALLA, S. et al. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter-xylinum*- complementation of cellulose-negative mutants by the udpg pyrophosphorylase structural gene. **Molecular & General Genetics**, v. 217, n. 1, p. 26-30, 1989.

VANELLA, L. et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 236-243, 2010.

WARGAFTIG, T. N. Desenvolvimento de microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra tuberculose. Dissertação de Mestrado. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista**. Araraquara, 2000, 90p.

WIPPERMANN, J. et al. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. **European Journal of Vascular Endovascular Surgery**, v. 37, n. 5, p. 592-596, 2009.

WOODLE, M. C. & PAPAHAADJOPOULOS, D. Liposome preparation and size characterization. **Methods in Enzymology**, v. 171, p. 193-217, 1989.

WOUK, A. F. P. F. et al. Membrana biológica (Biofill) - estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização de pele em suínos: aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 31-37, 1998.

YU, H. et al. Effect of porosity and pore size on microstructures and mechanical properties of poly-epsilon-caprolactone- hydroxyapatite

composites. **Journal of Biomedical Materials Research** Part B: Applied Biomaterials, v. 86B, n. 2, p. 541-547, 2008.