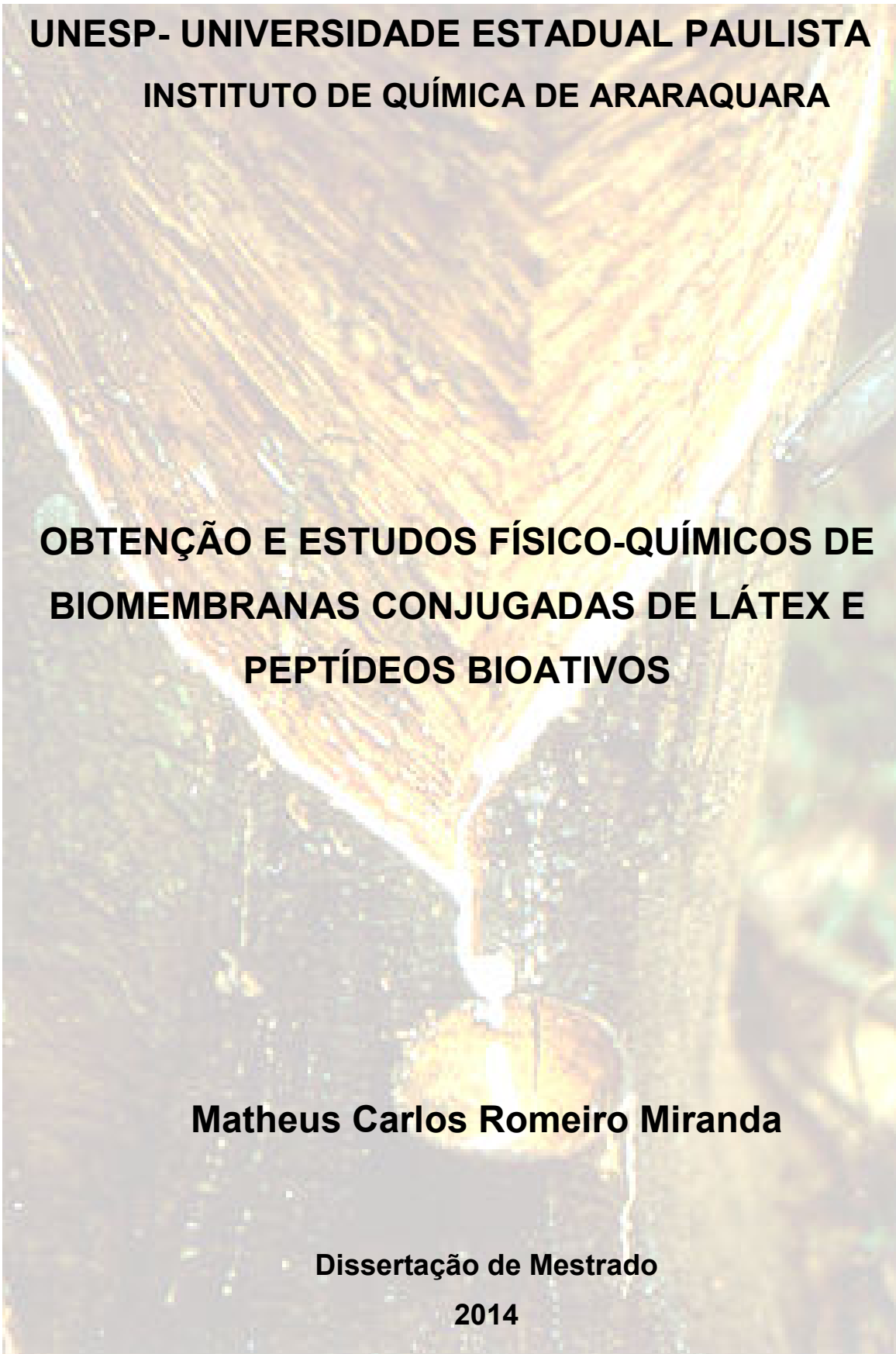




**UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

**OBTENÇÃO E ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE
BIOMEMBRANAS CONJUGADAS DE LÁTEX E
PEPTÍDEOS BIOATIVOS**

Matheus Carlos Romeiro Miranda

Dissertação de Mestrado

2014

MATHEUS CARLOS ROMEIRO MIRANDA

**Obtenção e estudos físico-químicos de biomembranas
conjugadas de látex e peptídeos bioativos.**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
com parte dos requisitos para a obtenção
do título de mestre em Biotecnologia.**

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Coorientador: Rondinelli Donizetti Herculano

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

M672o Miranda, Matheus Carlos Romeiro
Obtenção e estudos físico-químicos de biomembranas
conjugadas de látex e peptídeos bioativos / Matheus Carlos
Romeiro Miranda. – Araraquara : [s.n], 2014
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Eduardo Maffud Cilli
Coorientador: Rondinelli Donizetti Herculano

1. Biotecnologia. 2. Biomateriais. 3. Liberação
controlada. 4. Peptídeos. I. Título.

MATHEUS CARLOS ROMEIRO MIRANDA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 28 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. RICARDO JOSÉ DE MENDONÇA
Universidade Federal do Triângulo Mineiro / UFMT / Uberaba

DADOS CURRICULARES

Matheus Carlos Romeiro Miranda

1.DADOS PESSOAIS

Nascimento: 04/06/1988, Ribeirão Preto – SP

Filiação: José Carlos Miranda e Ana Lucia Romeiro Miranda

RG: 32593990-1/ SSP

CPF: 357.814.748-62

Endereço residencial: Rua Dom Pedro II, 1771

Campos Elíseos – Araraquara – SP

CEP: 14.085-580

Telefone: (16) 3612-1266

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2010 – Atual Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Título: Obtenção e estudos físico-químicos de biomembranas conjugadas de látex e peptídeos bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Bolsista: CAPES

2006 – 2010 Graduação em Ciências - Habilitação Plena em Biologia.
Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigos publicados em periódicos: 2

3.2 Resumos publicados em anais de eventos: 2

4. PROJETOS DE PESQUISA

4.1 2012 – Atual - Peptídeos antimicrobianos: efeito da dimerização e produção de biomembranas de látex/peptídeos. Processo: FAPESP 2012/15346-7

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família (José, Ana, Danielle e Mônica), pelo amor, carinho, compreensão e muito incentivo, sem eles seria difícil caminhar.

Agradecimentos

Ao Prof. Eduardo, meu orientador , por abrir as portas do seu laboratório; pela confiança, apoio nos momentos difíceis e pela orientação profissional e pessoal.

Ao Prof. Rondinelli, meu co-orientador, pelo apoio, ensinamentos profissionais e pessoais e pela confiança em nosso próximo projeto.

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Júlia, Lentilha, Prof. Saulo, Edson(Araka), Ana Carla, Rute, Aderson, Anderson pelo companherismo e por fazer mas fácil e divertido o trabalho.

Ao Paulo, Camila, Norival, Esteban e Larrissa pelos ensinamentos e apoio em todas as horas.

Aos meus amigos da república “DEUS LHE PAGUE”: Glauco, Juhan, Timor, Gian, Peterson, Paulo pela amizade e companherismo.

À Célia e à Wennia da Seção de Pós-graduação por serem muito prestativas comigo.

Ao Prof. Dr. Reinaldo e Prof. Dr. Marlus pelas opiniões e conselhos dados no exame de qualificação.

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À CAPES pela bolsa.

E à FAPESP por finaciar o projeto que no qual sou integrante.

“A voz de Deus nos diz constantemente: uma falsa ciência faz um homem ateu, mas uma verdadeira ciência leva o homem a Deus.”

Voltaire

RESUMO

A biomembrana de látex natural (NRL – *Natural Rubber Latex*), manipulada a partir do látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, tem apresentado grande potencial de aplicação no campo da biomedicina e dos biomateriais. Devido à sua biocompatibilidade e baixa taxa de rejeição, ela tem sido utilizada para próteses e enxertos, atuando como estimulante da angiogênese, adesão celular e matriz extracelular, além de atuar como barreira física a agentes infecciosos e liberação controlada de fármacos e extratos. O objetivo desse trabalho consistiu na incorporação de peptídeos bioativos em biomembranas de látex natural (NRL) e no estudo de sua liberação. Somado a isto, foi desenvolvido um novo método de polimerização das biomembranas utilizando o liofilizador e adição de água, caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), teste de resistência mecânica (texturômetro) e ensaio de permeabilidade ao vapor de água. Este método, mostrou aumentar a porosidade da biomembrana, em comparação com a obtida pelo método convencional, que utiliza a estufa como ferramenta de secagem. O estudo de liberação dos peptídeos foi realizado inicialmente utilizando um espectrofotômetro na região do ultravioleta. Os peptídeos estudados foram o antimicrobiano Hyline a1[W6] e o peptídeo de crescimento osteogênico OGP(10-14), cuja liberação não evidenciada por CLAE e espectrometria de massas. Outros dois peptídeos de tamanho menor e mais simples em sua composição de aminoácidos também foram avaliados: Acetil-WAA e Acetil-WAAAA. Estes apresentaram liberação de 14% e 32% respectivamente. Os resultados obtidos indicaram que, provavelmente a presença de proteases no látex promoveu a degradação dos peptídeos Hyline a1[W6] e OGP(10-14). De uma forma geral, os resultados mostraram que a utilização da biomembrana como meio para liberação de peptídeos é sequência dependente. Somado a isto, as biomembranas polimerizadas via liofilizador mostraram ser uma ótima alternativa para estudo liberação controlada de fármacos.

Palavras chave: Biomateriais. Biomembrana de látex natural. Liberação controlada. Peptídeos.

ABSTRACT

The biomembrane natural latex (NRL - Natural Rubber Latex), manipulated from the latex obtained by rubber tree *Hevea brasiliensis*, has shown great potential for application in biomedicine and biomaterials. Due to its biocompatibility and low bounce rate, it has been used for prostheses and grafts, acting as a stimulant of angiogenesis, cell adhesion and extracellular matrix, as well as acting as a physical barrier to infectious agents and controlled release of drugs and extracts. The aim of this work was the incorporation of bioactive peptides on natural biomembrane latex (NRL) and on the study of its release. In addition, we developed a new method of biomembranes polymerisation. The biomembrane produced with this new method of polymerization was characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), mechanical endurance test (texturometer) and testing of water vapor permeability. This method using the lyophilizer and addition of water was shown to increase the porosity of the biomembrane compared polymerized by the conventional method which uses as oven drying tool. The release study of the peptides was performed initially using a spectrophotometer in the ultraviolet region. The peptides studied were the antimicrobial Hyline a1[W6] and osteogenic growth peptide OGP (10-14), which did not show release. This result was confirmed by HPLC and mass spectrometry. Two other smaller and simpler peptides in their amino acid composition were also evaluated: Acetyl-WAA and Acetyl-WAAAA, which had release rates of 14% and 32% respectively. The results indicated that the likely presence of proteases in the latex promoted the degradation of peptides Hyline a1[W6] and OGP(10-14). Overall, the results showed that the use of latex as a means for release of peptides is sequence dependent. Added to this, biomembranes polymerized via lyophilizer shown to be a great alternative for controlled drug release.

Keywords: Biomaterials. Controlled release. Natural latex biomembrane. Peptides.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Monômero de cis-poliisopreno	20
Figura 2. Uso do látex como estimulador de regeneração celular. Nota-se um evidente aumento da vascularização na região tratada com a biomembrana de látex	22
Figura 3. Biomembrana utilizada como barreira mecânica, impede a migração de células epiteliais e conjuntivas, facilitando a migração de células regenerativas (HERCULANO, 2009)	23
Figura 4. Estrutura primária do peptídeo OGP (10-14)	24
Figura 5. Rã <i>Hyla albopunctata</i>	25
Figura 6. Protocolo utilizado na síntese de peptídeos em fase sólida	27
Figura 7. Cromatograma obtido em escala analítica do peptídeo Hyлина-a1[W6] na forma bruta (7A) e purificada (7B) - tempo de retenção de 16,2 min	34
Figura 8. Espectro de massas da fração purificada do peptídeo Hyлина-a1	35
Figura 9. Cromatograma obtido em escala analítica do peptídeo OGP(10-14) com tempo de retenção de 7,5 min	36
Figura 10. Espectro de massas do peptídeo OGP(10-14)	37
Figura 11. Cromatograma obtido para o peptídeo Ac-WAA com tempo de retenção de 6,5 min	38
Figura 12. Espectro de massas do peptídeo Acetil-WAA	38
Figura 13. Cromatograma obtido em escala analítica do peptídeo Ac-WAAAA com o tempo de retenção de 7,5 min	39
Figura 14. Espectro de massas do peptídeo Acetil-WAAAA	39
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura, látex puro com adição de água e polimerizado em estufa a 37 °C	41
Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura látex puro polimerizado em estufa a 37 °C	41
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura Látex puro com adição de água e polimerizado em liofilizador	42
Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura Látex puro polimerizado em liofilizador	42

Figura 19. Permeabilidade ao vapor de água das biomembranas	43
polimerizadas no liofilizador (círculo cheio) e estufa 37°C (círculo vazio)	
Figura 20. Liberação de substâncias pelo látex puro obtido pela fluorimetria	44
(em vermelho) e do látex contendo o peptídeo Hylina a1[W6] (em preto)	
Figura 21. Liberação do látex puro e do látex contendo o peptídeo Hylina	45
a1[W6] acompanhada pela absorção da solução em 280 nm	
Figura 22. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro,	46
B) do látex contendo o peptídeo Hylina a1[W6] e C) Hylina [W6] pura	
Figura 23. Espectro de massas da solução de liberação do látex contendo	47
o peptídeo Hylina a1[W6]	
Figura 24. Comparação dos gráficos de liberação do látex puro e OGP(10-	48
14) obtidos em UV- vis	
Figura 25. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro,	49
B) solução de liberação do látex/OGP(10-14) e C) OGP(10-14) puro	
Figura 26. Espectro de massas da solução de liberação do peptídeo	49
OGP(10-14)	
Figura 27. Curvas de liberação do látex puro (vermelho) e do látex	50
contendo o peptídeo Ac-WAA (verde) obtidas por espectrofotometria na	
região do UV (280 nm)	
Figura 28. Curvas de liberação do látex puro (vermelho) e do látex	51
contendo o peptídeo Ac-WAAAA (laranja) obtidas por espectrofotometria na	
região do UV (280 nm)	
Figura 29. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro,	51
B) solução de liberação do látex/Acetil-WAA e C) Acetil-WAA puro	
Figura 30. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro,	52
B) solução de liberação do látex/Acetil-WAAAA e C) Acetil- WAAAA puro	
Figura 31. Perfis cromatográficos da solução de liberação da biomembrana	53
polimerizada contendo BSA na estufa a 27°C, 0 a 48 h	
Figura 32. Perfis cromatográficos da solução de liberação da biomembrana	53
polimerizada contendo BSA na estufa a 37°C, 0 a 48 h	
Figura 33. Perfis cromatográficos da liberação da solução da biomembrana	54
polimerizada contendo látex liofilizada, 0 a 48 h	
Figura 34. Gráfico de liberação de BSA pelo látex polimerizado a 27°C	55

Figura 35. Gráfico de liberação de BSA pelo látex polimerizado a 27°C	55
Figura 36. Gráfico de liberação de BSA pelo látex polimerizado via liofilizador	56
Figura 37. Análise por CLAE da solução inicial do peptídeo Hyllina a1[W6] (A) e após 5 dias incubação com o látex (B)	57
Figura 38. Análise por CLAE da degradação do peptídeo Hyllina a1 pela solução liberada pelo látex nos tempos de: A) 0, B) 1 e C) 24 h	58
Figura 39. Análise de degradação dos peptídeos pela solução liberada pelo látex com diferentes tratamentos térmicos. a) Controle - peptídeo em água deionizada; b) Biomembrana confeccionada com o látex aquecido em estufa por 5 dias a 80°C; c) Biomembrana confeccionada com o látex aquecido em estufa por 30 min a 80°C; d) Biomembrana confeccionada com o látex autoclavado por 20 min a 120°C; e) Biomembrana confeccionada com o látex autoclavado por 1 h a 120°C; f) Controle - Biomembrana confeccionada com o látex sem tratamento térmico	59
Figura 40. Comparação dos gráficos de liberação das biomembranas com e sem o Hyllina a1[W6] produzidas com o látex tratados na estufa por 5 dias a 80°C puro, obtidos em por meio da absorção na região do UV	60
Figura 41. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro, B) solução de liberação do látex/Hyllina a1[W6] e C) Hyllina a1[W6] pura (biomembrana produzida com o látex tratados na estufa por 5 dias a 80°C)	61
Figura 42. Microscopia eletrônica de varredura do látex puro tratado por 5 dias a 80°C com adição de água e polimerizado em liofilizador	62
Figura 43. Microscopia eletrônica de varredura Látex puro tratado por 5 dias a 80°C e polimerizado em liofilizador	62
Figura 44. Microscopia eletrônica de varredura do látex puro tratado por 5 dias a 80°C e polimerizado em estufa a 37 °C	62
Figura 45. Cromatogramas obtidos da degradação do peptídeo Hyllina a1[W6] na solução obtida de látex autoclavado por 1 h a 120°C no tempo de 0, 4, 8, 24 e 48 h	63
Figura 46. Espectro de massas do peptídeo obtido da degradação da Hyllina a1[W6]	64

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação para mensurar a resistência do material	30
Equação 2. Equação que mensura a elasticidade do material	30
Equação 3. Equação para mesurar a transmissão de vapor de água	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Polímeros sintéticos utilizados na fabricação de sistemas de liberação controlada	19
Tabela 2 . Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de sistema de liberação	19
Tabela 3. Condições cromatográficas empregadas na purificação da Hylina a1 [W6]	28
Tabela 4. Dados propriedades mecânicas do látex polimerizado na estufa a 37°C e látex polimerizado no liofilizador	43
Tabela 5. Ensaio de permeabilidade ao vapor de água do látex polimerizado na estufa a 37°C e látex polimerizado no liofilizador. TTVA - Taxa de transmissão ao vapor de água e TVA - permeabilidade ao vapor de água	44

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

1. Aminoácidos

Ala (A)- Alanina

Arg (R)- Arginina

Asn (N)- Asparagina

Gln (Q)- Glutamina

Gly (G)- Glicina

Ile (I)- Isoleucina

Leu (L)- Leucina

Lys (K)- Lisina

Phe (F)- Fenilalanina

Pro (P)- Prolina

Ser (S)- Serina

Thr (T)- Treonina

Trp (W)- Triptofano

Tyr (Y)- Tirosina

2. Outras

ACN- Acetonitrila

BSA- SoroAlbumina Bovina

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCM- Diclorometano

DIC- N,N'-diisopropilcarbodiimida

DMF- N,N-dimetilformamida

ESI- Eletrospray Ionization

Fmoc- Fluorenilmetiloxycarboxila

HOBt- N-Hidroxibenzotriazol

MEV- Microscópio Eletrônico de Varredura

NRL- Natural Rubber Latex

NRLb- Natural Rubber Latex Biomedical

SCL- Sistema de Liberação Controlada

SPFS- Síntese de peptídeos em fase sólida

OGP- Osteogenic Growth Peptide

PA- Poli(ácido acrílico)

PAM- Peptídeo antimicrobiano
PDS- Poli(diaxanona)
PEG- Polietilenoglicol
PGA- Poli(ácido glicólico)
PHEMA- Poli(metacrilato de 2-hidroxietila)
PLA- Poli(ácido láctico)
PLC- poli- ϵ -caprolactona
PLGA- poli(ácido láctico-co-glicólico)
PMMA- poli(metacrilato de metila)
PVP- Polivinilpirrolidona
TFA- Ácido trifluoroacético
TIPS- Separação de Fase Induzida Termicamente
TIS- Triisopropilsilano
TTVA- Taxa de Transmissão de Vapor de Água
TVA- Transmissão de Vapor de Água
UR- Umidade relativa

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Liberação controlada	18
1.1.1 Sistema de liberação controlada baseada em polímeros	19
1.2 Látex natural	20
1.3 Peptídeos de crescimento osteogênico – (OGP e OGP (10-14)) ..	24
1.4 Hylina a1	25
2. Objetivos	25
3. Materiais e métodos	26
3.1 Síntese de peptídeos em fase sólida	26
3.2 Purificação dos peptídeos	28
3.3 Espectrometria de massas	28
3.4 Confeção das biomembranas	29
3.5 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura	29
3.6 As propriedades mecânicas	30
3.7 Permeabilidade ao vapor de água	31
3.8 Ensaio de liberação dos peptídeos	32
3.9 Experimento de degradação do peptídeo pelas substâncias liberadas pelo látex com a presença da biomembrana no meio	32
3.10 Tratamentos térmicos do látex	33
3.11 Experimento de degradação do peptídeo pelas substâncias liberadas pelas biomembranas de látex	33
4. Resultados e Discussão	34
4.1 Síntese de peptídeo em fase sólida Hylina a1[W6]	34
4.1.1 Hylina a1[W6]	34
4.1.2 OGP (10-14)	36
4.1.3 Acetil- WAA e Acetil- WAAAA	37
4.2 Obtenção e caracterização das biomembranas de látex natural ...	40

4.2.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura	40
4.2.2 Propriedades mecânicas	42
4.2.3 Permeabilidade ao vapor de água	43
4.3 Estudo da liberação dos peptídeos.....	44
4.3.1 Liberação Hylina a1[W6].....	45
4.3.2 Liberação peptídeo OGP (10-14).....	47
4.3.3 Liberação BSA.....	52
4.4 Experimento de degradação do peptídeo pelas substâncias liberadas pelo látex	56
4.5 Experimento de degradação sem a presença da biomembrana de látex.....	57
4.6 Análise de degradação do peptídeo pelas enzimas liberadas pelo látex tratados termicamente	58
4.7 Ensaios de liberação de Hylina a1[W6] a partir do látex tratado em estufa a 80°C por 5 dias	59
4.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura	61
4.9 Estudo da degradação do peptídeo Hylina a1[W6].....	63
5. CONCLUSÃO.....	65
Referências	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Liberação controlada

A liberação controlada implica na associação, química e/ou física, de fármacos com materiais biocompatíveis. Estes sistemas quando administrados *in vivo* apresentam a capacidade de controlar a taxa de libertação do fármaco, e/ou conduzi-lo até ao sítio específico em que deve atuar. Estes sistemas são designados de sistemas de libertação controlada (SLC) (COIMBRA,2010).

A importância dos SLC advém do fato que raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado (HERCULANO et al., 2009). Isso pode ser facilmente entendido quando se verifica que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, se interpõe uma série de obstáculos de naturezas diversas (anatômicos, químicos e biológicos). Somente uma parte em dez mil de um fármaco injetado intravenosamente alcança seu alvo final, quando esse está localizado em sítios altamente internalizados.

Dentre os vários paradigmas da liberação controlada destaca-se o desenvolvimento de sistemas liberação de drogas baseada em materiais poliméricos (HERCULANO et al., 2007), visto que existem limitações nos sistemas carreadores existentes. Um dos maiores problemas é o tempo de reabsorção do carreador. Desta forma, surge a necessidade da criação de um sistema de liberação controlada eficaz que permita à liberação de fármacos no sítio desejado por períodos prolongados de tempo e em uma dose apropriada, seguido de sua decomposição.

Materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica, têm sido utilizados como carreador para SLC. Desses, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais investigados (COIMBRA, 2010).

1.1.1 Sistema de liberação controlada baseada em polímeros

Diversos materiais poliméricos sintéticos são utilizados no desenvolvimento de SLC (Tabela 1). Um requisito fundamental para que os materiais poliméricos possam ser utilizados na preparação de um sistema de liberação controlada é não serem tóxicos e sofrerem absorção após sua utilização (COIMBRA, 2010). Somado a isto, esses são projetados para ter propriedades cada vez mais específicas e adequadas ao fármaco a ser empregado e ao sítio a ser atingido (KANG et al., 2006). Além dos polímeros sintéticos, os polímeros naturais (Tabela 2) também estão sendo utilizados como sistema de liberação controlada.

POLÍMEROS SINTÉTICOS
Polímeros não biodegradáveis
Acrilatos: poli(metacrilato de metila) (PMMA), poli(ácido acrílico) (PA), poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA)
Acrilamidas: poli(acrilamida), poli(N-isopropilacrilamida)
Polidimetilsiloxano (PDMS)
Polietilenoglicol (PEG)
Copolímeros de acetato de etilenovinila (EVA)
Polivinilpirrolidona (PVP)
Polímeros biodegradáveis
Poliésteres: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli-ε-caprolactona (PLC), poli(diáxanona) (PDS)
Poliortoésteres
Polifosfazenos
Polianidridos
Poliuretanas
Poli aminoácidos sintéticos
Tabela 1. Polímeros sintéticos utilizados na fabricação de sistemas de liberação controlada (COIMBRA, 2010)

POLÍMEROS NATURAIS E SEUS DERIVADOS
Polímeros de base proteica:
Gelatina, albumina, colágeno, fibrina, proteína de soja
Polissacarídeos:
Quitosana, dextrana, alginato, agarose, carragenina, sulfato de condroitina, ácido hialurônico, pectina, amido, derivados de celulose
Poli-hidroxicarboxilatos:
Poli(3-hidroxibutirato), poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), cis-poliisopreno

Tabela 2. Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de sistema de liberação (COIMBRA, 2009).

1.2 Látex natural

O látex de borracha natural (NRL) é extraído da *Hevea brasiliensis*, uma árvore nativa da bacia do rio Amazonas no Brasil. O látex tem em sua constituição de 40 a 45% em peso de moléculas poliméricas que formam a borracha (cis-poliisopreno) (Figura 1), 4 a 5% em peso de outros constituintes orgânicos, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e açúcares, e 50% de água (NEVES et al., 2005).

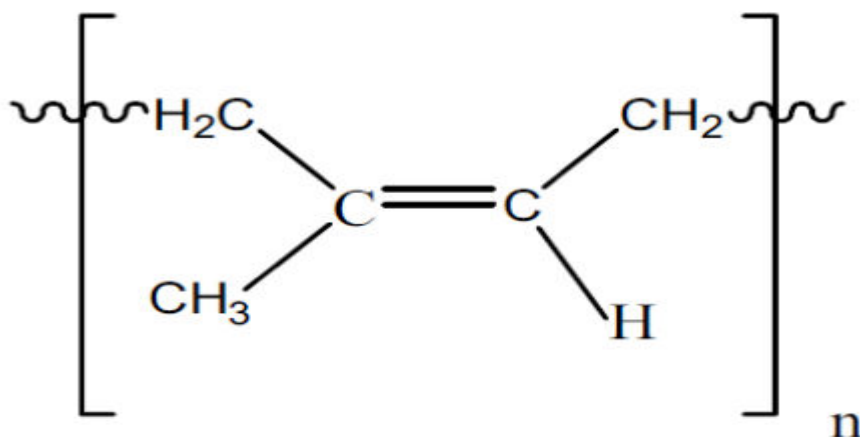


Figura 1. Monômero de cis-poliisopreno.

A borracha natural é um material muito utilizado pelas indústrias para a fabricação de pneus, luvas, balões, peças para equipamentos médicos e odontológicos. Esse material é bem aceito devido às suas características físicas: elasticidade, plasticidade, resistência e propriedade de isolamento elétrico. Recentemente, pesquisas vêm utilizando o látex extraído da *H. brasiliensis* também em aplicações biomédicas. Neste tipo de aplicação, o método de fabricação do látex utilizado é o NRLb (Natural Rubber Látex Biomedical), que evita a utilização de produtos químicos como os carbamatos e o enxofre (PINHO et al., 2004). O NRLb foi proposto porque o NRL (utilizado anteriormente) apresentava muita ocorrência de reações alérgicas e citotoxicidade.

Mrué et al. (1996) utilizaram a biomembrana de látex natural pela primeira vez como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães. Neste estudo, o látex funcionaria apenas como uma prótese. No entanto, os resultados mostraram que o látex teve propriedade indutora de regeneração

tecidual, sendo totalmente eliminado após dez dias de pós-operatório nas fezes dos animais. No lugar da prótese, formou-se um “neo-esôfago”.

Sader et al. (2000) estudaram o comportamento da biomembrana de látex natural como substituto parcial do pericárdio de cães. Foram avaliados três grupos: grupo A, onde um pequeno pedaço do pericárdio foi removido e reimplantado imediatamente; grupo B, em que um pequeno pedaço foi removido e substituído por um látex natural, com 0,3 mm de espessura; grupo C, no qual um pequeno pedaço de látex tinha 0,7 mm de espessura. Em 50% dos animais do grupo B e C houve completa regeneração do pericárdio. Nos cães do grupo A foi observado um quadro de regeneração irregular do pericárdio. Os resultados mostraram que a biomembrana de látex foi satisfatória para a substituição parcial do pericárdio de cães.

Segundo Rabelo et al. (2005), a técnica de implantação da membrana de látex, poliamida e polilisina a 0,1%, apresentou bons resultados na reparação de hérnias umbilicais em bovinos leiteiros. Apesar de ser um material não absorvível, não foi observada reação inflamatória tipo corpo estranho ou demais complicações com o uso da membrana, possivelmente porque o material possui baixa antigenicidade.

Balabarian et al. (2006) também avaliaram a biocompatibilidade do látex natural. Grânulos de látex foram implantados nas cavidades ósseas alveolares depois da extração dental em ratos. Os animais foram sacrificados em 7, 21 e 42 dias após os procedimentos. Os dados quantitativos confirmaram a aceleração da neoformação óssea e a diminuição da presença de tecido conjuntivo ao redor do implante. Foi demonstrado também que o material apresentou biocompatibilidade, promovendo progressiva integração com o osso alveolar e aceleração da neoformação óssea, sendo importante no processo de cicatrização.

Em estudo “*in vivo*” da biomembrana cório-alantóide de embriões de galinha, a biomembrana de látex natural foi usada por Alves (2003) para analisar o estímulo de atividade angiogênica causada por este material. Foi possível observar a indução de angiogênese no tecido onde a biomembrana de látex ficou em contato durante o experimento (Figura 2).

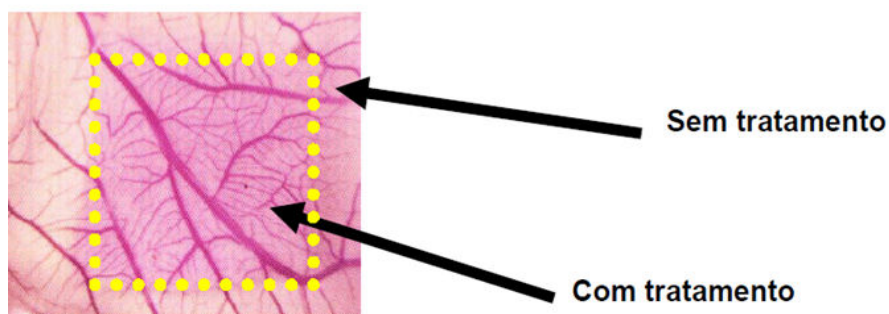


Figura 2. Uso do látex como estimulador de regeneração celular. Nota-se um evidente aumento da vascularização na região tratada com a biomembrana de látex (ALVES, 2003).

Pinho et al. (2004) pesquisaram o uso da biomembrana de látex natural com polilisina a 0,1% na reconstrução conjuntiva em coelhos neo-zelandeses adultos. Foram analisados um grupo controle (sem membrana) e um experimental (com membrana). Após análises histológicas, os cientistas observaram que a recuperação foi satisfatória em 60% dos olhos com biomembrana enquanto que, nos olhos do grupo sem membrana, ela foi satisfatória em apenas 20%. O número médio de vasos por campo óptico na ferida cirúrgica dos olhos com biomembrana foi o dobro desse mesmo número nos olhos com esclera nua (grupo controle). Esses dados sugeriram que a biomembrana de látex favorecem a cicatrização conjuntival e a neoangiogênese.

Outras pesquisas utilizaram o NRLb como uma biomembrana passiva, que atua na regeneração óssea (Figura 3). Neste tipo de experimento, a biomembrana de látex foi aplicada sobre a fratura óssea, impedindo a migração do tecido epitelial e conjuntivo, e facilitando a migração de células regenerativas (HERCULANO et al., 2009).

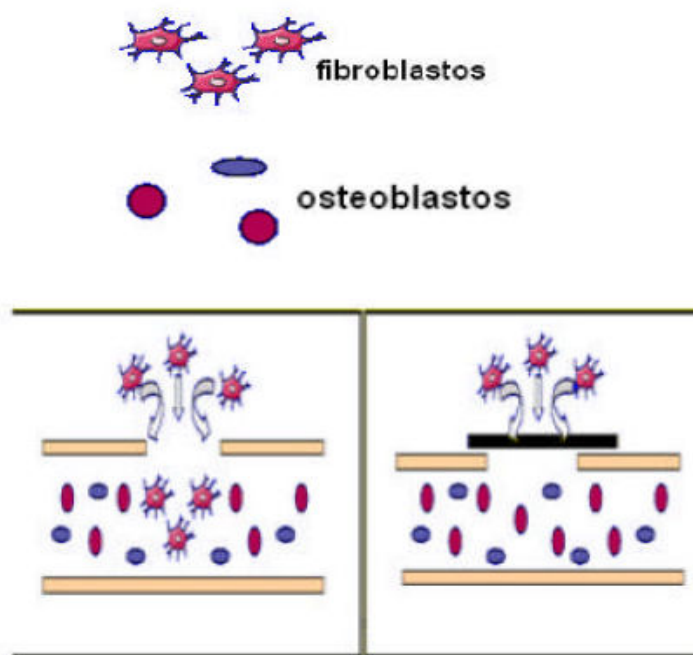


Figura 3. Biomembrana utilizada como barreira mecânica, impede a migração de células epiteliais e conjuntivas, facilitando a migração de células regenerativas (HERCULANO, 2009).

Estudos recentes (HERCULANO et al., 2009) têm demonstrado a utilização do látex natural extraído da seringueira *H. brasiliensis* como matriz para um sistema de liberação modificada e também mostrando resultados promissores em outras aplicações biomédicas como no tratamento de úlceras de pressão (FRADE et al., 2006), diabéticas (FRADE et al., 2004) e uso como membrana passiva para regeneração óssea guiada (ERENO et al., 2010)

Devido às características citadas anteriormente, o látex da seringueira apresenta-se como um excelente candidato a matriz sólida de sistemas de liberação modificada. Na literatura é possível encontrar liberação de alguns fármacos como o Metronidazol (HERCULANO et al., 2010), o Ciprofloxacino (MURBACH, 2012), o Diclofenaco de sódio (AIELO et al., 2014) e o Diclofenaco de potássio (AIELO et al., 2011); Proteínas - BSA (soroalbumina bovina) (HERCULANO et al., 2009); extratos naturais como o extrato de Casearina (BORGES et al., 2013); e nanopartículas magnéticas (GIULIANO et al., 2012).

1.3 Peptídeos de crescimento osteogênico – (OGP e OGP (10-14))

O peptídeo de crescimento osteogênico (OGP - osteogenic growth peptide) é um tetradecapeptídeo de ocorrência natural cuja estrutura primária é idêntica à sequência C-terminal da histona H-4 (A-L-K-R-Q-G-R-T-L-Y-G-F-G-G-OH) (CHEN *et al.*, 2000). O OGP endógeno é um produto de clivagem proteolítica do PreOGP, que é traduzido do mRNA da H4.

O OGP regula a proliferação e a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização da matriz, por meio do mecanismo de “feedback” positivo (SASKA, 2011). O OGP também regula a hematopoese, incluindo a estimulação de enxerto de medula óssea e transplante (CHEN *et al.*, 2000). Segundo BAB *et al.* (1992), o OGP está presente no soro humano, no de rato e de muitas espécies de mamíferos.

A concentração de OGP sérico é aumentada durante uma injúria local ao tecido ósseo, medula óssea ou a reações osteogênicas sistêmicas. Segundo os estudos de Chen *et al.* (2000), o peptídeo menor OGP(10-14) (figura 4) - [Y-G-F-G-G-OH], mantém a atividade biológica em relação ao OGP, fato este atribuído à presença dos resíduos de Y, F e G na região C-terminal, que são importantes para a sua bioatividade. Esta equivalência foi comprovada em estudos “*in vivo*”, onde o peptídeo homólogo sintético OGP(10-14) aumentou a formação óssea, a densidade do osso trabecular e promoveu a cura da fratura.

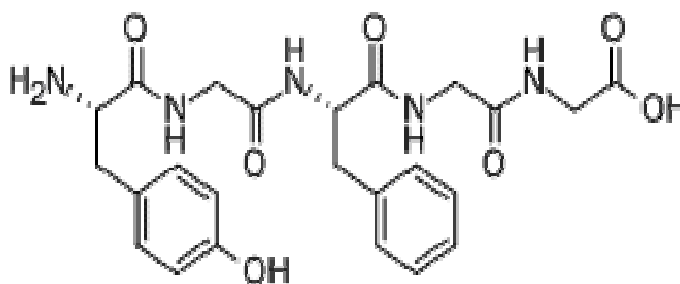


Figura 4. Estrutura primária do peptídeo OGP (10-14).

Desta forma, o OGP e seu derivado OGP(10-14) estimulam a osteogênese e a hematopoese, agindo na proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, apresentando grande potencial para serem utilizados na medicina regenerativa.

1.4 Hylina a1

A fauna e flora brasileira contêm grande diversidade de biomoléculas. Isso gerou um grande interesse dos pesquisadores no descobrimento de novas moléculas bioativas, incluindo os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Uma grande fonte desta moléculas é a secreção cutânea de anfíbios, que é rica em compostos biologicamente ativos, incluindo alcalóides, esteróides, peptídeos e proteínas (CLARKE, 1997).

A Hylina a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂) é um peptídeo isolado da rã *Hypsiboas albopunctatus* (Figura 5), comumente encontrada na região do cerrado, e que apresenta atividade antimicrobiana e hemolítica. A Hylina a1 aumenta a permeabilidade na membrana celular do microrganismo, causando a lise e morte celular (CRUSCA *et al.*, 2010). Segundo Castro *et al.* (2009) e Crusca *et al.* (2010), a Hylina a1 mostrou atividade contra diversos tipos de bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos; e também em eritrócitos.

A liberação deste peptídeo em biomembrana de látex pode propiciar o desenvolvimento de curativos com atividade antimicrobiana.



Figura 5. Rã *Hypsiboas albopunctatus*

2. OBJETIVOS

De acordo com o apresentado acima a utilização da biomembrana de látex poderia ser um carreador adequado para a liberação de peptídeos bioativos.

O objetivo geral inicial deste trabalho foi avaliar a incorporação e a liberação dos peptídeos OGP(10-14) e Hyline a1[W6] em biomembranas de látex natural em diferentes condições experimentais.

Para isto os seguintes objetivos específicos iniciais foram realizados:

- Síntese dos peptídeos OGP(10-14) e Hyline a1[W6] por meio da Síntese de peptídeos em fase sólida.
- Confeção das biomembranas de látex contendo os peptídeos acima descritos.
- Estudos da liberação dos peptídeos da biomembrana de látex em função do tempo.
- Caracterização estrutural das biomembranas obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura, análise de resistência mecânica e permeabilidade ao vapor de água.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese de peptídeos em fase sólida

Os peptídeos desenvolvidos neste projeto foram obtidos manualmente pelo método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) (MERRIFIELD, 1963). As sínteses foram realizadas na “Unidade de Síntese e Purificação de Peptídeos”, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Instituto de Química – UNESP. O protocolo de síntese utilizado consiste de passos cíclicos de acoplamento e desproteção do amino-grupo alfa terminal (figura 6). Na etapa de acoplamento foi utilizado como reagente de ativação o DIC (diisopropilcarbodiimida) com HOBt (N-hidroxibenzotriazolil), e os Fmoc-aminoácidos (Fmoc-AA), com 3 vezes de excesso em relação a quantidade inicial de grupos funcionalizados na resina. O solvente utilizado foi o DMF (Dimetilformamida) ou a mistura 50% DCM (Diclorometano) /DMF. A desproteção do grupo Fmoc base-lábil foi efetivada pelo tratamento da resina com piperidina/DMF (2:8) em duas etapas de 1 e 20 min, respectivamente. A cada passo foram efetuadas lavagens alternadas com os solventes orgânicos DMF e DCM, respectivamente (Figura 6).

Após cada etapa de acoplamento e desproteção foi efetuado um teste de ninidrina (KAISER et al.,1970). Este composto, em altas temperaturas, reage com grupos aminos livres, liberando um composto de cor azul, permitindo avaliar se o acoplamento foi efetuado com 100% de eficiência (ausência de coloração azul).

Ao fim da síntese, para separar o peptídeo do suporte sólido e dos grupos protetores de cadeias laterais utilizados, foi realizada uma reação de clivagem utilizando uma solução contendo água deionizada, triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics®) e ácido trifluoracético - TFA (Merck®) (proporção de 2,5; 2,5; 95 respectivamente; v,v,v), em frasco de cintilação, sob agitação branda por 2 h. O volume utilizado foi na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de resina. Após esta etapa, foi realizada a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico gelado. Ao final, os peptídeos foram dissolvidos com uma solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura, e a solução centrifugada para a separação da resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

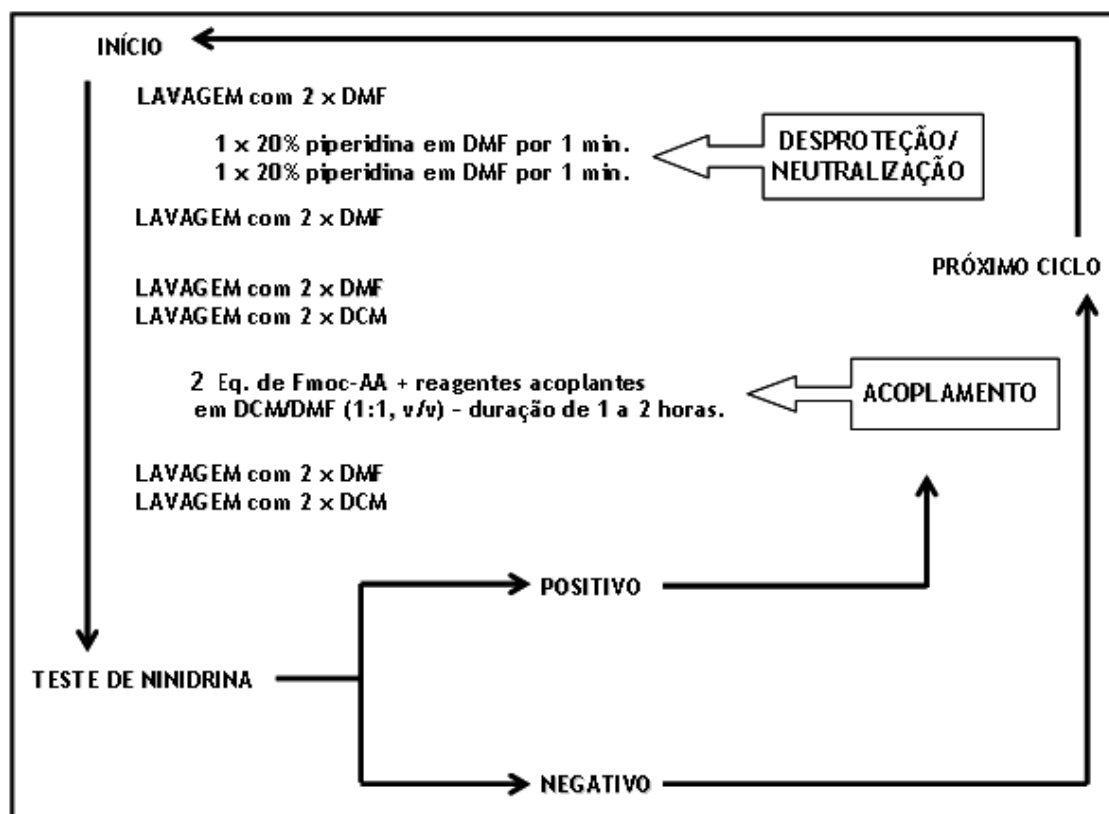


Figura 6. Protocolo utilizado na síntese de peptídeos em fase sólida.

3.2 Purificação dos peptídeos

A purificação dos produtos obtidos nas sínteses foi realizada em modo semipreparativo utilizando um cromatógrafo Beckman, equipado com coluna C₁₈ KROMASIL de tamanho 25,0 x 1,0 cm e um coletor automático da marca Pharmacia. Durante a purificação foram recolhidas frações de 3 mL e a pureza de cada tubo foi determinada por CLAE analítico em um cromatógrafo Shimadzu, com coluna C₁₈ KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm. Os tubos contendo os materiais puros foram juntados e liofilizados obtendo-se as frações principais, que foram analisadas na mesma coluna acima descrita. As condições cromatográficas utilizadas na purificação da Hylina-a1[W6] estão colocadas na Tabela 3.

Modo	Semi-preparativo	Analítico
Solventes	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN
Gradiente	40-70% de solvente B em 90 min.	5-95% de solvente B em 30 min.
Fluxo	5 mL/min.	1 mL/min.
Comprimento de onda	220 nm	220 nm

Tabela 3. Condições cromatográficas empregadas na purificação da Hylina a1 [W6].

A confirmação do sucesso da síntese e purificação foi realizada por meio da técnica de espectrometria de massas.

Os demais peptídeos foram utilizados sem a etapa de purificação, visto o alto grau de pureza do material sintetizado.

3.3 Espectrometria de massas

Na caracterização dos peptídeos foi utilizado um espectrômetro de massa da marca Brucker operando no modo ESI (“eletrospray ionization”) positivo, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química. Esta técnica baseia-se em

um analisador de massa que apresenta como resultado final a razão massa molar carga (MM/z).

3.4 Confeção das biomembranas

O látex natural utilizado neste projeto de pesquisa foi extraído na Fazenda Experimental da ESALQ-USP, Piracicaba/SP. Depois da extração, amônia foi utilizada para manter o látex líquido, e este material foi centrifugado a 8000 g. A centrifugação foi importante, pois separou algumas proteínas contidas no látex natural que causam reações alérgicas (HERCULANO, 2009).

A biomembrana foi confeccionada por “casting”, que consistiu na diluição de 0,5 mL de látex em 0,5 mL de água deionizada ou solução contendo os peptídeos passando por uma rápida agitação. Após homogeneização, a solução foi depositada em uma placa circular de 22,30 mm de diâmetro.

Diferentes métodos de secagem foram avaliados, desde a polimerização a temperatura de 37°C em estufa, como uma nova metodologia desenvolvida por nós. Neste novo procedimento o látex foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado por 8 h.

3.5 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura

O Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV (Scanning Electron Microscope, SEM) é um equipamento que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostra diversas. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra, onde parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE - imagem de elétrons retroespalhados - ou ainda ocorre, quando da interação com a amostra, a emissão de elétrons, produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários). Foram confeccionados diferentes tipos de biomembranas, onde um pequeno fragmento de 1 cm por 1 cm foi extraído e recoberto com ouro e analisado por microscopia de varredura (MEV) utilizando um equipamento modelo ZEISS EVO 50, em alto vácuo, no aumento de 300, 1000 e 5000 vezes.

3.6 As propriedades mecânicas

Um analisador de textura (modelo-TA.XT) foi usado para medir as propriedades mecânicas das biomembranas. Secções transversais das biomembranas foram anexados no furo do suporte metálicos (D = 10 mm). A sonda de perfuração (probe) foi fixado sobre a célula de carga (5 kg), e orientados para baixo, com uma velocidade de cruzeta de 1 mm/s para o centro do furo do suporte do filme. As curvas de carga versus deslocamento foram registradas até a ruptura do biofilme. Os resultados foram utilizados para determinar as seguintes propriedades mecânicas: Resistência à punção (*Puncture strength*) e alongamento de ruptura (*Elongation at break*). As equações 1 e 2 foram as equações utilizadas para a obtenção destes parâmetros.

$$\text{Resistência à punção} = \frac{F}{A}$$

Equação 1. Equação para mensurar a resistência do material, onde F (N) é a carga necessária para perfurar o filme e A (mm²) é a secção transversal da película localizada no caminho.

$$\text{Alongamento de ruptura} = \frac{d}{\text{comprimento original}} \cdot 100 \%$$

Equação 2. Equação que mensura a elasticidade do material, onde d (mm) é o deslocamento máximo até a ruptura e o “comprimento original” é a distância que a “probe” percorre até chegar na amostra (100 mm) (CAO et al., 2007).

Os ensaios de resistência mecânica foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marlus Chorilli e Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, do Laboratório de Farmacotécnica localizado Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP)- Campus Araraquara.

3.7 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi avaliada por gravimetria, de acordo com o procedimento proposto por Akhgari et al. (2006), com pequenas modificações. Os recipientes utilizados no teste foram preenchidos com 15 mL de água ultra pura (100% de UR). Secções circulares de látex, com as espessuras pré-determinadas, foram utilizados para vedar a parte superior do recipiente (1,15 cm de diâmetro). Cada conjunto foi pesado com precisão e colocado num dessecador de gel de sílica (0% UR). Em tempos pré-determinados, cada conjunto foi novamente pesado para avaliar a perda de massa em função do tempo.

A TVA (Transmissão de Vapor de Água) foi calculada pela equação 3:

$$TVA = \frac{TTVA \cdot x}{AP_0 (UR_1 - UR_2)}$$

Equação 3. Equação para mesurar a transmissão de vapor de água, onde o *TTVA* (taxa de transmissão de vapor de água) é obtida a partir do declive do perfil de perda de massa em função do tempo; *x* é a espessura da película (mm), “*A*” é a área da película exposta a permeabilidade (m²), *P*₀ é a pressão de vapor água pura (3,159 kPa a 25 °C), (*UR*₁ - *UR*₂) é o gradiente de umidade relativa.

Os testes foram realizados em triplicata, e um copo vazio foi utilizado como controle.

Os ensaios de permeabilidade ao vapor de água foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marlus Chorilli e Profa Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, do Laboratório de Farmacotécnica localizado Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP)- Campus Araraquara.

3.8 Ensaio de liberação dos peptídeos

No ensaio de liberação, cada amostra foi imersa em 10 mL de água deionizada, sob agitação de 100 RPM, a fim de evitar limitações da taxa de liberação por difusão externa. A análise da liberação *in vitro* dos peptídeos foi realizada por espectrofotometria por meio de uma cubeta de 600 μ L (Hellma QS 10x4 mm). As leituras foram realizadas com comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) em 280 nm para os peptídeos contendo o resíduo de triptofano (W), e de 273 nm para o OGP(10-14), que contem resíduo de tirosina. A primeira medida foi obtida em $T = 0$ min, posteriormente seguido de medidas de 30 em 30 min até 300 min, período em que começa a estabilização da curva. Adicionalmente, outra medida foi realizada em 24 h.

As liberações também foram acompanhadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e pelo espectrômetro de massas, para certificar de que o material liberado era o peptídeo desejado. As áreas do pico com tempo de retenção característico do material foram medidas e convertidas em concentração, a partir da área do pico do material puro com concentração conhecida.

3.9 Experimento de degradação do peptídeo pelas substâncias liberadas pelo látex com a presença da biomembrana no meio

Visando entender o motivo da não liberação do peptídeo Hyline a1[W6] do látex, resolvemos avaliar a presença de proteases no látex, o que poderia explicar a não liberação do peptídeo. Desta forma, esse experimento foi realizado para analisarmos se as substâncias liberadas pelo látex poderiam ser responsáveis por degradar os peptídeos adsorvidos nesta biomembrana.

Neste sentido, à uma solução contendo 1 mg do peptídeo Hyline a1[W6] e 5 mL de água deionizada foi adicionada uma biomembrana de látex. Foram coletadas amostras no instante inicial e após 5 dias de incubação e avaliadas por CLAE em coluna C₁₈ KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm.

3.10 Tratamentos térmicos do látex

Foram realizados 4 tipos de tratamento térmico no látex ainda líquido, a fim de desnaturar possíveis enzimas que poderiam estar degradando os peptídeos incorporados a biomembrana. Os tratamentos foram:

- Látex autoclavado a 120°C por 20 min
- Látex autoclavado a 120°C por 1 h
- Látex aquecido na estufa a 80°C por 30 min
- Látex aquecido na estufa a 80°C por 5 dias

Após o tratamento a biomembrana foi confeccionada por “casting” como descrito anteriormente.

3.11 Experimento de degradação do peptídeo pelas substâncias liberadas pelas biomembranas de látex

As biomembranas de látex foram incubadas por 24 h em 5 mL de água deionizada. Após este período as biomembranas foram retiradas da água, que agora continha as substâncias liberadas pelo látex. Nessa solução de liberação do látex foi adicionado 1 mg de Hyline a1[W6] e foram feitas as análises por CLAE em 0, 4, 8, 24 e 48 h.

Nos estudos envolvendo as biomembranas com tratamentos térmicos, 1 mL da solução de liberação do látex puro foi adicionado em 5 mL de uma solução de Hyline a1[W6] com concentração 0,2 mg/mL. Alíquotas nos tempos de 0, 1 e 24 h foram coletadas e avaliadas por CLAE (Modelo da coluna C₁₈ KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm).

O método utilizado foi o isocrático com 45 % de solvente B. O método isocrático permite maior rapidez na análise e economia de solvente (Modelo da coluna: Coluna Kromasil 300 - partículas de 5 µm - Tamanho 0,46 x 150 mm).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

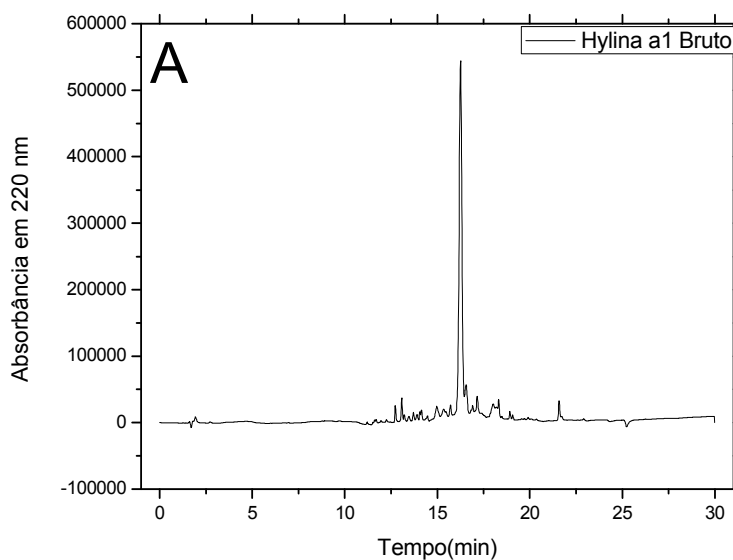
4.1 Síntese de peptídeo em fase sólida Hylina a1[W6]

4.1.1 Hylina a1[W6]

Neste trabalho foi realizada a síntese de um peptídeo análogo ao peptídeo Hylina a1 (IFGAIWPLALGALKNLIK- NH₂). O peptídeo Hylina a1[W6], possui um resíduo de triptofano na posição 6 no lugar de um resíduo de Leucina. Isto permite a utilização de técnicas espectrofotométricas no estudo desta molécula (CRUSCA *et al.*,2010). O análogo apresenta atividade antimicrobiana semelhante ao peptídeo nativo.

Na síntese do peptídeo a resina utilizada foi a Rink amida com grau de substituição de 0,6 mmol/g.

Os perfis cromatográficos dos materiais bruto e puro estão apresentados nas Figuras 7A e 7B.



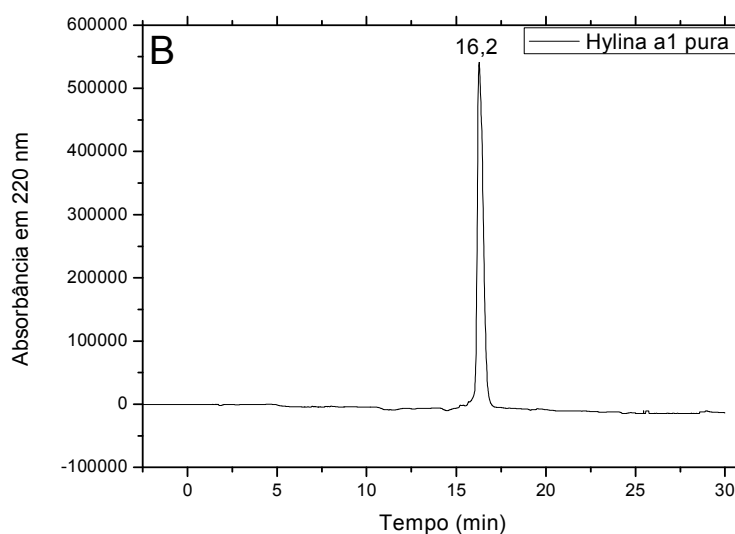


Figura 7. Cromatograma obtido em escala analítica do peptídeo Hylina-a1[W6] na forma bruta (7A) e purificada (7B) - tempo de retenção de 16,2 min.

A análise do espectro de massas obtido para este material confirmou a obtenção do produto esperado. O valor da massa molecular obtida para o peptídeo Hylina-a1[W6] correspondeu ao valor teórico esperado de 1937,4 g/mol ($MM/z = 969,6$ para $Z = 2$ e $646,7$ para $Z=3$), como mostra a figura 8.

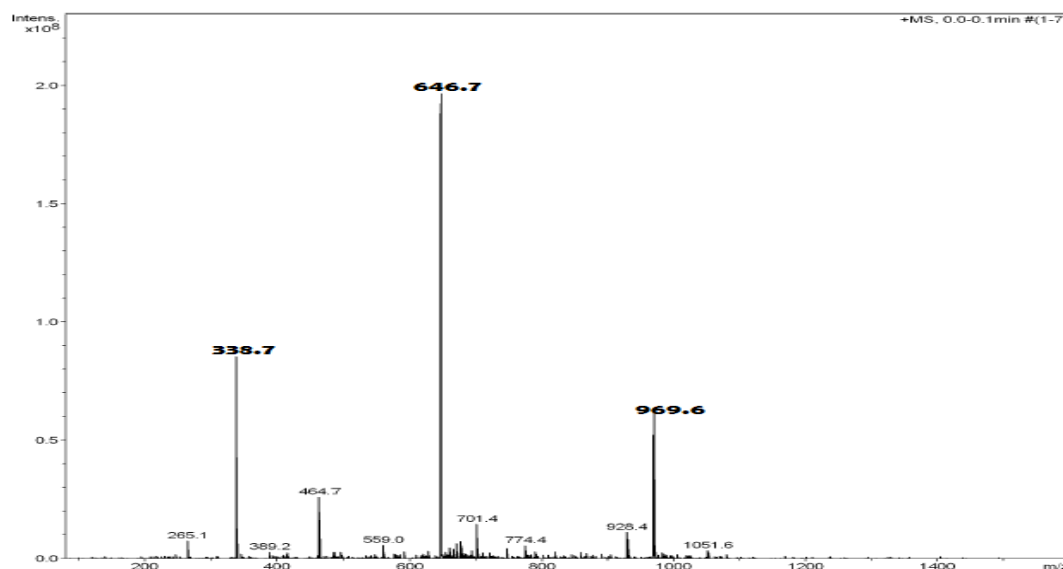


Figura 8. Espectro de massas da fração purificada do peptídeo Hylinaa1.

4.1.2 OGP (10-14)

A resina utilizada na síntese do peptídeo OGP(10-14) (**HYGFGG-OH**) foi a Wang-Gly. Os demais procedimentos de síntese e clivagem foram os mesmos utilizados anteriormente para o peptídeo Hylina a1 [W6].

O peptídeo OGP (10-14) não foi purificado, pois apresentou mais de 95 % de pureza de acordo com a CLAE (Figura 9). A obtenção do material desejado foi confirmada pela espectrometria de massas (Figura 10). O valor da massa molar obtido para o peptídeo OGP(10-14) foi correspondente ao teórico de 500 g/mol.

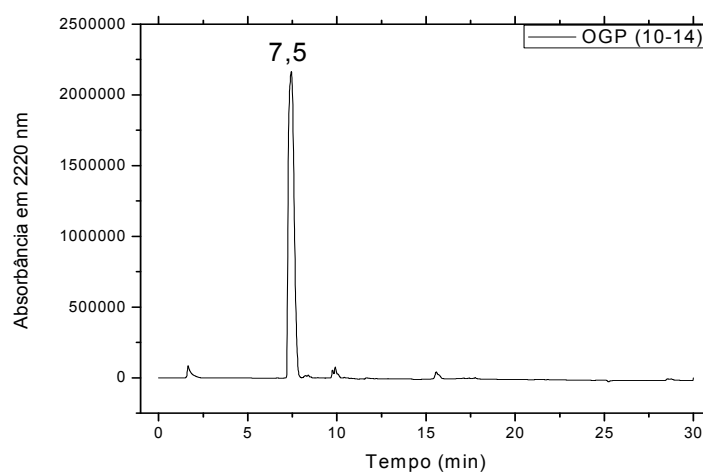


Figura 9. Cromatograma obtido em escala analítica para o peptídeo OGP(10-14) com tempo de retenção de 7,5 min.

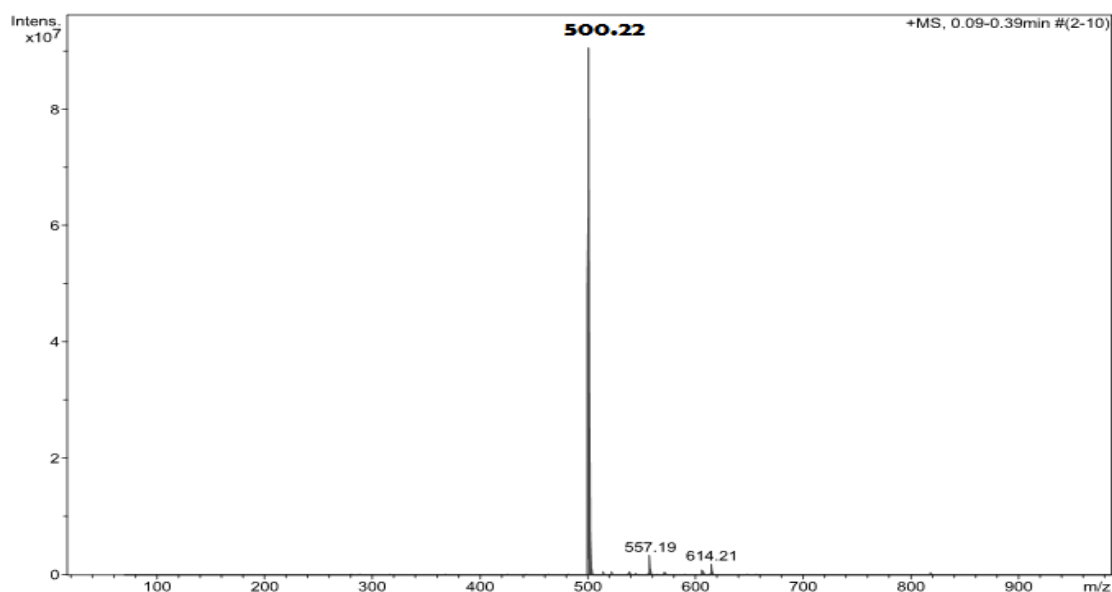


Figura 10. Espectro de massas do peptídeo OGP(10-14).

4.1.3 Acetil- WAA e Acetil- WAAAA

Adicionalmente, foi realizada a síntese de dois peptídeos com 3 e 5 resíduos para avaliar se alguma interação específica poderia estar afetando a liberação dos peptídeos anteriores com a biomembrana.

Esses peptídeos foram desenhados e sintetizados com a extremidade N-terminal acetilada (sem carga na extremidade N-terminal), com alaninas, que é o aminoácido mais simples que possui isomeria ótica, e um resíduo de triptofano, para avaliação por espectroscopia.

Os perfis de CLAE obtidos para estes peptídeos estão apresentados nas figuras Figura 11 e 13. Os espectros de massas confirmaram a obtenção do material desejado (Figuras 12 e 14). O valor do peso molecular obtido para o peptídeo de Ac-WAA foi correspondente ao valor teórico esperado de 388 g/mol (Figura 12). O mesmo ocorreu para o peptídeo Ac-WAAAA, que mostrou espectro contendo material com a massa molar esperada de 530 g/mol (Figura 14). Devido à falta de cargas no peptídeo, houve dificuldade de obtenção dos espectros de massas, que apresentaram baixa sensibilidade. Este fato explica a presença de outros picos no espectro obtido.

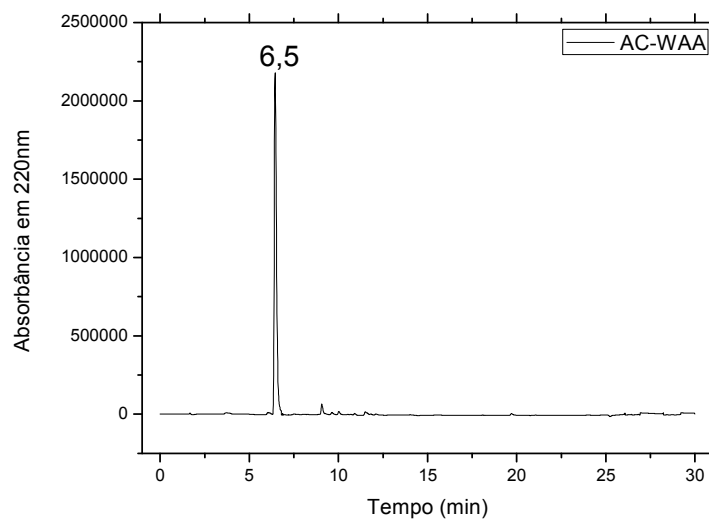
Acetil- WAA- NH₂

Figura 11. Cromatograma obtido para o peptídeo Ac-WAA com tempo de retenção de 6,5 min.

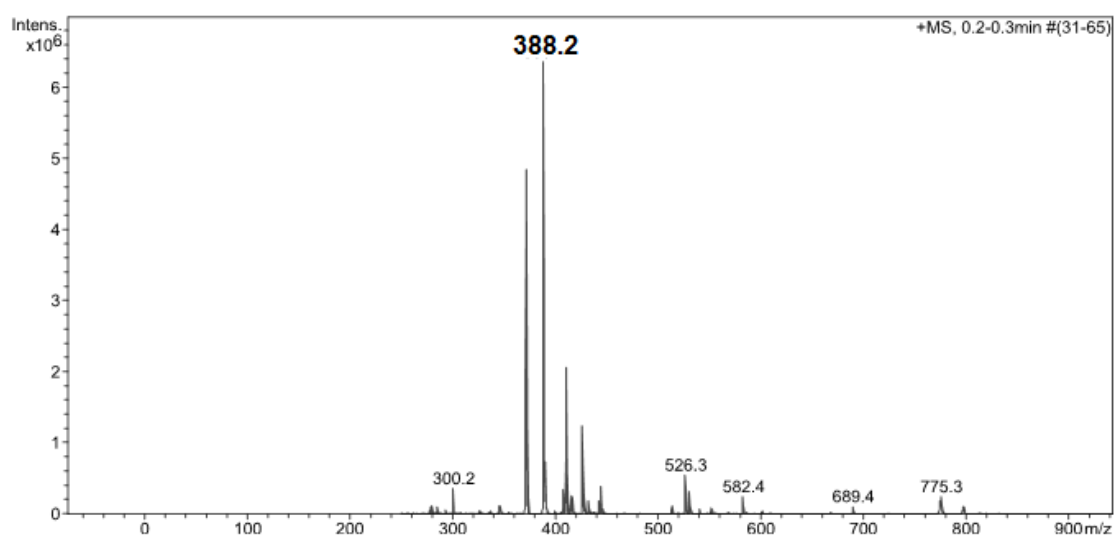


Figura 12. Espectro de massas do peptídeo Acetil-WAA.

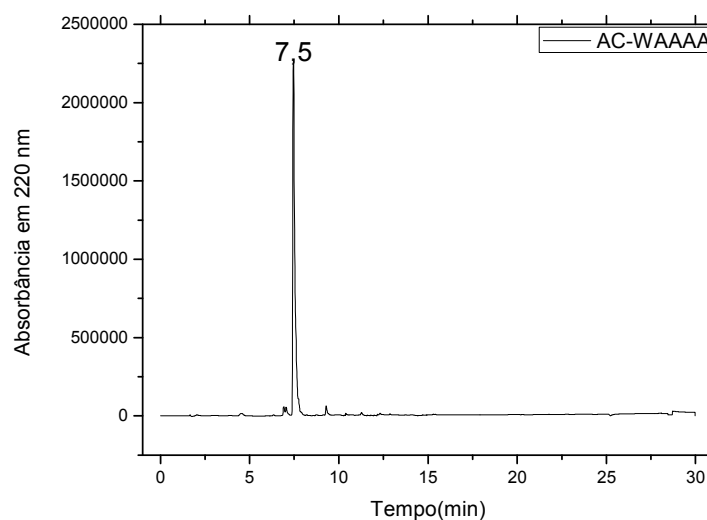
Acetil- WAAAA- NH₂

Figura13. Cromatograma obtido em escala analítica do peptídeo Ac- WAAAA com o tempo de retenção de 7,5 min.

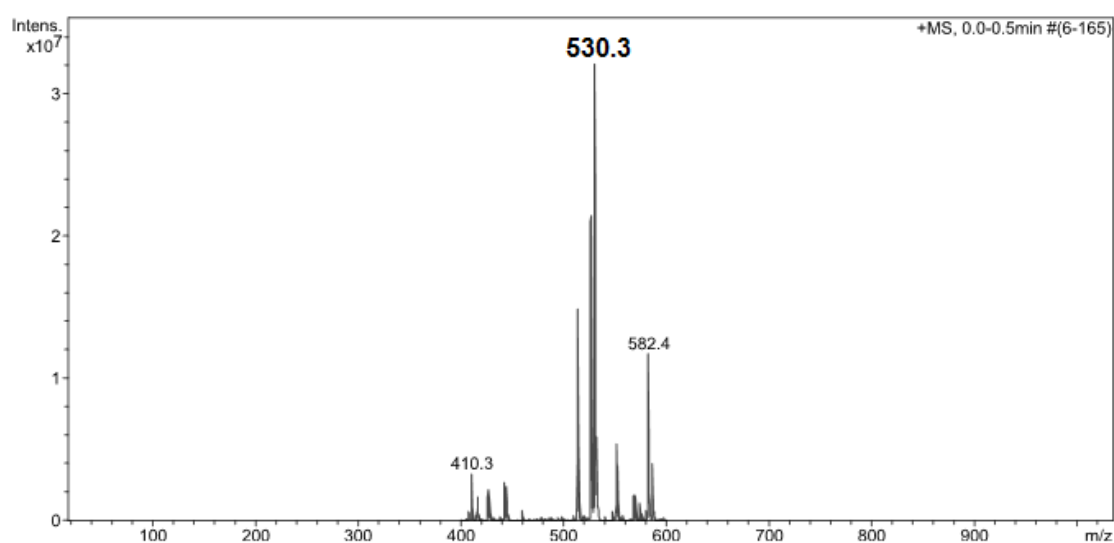


Figura 14. Espectro de massas do peptídeo Acetil-WAAAA.

Os dados obtidos acima mostraram que a SPFS foi adequada para a obtenção dos peptídeos desejados, permitindo a utilização destes materiais nos estudos de liberação controlada.

4.2 Obtenção e caracterização das biomembranas de látex natural

As biomembranas de látex confeccionadas via liofilizador mostraram uma polimerização mais rápida que a polimerização via estufa.

4.2.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura

Após a síntese dos peptídeos, avaliamos a metodologia de obtenção das biomembranas de látex. A separação de fase induzida termicamente (TIPS) é o método utilizado para a confecção da biomembrana microporosa (Lloyd et al,1990). Neste sentido a biomembrana foi obtida por meio de diferentes condições de polimerização.

Inicialmente, a polimerização da biomembrana foi realizada pelo método convencional. Neste método, o látex foi obtido a 37°C em uma estufa. Somado a isto, o peptídeo foi incorporado à biomembrana por meio da adição de 0,5 mL de solução peptídica aquosa em 0,5 mL de látex líquido. A polimerização foi obtida da mesma forma do que para o látex puro.

Dados da literatura mostraram que a obtenção do látex a temperaturas menores aumenta o tamanho do poro da biomembrana (HERCULANO et al., 2010). Como os peptídeos são maiores que as outras moléculas anteriormente estudadas e citadas na introdução, resolvemos tentar a obtenção das biomembranas por uma metodologia que permitisse a utilização da menor temperatura possível no laboratório, produzindo maior quantidade de poros. Desta forma, a biomembrana foi obtida por meio da polimerização em um liofilizador da solução contendo 0,5 mL de látex e 0,5 mL de solução peptídica após o congelamento em nitrogênio líquido.

As condições de polimerização empregadas nas obtenções dos látex foram:

- Estufa 37°C com adição de água (Figura 15)
- Estufa 37° C (Figura 16)
- Liofilizador com a adição de água (Figura 17)
- Liofilizador (Figura 18)

Após a obtenção destes filmes poliméricos, avaliamos as propriedades físico-químicas destes biomateriais. A primeira técnica empregada foi a Microscopia Eletrônica de Varredura. O principal objetivo

de utilizar essa técnica foi para analisar a porosidade das diferentes biomembranas obtidas.

Comparando-se as microscopias das biomembranas polimerizadas na estufa com ou sem a adição de água (Figuras 15 e 16), não observamos a presença de poros, mas sim a presença de ranhuras na estrutura. A principal diferença entre essas biomembranas foi o aumento do número das fissuras, maiores com a adição de água, que provavelmente são provenientes da evaporação da água. Observa-se também que, para o látex puro as ranhuras foram maiores, provavelmente atribuídas ao ressecamento durante a etapa de polimerização.

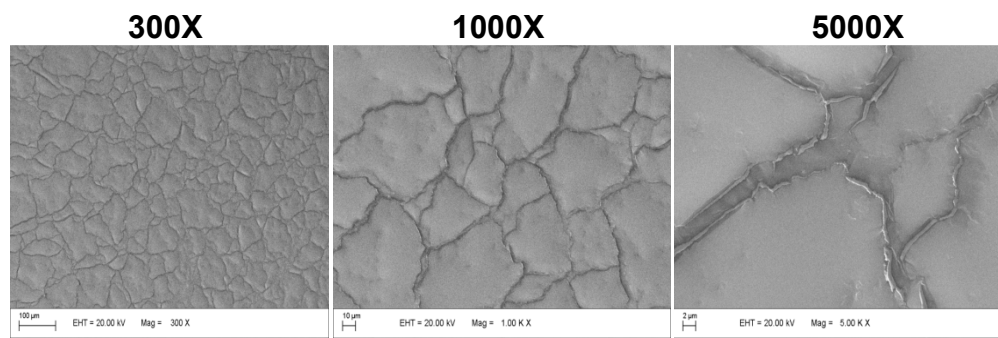


Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura, látex puro com adição de água e polimerizado em estufa a 37 °C.

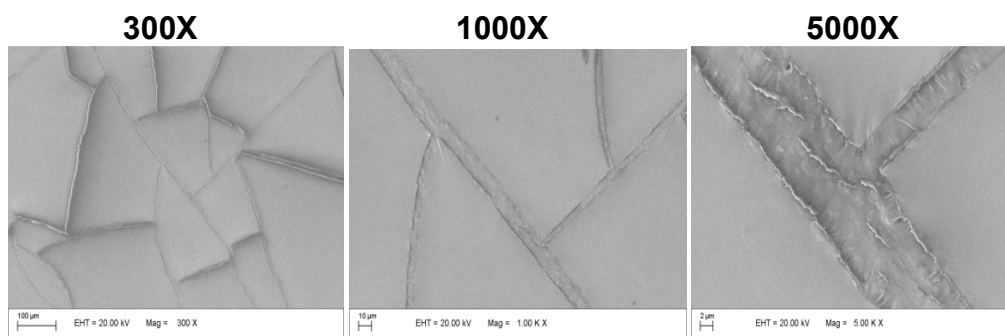


Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura látex puro polimerizado em estufa a 37 °C.

Destacamos que, não conseguimos observar nas biomembranas polimerizadas na estufa a 37° a presença de poros, pelo menos em um aumento de até 5000X, no entanto, apresentou fissuras que estão por toda sua extensão.

A confecção das biomembranas por meio do liofilizador mudou drasticamente as propriedades da biomembrana. A análise da microscopia

eletrônica mostrou a presença de poros por toda superfície da biomembrana. Comparando as microscopias das biomembranas polimerizadas no liofilizador com ou sem a adição de água (Figuras 17 e 18), pode-se observar que a adição de água ocasiona o aumento da porosidade e no tamanho dos poros na superfície da biomembrana. Provavelmente esse aumento na porosidade das biomembranas é devido à sublimação das moléculas de água durante o processo de liofilização.

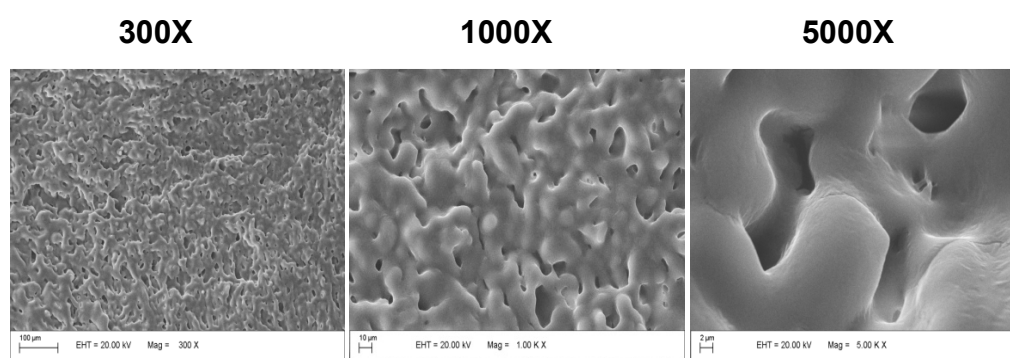


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura Látex puro com adição de água e polimerizado em liofilizador.

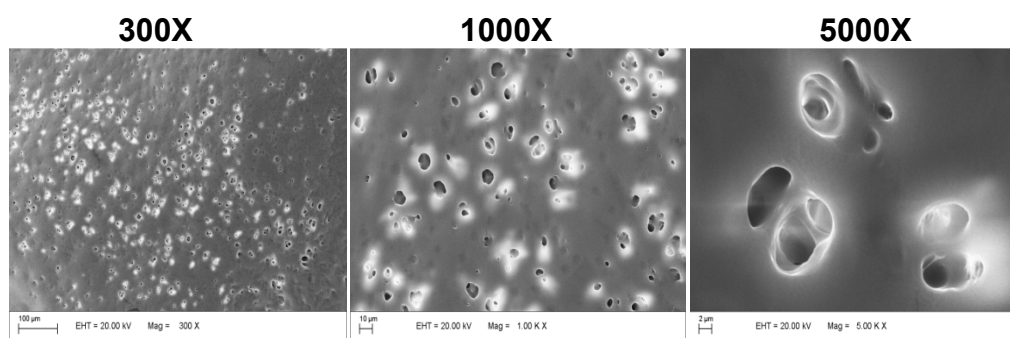


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura Látex puro polimerizado em liofilizador.

4.2.2 Propriedades mecânicas

Após a visualização da superfície da biomembrana e a possibilidade de estarmos trabalhando com um material mais poroso, foi avaliado as diferenças das propriedades mecânicas das biomembranas. Aquelas polimerizadas na estufa apresentaram maior resistência que as obtidas por meio da liofilização. No entanto, a elasticidade obtida foi similar entre elas. Provavelmente, isto se deve a grande porosidade que a biomembrana liofilizada apresenta (Tabela 4).

PROPRIEDADES MECÂNICAS		
	Látex polimerizado estufa 37°C	Látex polimerizado liofilizador
Resistência à punção (Mpa)	0,132 ± 0,0183	0,102 ± 0,0112
Alongamento de ruptura (%)	36,4 ± 3,0	33,5 ± 2,5

Tabela 4. Dados propriedades mecânicas do látex polimerizado na estufa a 37°C e látex polimerizado no liofilizador.

4.2.3 Permeabilidade ao vapor de água

A maior porosidade das biomembranas de látex, obtidas por meio da liofilização, poderiam afetar a permeabilidade da biomembrana como um todo. Para verificar esta possibilidade foram realizados estudos de permeabilidade ao vapor de água. Na figura 19 e na tabela 5 fica bem evidente que ocorre uma maior permeabilidade ao vapor de água da biomembrana confeccionada via liofilizador. Isso está coerente com a grande porosidade da biomembrana liofilizada, já comprovada na microscopia eletrônica de varredura. Essa maior permeabilidade aos gases pode ser interessante na aplicação das biomembranas como curativo, aproveitando que o látex natural também estimula angiogênese, adesão celular e formação de matriz extracelular. No entanto, estudos adicionais da difusão de outros compostos ainda precisam ser realizados.

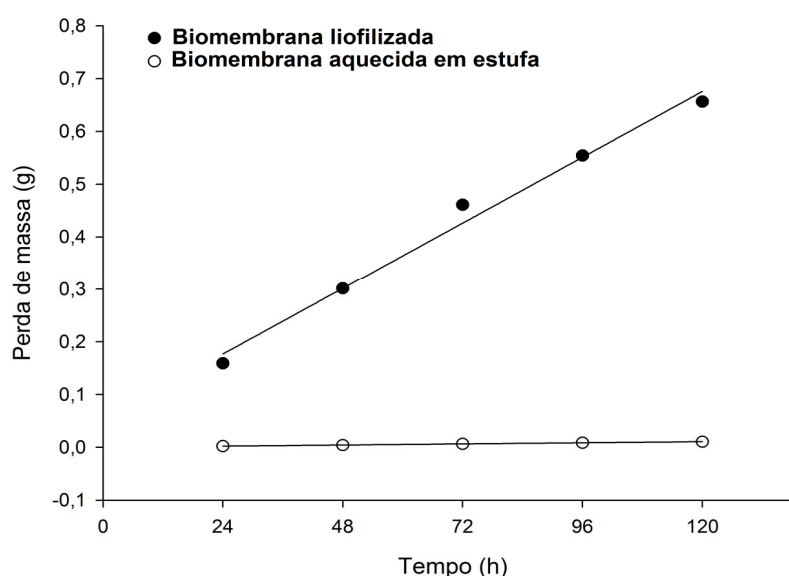


Figura 19. Permeabilidade ao vapor de água das biomembranas polimerizadas no liofilizador (círculo cheio) e estufa 37°C (círculo vazio).

TRANSMISSÃO DE VAPOR DE ÁGUA DAS BIOMEMBRANAS OBTIDAS

Biomembranas	TTVA (g/min)	TVA(g.mm/min.m ² .KPa)
Liofilizador	0,04200	0,00440
Estufa 37 °C	0,00003	0,00004

Tabela 5. Ensaio de permeabilidade ao vapor de água do látex polimerizado na estufa a 37°C e látex polimerizado no liofilizador. TTVA - Taxa de transmissão ao vapor de água e TVA - permeabilidade ao vapor de água.

4.3 Estudo da liberação dos peptídeos

Obtidas as membranas contendo o látex com e sem peptídeos, os estudos de liberação dos peptídeos *in vitro* foram realizados. A membrana utilizada inicialmente foi a obtida pelo método convencional, isto é, polimerizada na estufa.

A liberação de Hylina a1[W6] foi realizada com um sistema de liberação de fluxo acoplado a um espectrofluorímetro (Figura 20). No entanto, o uso desta metodologia não foi mantido por não apresentar resultados adequados. Não foi possível verificar a liberação do peptídeo. Além disso, a liberação de compostos existentes no próprio látex que também fluoresciam nas mesmas condições utilizadas no estudo dificultaram a utilização desta técnica. Apesar de esta metodologia ter sido descartada, verificamos posteriormente por meio de outras metodologias que a falta de resultados era devido à falta de liberação da Hylina a1[W6] e não devido ao método utilizado.

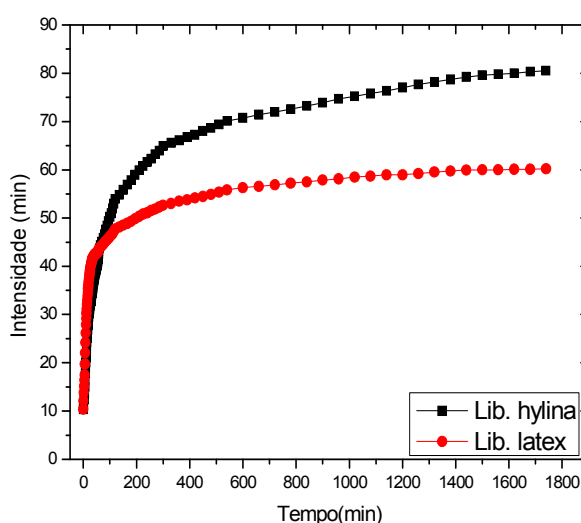


Figura 20. Liberação de substâncias pelo látex puro obtido pela fluorimetria (em vermelho) e do látex contendo o peptídeo Hylina a1[W6] (em preto).

Para tentar minimizar a influência do material liberado pelo látex e visando reproduzir a metodologia utilizada na literatura, as análises seguintes da liberação *in vitro* dos peptídeos foram realizadas em um espectrofotômetro trabalhando na região do ultravioleta.

4.3.1 Liberação Hylina a1[W6]

A confecção do látex contendo o peptídeo envolveu a fixação de 5 mg de Hylina a1[W6] na biomembrana de látex. Observamos na Figura 21 os estudos de liberação do látex contendo a Hylina a1[W6] e na ausência deste, nas mesmas condições experimentais. A maior absorção no comprimento de onda de 280 nm do látex contendo o peptídeo em relação a biomembrana pura parecia indicar a liberação do peptídeo.

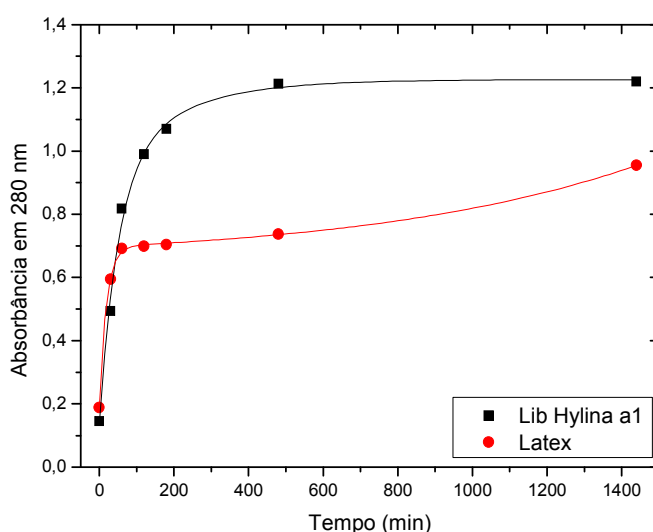


Figura 21. Liberação do látex puro e do látex contendo o peptídeo Hylina a1[W6] acompanhada pela absorção da solução em 280 nm.

Para confirmarmos a liberação do peptídeo do látex, a solução foi avaliada por meio da CLAE. Comparando o perfil cromatográfico da solução de liberação do látex puro (Figura 22A), com a contendo a Hylina a1[W6] (Figura 22B) e com uma amostra do peptídeo puro (figura 22C), é possível observar:

- a ausência do pico da Hylina a1[W6] (16,3 min) na solução de liberação do látex contendo este peptídeo, o que mostra que o peptídeo não foi liberado.
- O aparecimento de picos adicionais, além daqueles liberados no látex puro, em 10,5; 11 e 18 min.

Análises no espectrômetro de massas confirmaram a não liberação do peptídeo (Figura 23) por não apresentar o peso molecular teórico da Hylina a1[W6].

Estes dados indicam que provavelmente não ocorreu a liberação do peptídeo. Este fato pode ser atribuído ao fato desse ficar retido na malha polimérica da biomembrana, ou talvez devido à degradação do peptídeo Hylina a1[W6] por meio de enzimas contidas no látex. Devido ao aparecimento de picos adicionais na solução de liberação do látex contendo o peptídeo a segunda hipótese nos pareceu mais plausível.

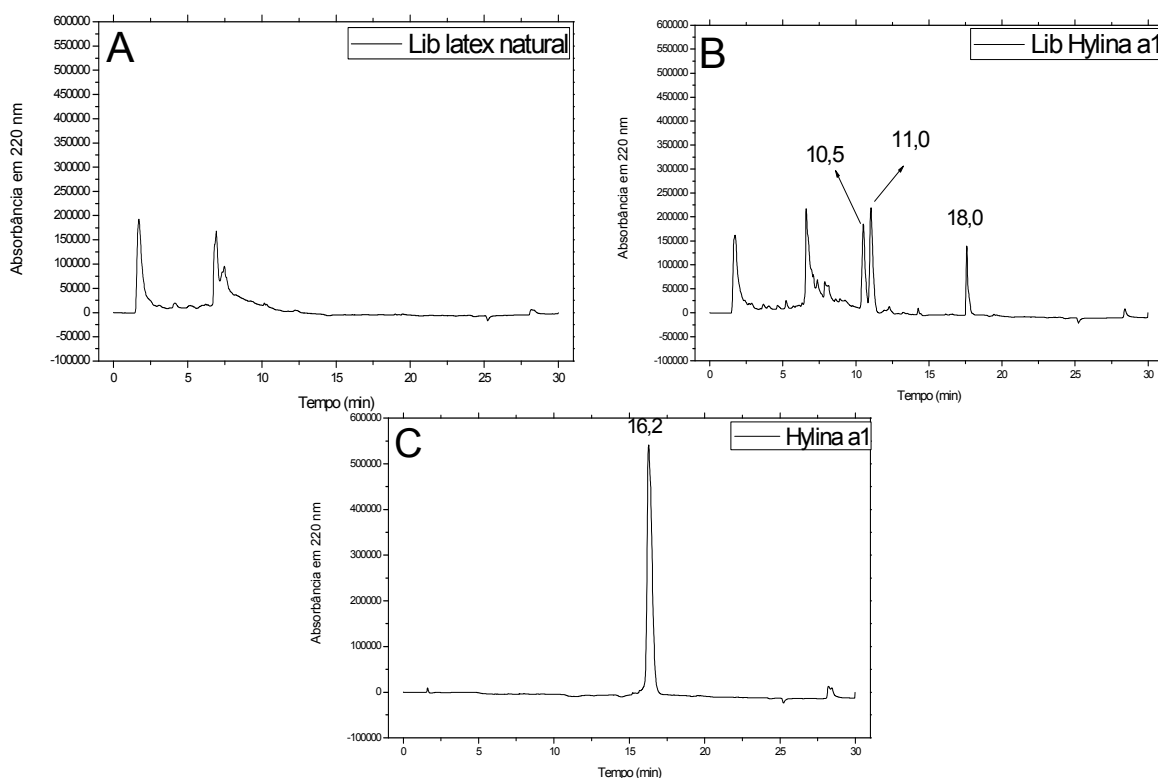


Figura 22. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro, B) do látex contendo o peptídeo Hylina a1[W6] e C) Hylina [W6] pura.

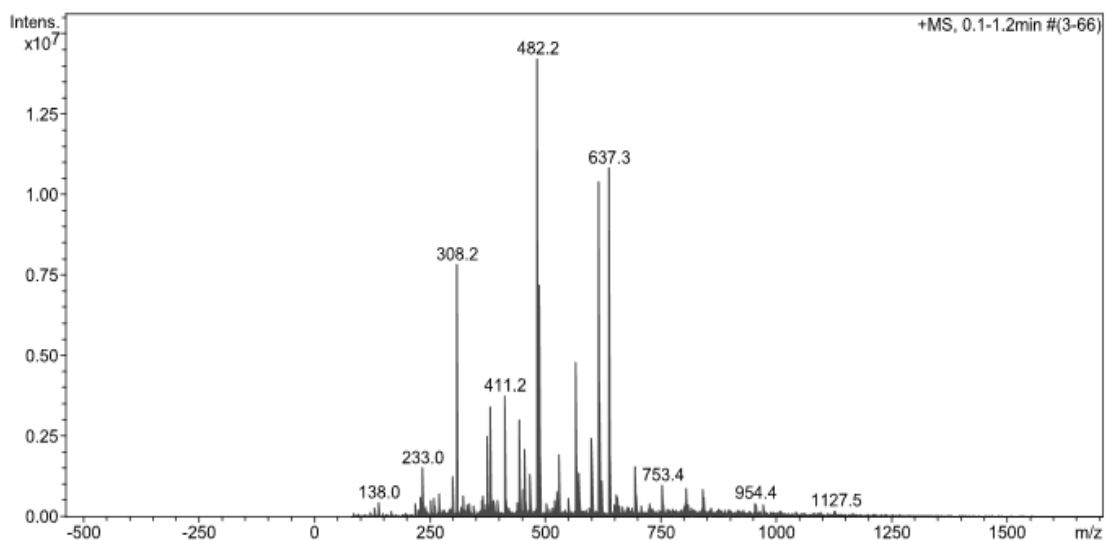


Figura 23. Espectro de massas da solução de liberação do látex contendo o peptídeo Hyline a1[W6].

Ressaltamos que, independente da metodologia empregada na confecção do látex (estufa ou liofilização) ou da quantidade de peptídeo utilizado (0,5; 1 mg ou 5 mg) não houve alteração nos resultados obtidos. Isto é, não foi possível verificar a liberação do peptídeo da biomembrana.

4.3.2 Liberação peptídeo OGP (10-14)

A liberação do peptídeo OGP(10-14) foi realizada com a biomembrana contendo 1 mg de peptídeo em 10 mL de solução (Figura 24).

A maior absorção da solução no comprimento de onda de 274 nm do látex contendo o peptídeo em relação à biomembrana pura poderia indicar a liberação do peptídeo.

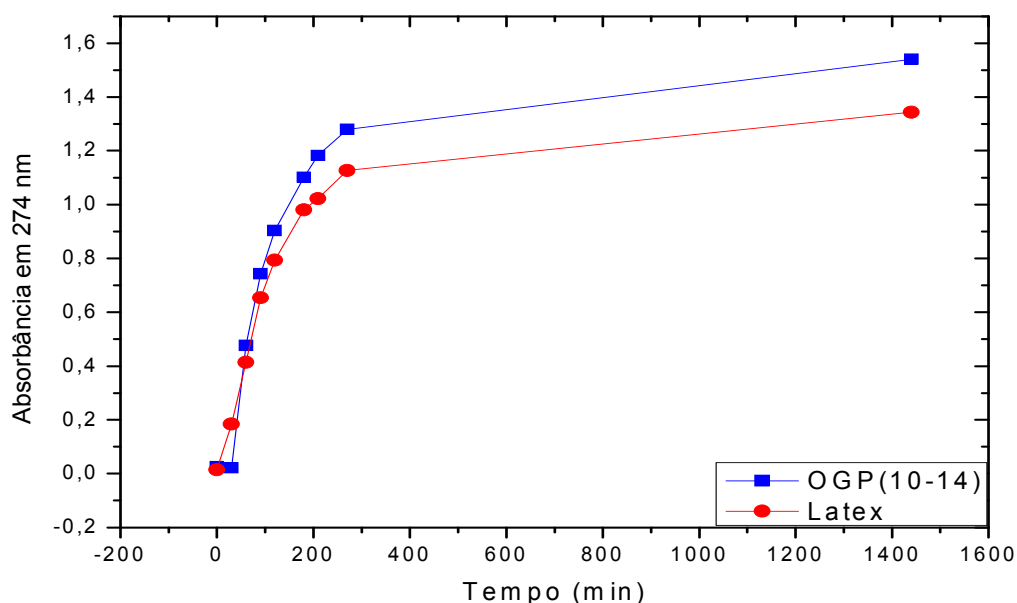


Figura 24. Comparação dos gráficos de liberação do látex puro e OGP(10-14) obtidos em UV-vis.

No entanto, quando comparamos os perfis cromatográficos das soluções obtidas da liberação do látex puro (Figura 25A), do látex contendo o OGP(10-14) (Figura 25B) e do peptídeo puro (Figura 25C), é possível notar que, o pico em 7,4 min característico do peptídeo, não ocorre nas soluções de liberação. Na solução de liberação contendo o peptídeo, em relação ao látex puro, verifica-se a presença de um pico em 6,16 min. Este pico não aparece na liberação do látex puro, podendo estar relacionado a degradação do peptídeo OGP(10-14).

A análise no espectrômetro de massas (Figura 26) da solução de liberação de látex contendo o peptídeo mostra a presença de um pico com baixa intensidade com a mesma massa molecular do peptídeo OGP(10-14), que é de 500 g/mol. Estes resultados indicaram muito pouca liberação do peptídeo ou a degradação desta molécula.

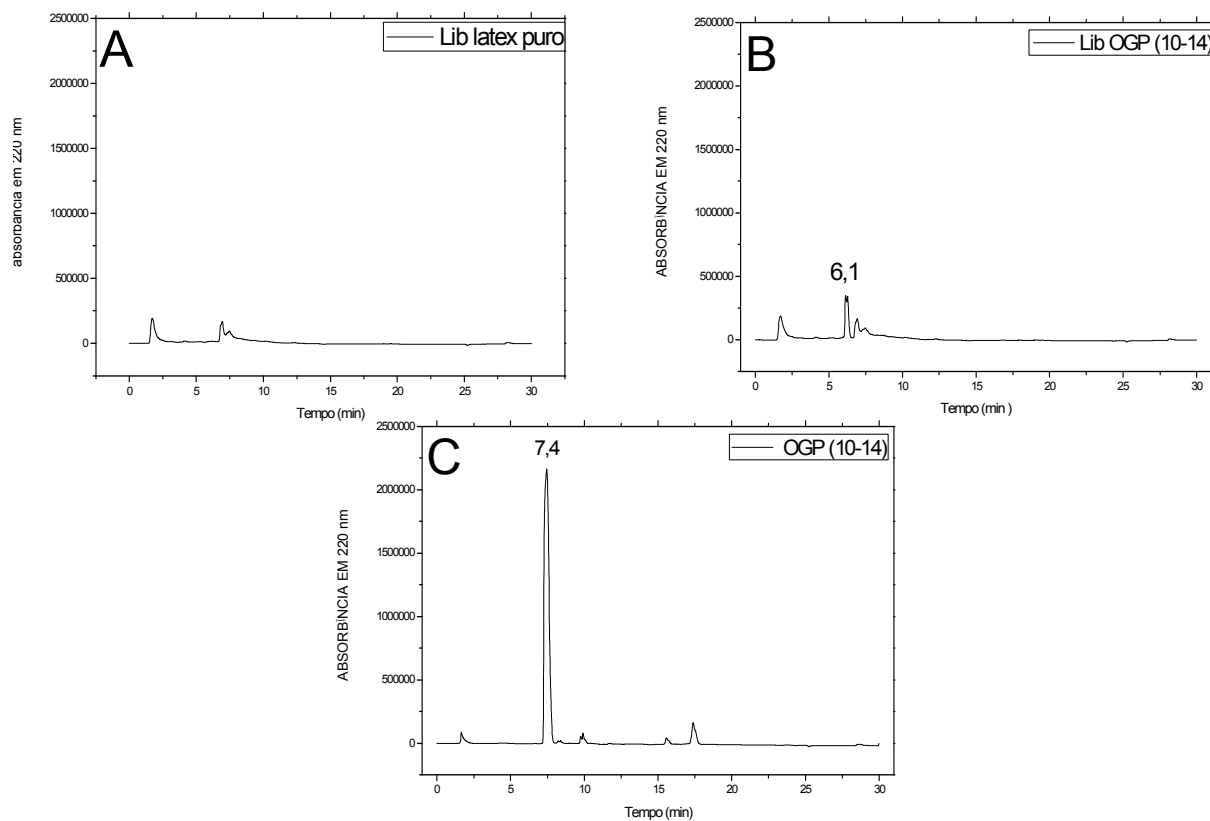


Figura 25. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro, B) solução de liberação do látex/OGP(10-14) e C) OGP(10-14) puro.

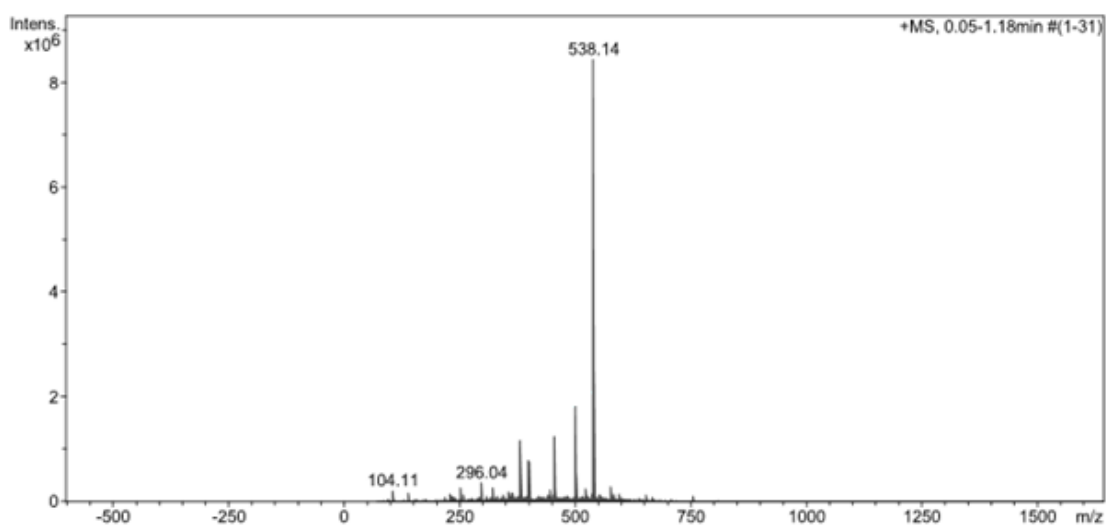


Figura 26. Espectro de massas da solução de liberação do peptídeo OGP(10-14).

Os resultados obtidos mostraram que ou os peptídeos não foram liberados da malha polimérica devido ao seu tamanho ou que havia uma interação específica; ou ainda, eles eram degradados durante o processo. Para avaliar a primeira hipótese, dois outros peptídeos foram estudados.

3.4.3 Liberação peptídeo de acetil-WAA e acetil-WAAAA

Devido ao fato de não termos obtidos resultados satisfatórios com os peptídeos anteriores, resolvemos sintetizar outros dois peptídeos com sequências mais simples. A sequência escolhida foi a contendo basicamente resíduos de alaninas e um resíduo de triptofano (fluorescente). As dúvidas que estavam colocadas eram se o peptídeo está ficando retido na malha polimérica da biomembrana ou se estava ocorrendo a degradação pelas enzimas liberadas pelo látex. O estudo destes peptídeos, principalmente o segundo de tamanho parecido ao OGP(10-14), poderia esclarecer se o peptídeo fica retido na malha polimérica.

As curvas de liberação dos peptídeos (Figura 27 e 28) utilizando a espectroscopia na região do UV mostraram uma absorbância muito superior aos peptídeos estudados anteriormente, indicando a liberação destas moléculas.

Quantitativamente, utilizando o valor de absorvidade molar de $5600 \text{ L/mol.cm}^{-1}$, o peptídeo de Ac-WAA apresentou uma liberação 14% de material (5 mg inicial) em 10 mL de água deionizada (figura 27). O peptídeo Ac-WAAAA mostrou uma liberação de 32% (figura 28). As liberações dos peptídeos foram confirmadas por CLAE.

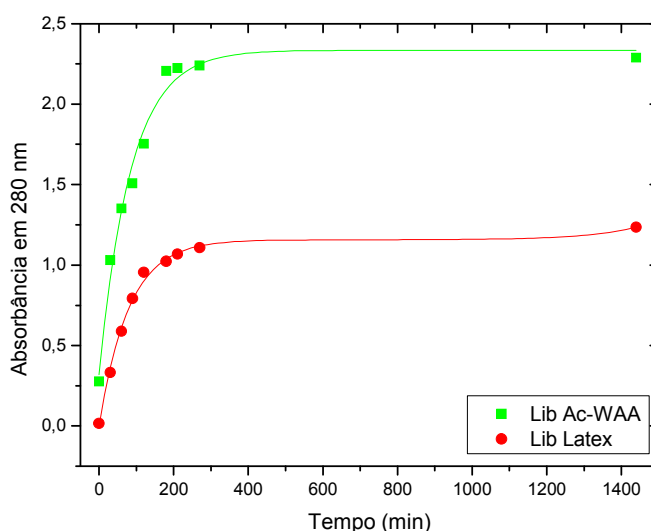


Figura 27. Curvas de liberação do látex puro (vermelho) e do látex contendo o peptídeo Ac-WAA (verde) obtidas por espectrofotometria na região do UV (280 nm).

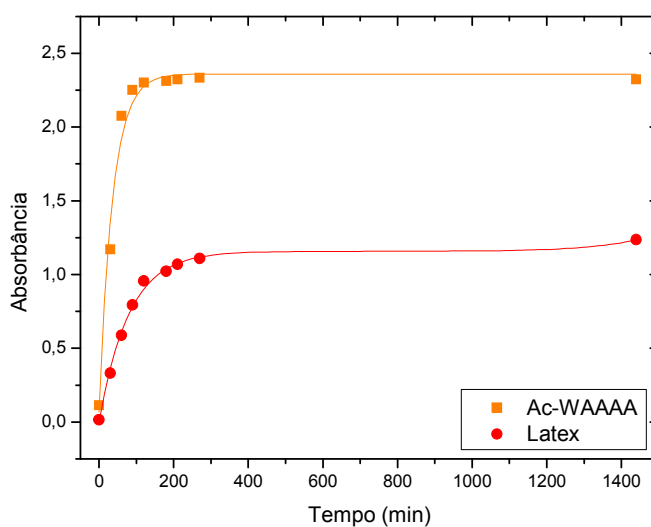


Figura 28. Curvas de liberação do látex puro (vermelho) e do látex contendo o peptídeo Ac-WAAAA (laranja) obtidas por espectrofotometria na região do UV (280 nm).

Comparando os perfis de CLAE da solução de liberação do látex contendo o peptídeo com os dos peptídeos, observamos que o pico característico da sequência peptídica aparece em ambas liberações (figuras 29 B e C e 30 B e C), comprovando a sua liberação.

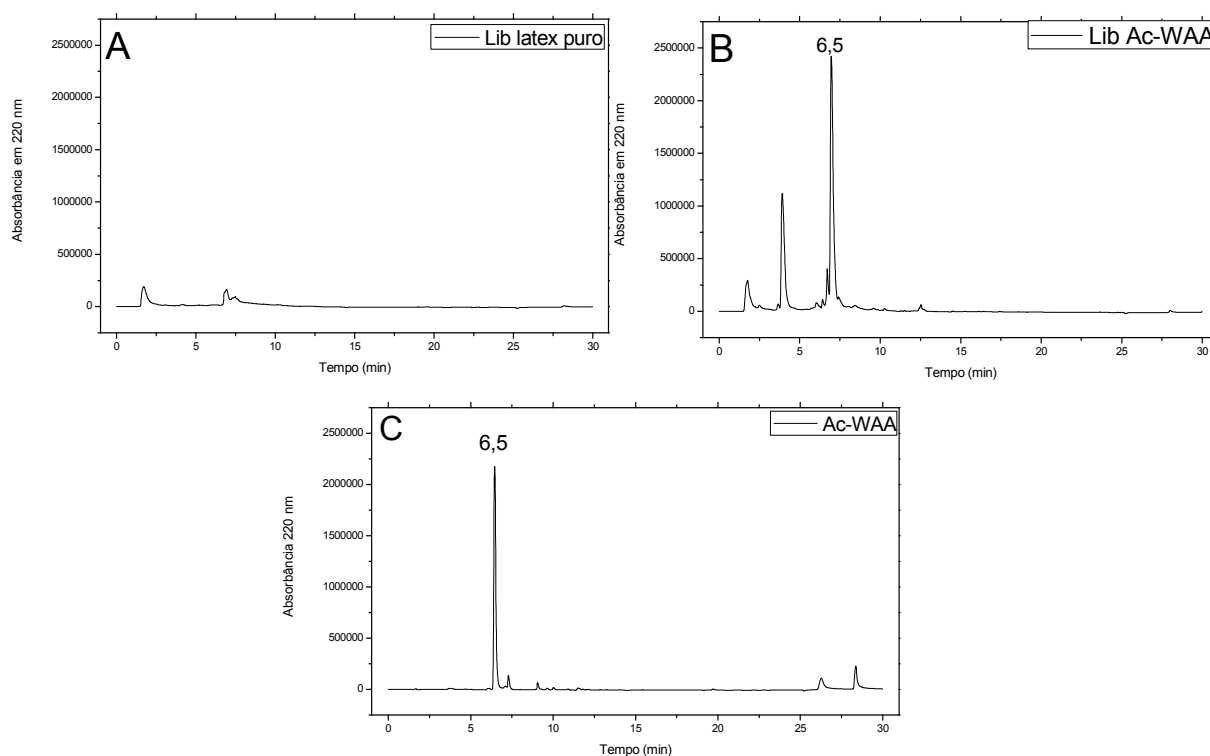


Figura 29. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro, B) solução de liberação do látex/Acetil-WAA e C) Acetil-WAA puro.

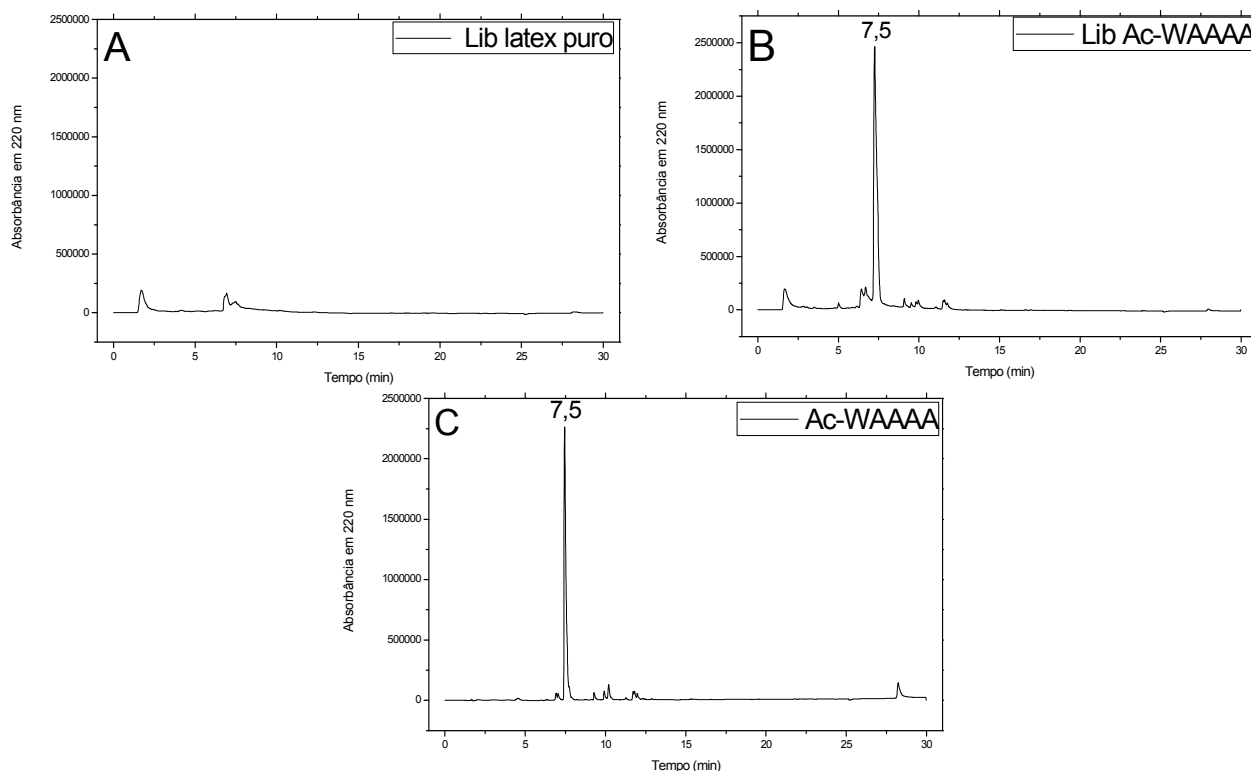


Figura 30. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro, B) solução de liberação do látex/Acetil-WAAAA e C) Acetil- WAAAA puro.

4.3.3 Liberação BSA

Com a confirmação da liberação do peptídeo de 5 resíduos que tem tamanho similar ao peptídeo OGP(10-14), que não foi liberado, podemos afirmar que o problema da falta de liberação dos peptídeos estudados anteriormente não se tratava da retenção na malha polimérica.

Para confirmar que a retenção na malha polimérica não é causada pelo tamanho da molécula, repetimos o estudo de liberação da proteína BSA (soro albumina bovina), que é uma proteína que contem 607 resíduos e peso molecular de 66 KDa. Esse estudo já tinha realizado por Herculano et al.,(2009) obtendo uma ótima liberação. No entanto, a confirmação de que o material liberado era realmente a BSA não tinha sido realizada.

A liberação foi realizada com três tipos de biomembranas distintas: Látex polimerizado na estufa a 27°C (Figura 31), a mesma utilizada por Herculano et

al., (2009); na estufa a 37°C (Figura 32) e liofilizado (Figura 33). Essa liberação foi acompanhada por CLAE, o que permite comprovar a liberação da BSA.

Neste mesmo estudo, foi observado que a liberação foi aumentada com a utilização de biomembranas de látex com maior quantidade de poros.

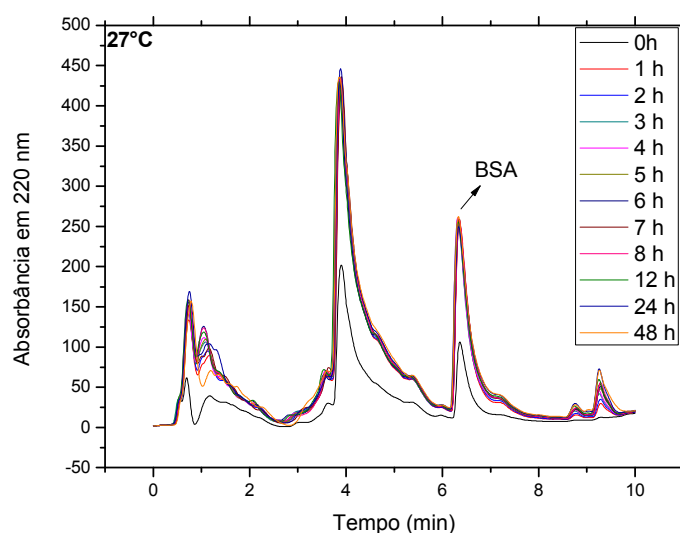


Figura 31. Perfis cromatográficos da solução de liberação da biomembrana contendo BSA polimerizada na estufa a 27°C, 0 a 48 h.

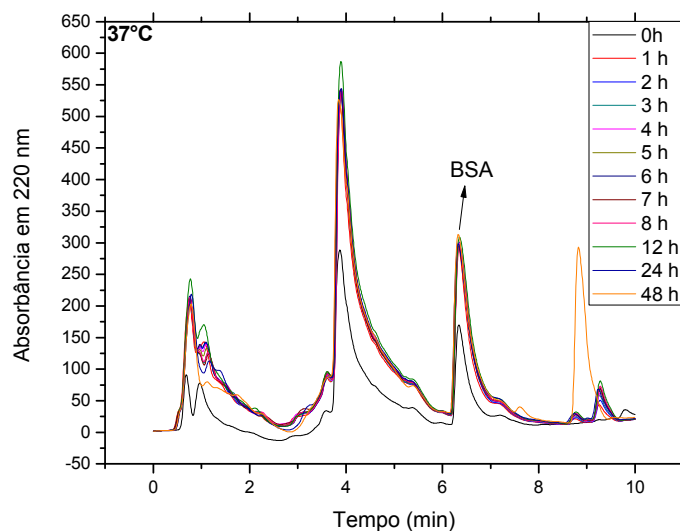


Figura 32. Perfis cromatográficos da solução de liberação da biomembrana contendo BSA polimerizada na estufa a 37°C em 0 a 48 h.

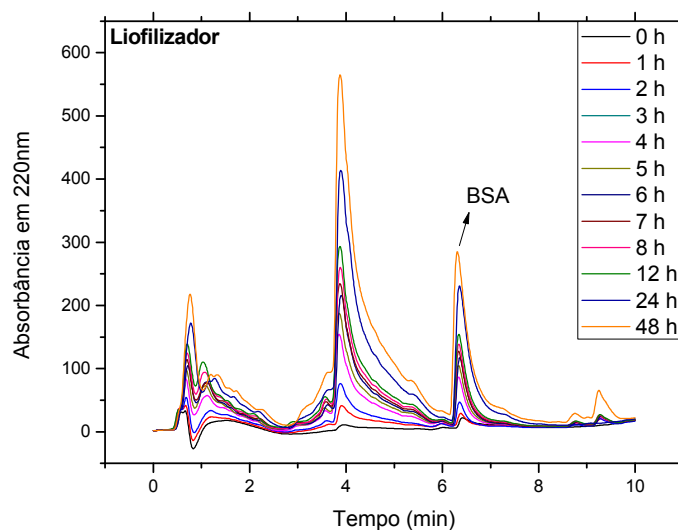


Figura 33. Perfis cromatográficos da solução de liberação da biomembrana contendo BSA polimerizado via liofilizador em 0 a 48 h.

Por meio dos gráficos das figuras 34 e 35, liberação dos látex obtidos pelos métodos convencionais, foi possível observar o fenômeno conhecido como “burst release” ou liberação repentina, que acontece devido a presença do BSA na superfície das biomembranas, o que pode resultar em um valor superestimado nos primeiros instantes dos ensaios de liberação (MENDES, 2012). Já no gráfico da Figura 36, látex obtido por meio do uso do liofilizador e com maior quantidade de poros, também é possível observar o fenômeno “burst release”, mas com efeito menos acentuado e com uma liberação mais lenta e contínua.

As biomembranas polimerizadas na estufa a 27°C e 37°C liberaram a BSA principalmente durante as 5 primeiras horas. As concentrações finais encontradas nestes estudos foram de 38% e 50%, sendo que a concentração total de liberação seria 0,25 mg/mL (100%). De modo diverso, a biomembrana polimerizada via liofilizador continuou liberando a BSA pelo menos até 48 h depois do início do experimento. Neste período foram liberados 40% de BSA.

Estes resultados confirmaram que os peptídeos não estavam ficando retidos na malha polimérica devido ao seu tamanho, já que o BSA é uma proteína e foi liberada com sucesso.

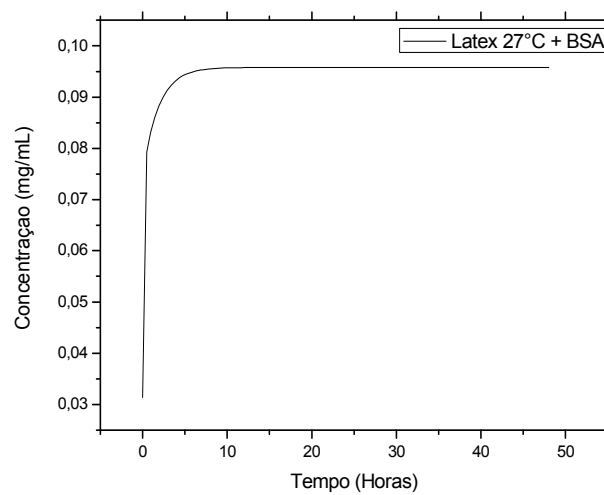


Figura 34. Gráfico de liberação de BSA pelo látex polimerizado a 27°C.

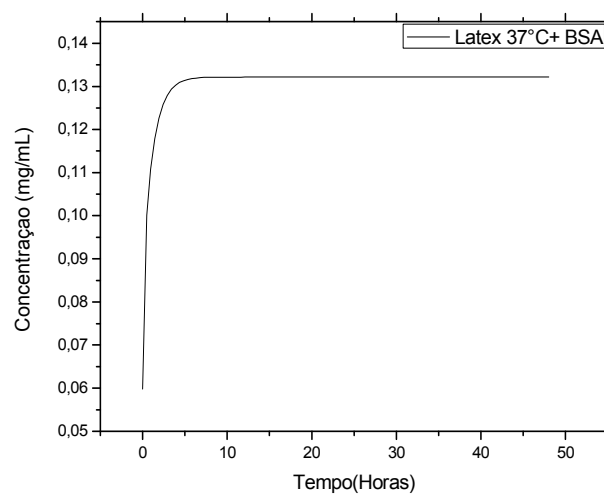


Figura 35. Gráfico de liberação de BSA pelo látex polimerizado a 37°C.

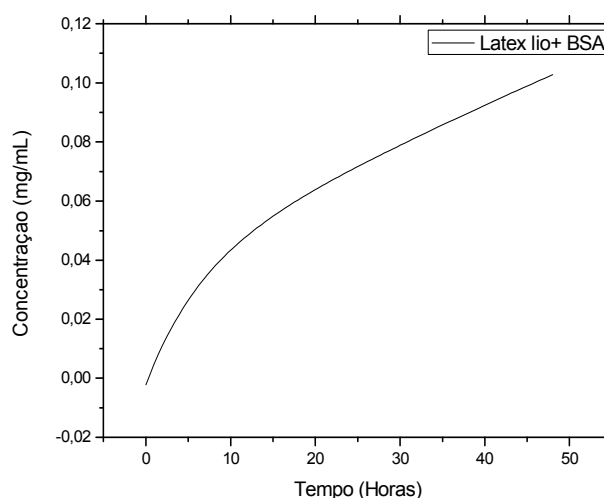


Figura 36. Gráfico de liberação de BSA pelo látex polimerizado via liofilizador.

A partir desses resultados a segunda opção, a de degradação proteolítica, foi avaliada. Para isso, foram feitas análises de degradação dos peptídeos pelas proteases contidas no látex.

Na literatura são descritas várias enzimas no látex, entre elas as cisteíno-proteases (CARVALHO, 2009; PENG, et al., 2008) e as serino-proteases (LYNN; CLEVATTE-RADFORD, 1984, 1986), o que poderia explicar a degradação dos peptídeos.

Entretanto, ficou uma dúvida, como explicar a não degradação do BSA? Segundo Lynn e Clevatte-Radford (1986) as serino-proteases não apresentam atividade proteolítica nas proteínas BSA e hemoglobina, o que poderia responder à questão acima.

4.4 Experimento de degradação do peptídeo pelas substâncias liberadas pelo látex

Para confirmar a hipótese de degradação proteolítica, inicialmente incubamos o peptídeo com uma solução contendo o próprio látex. No caso de ocorrer a degradação, o pico correspondente do peptídeo Hylina a1[W6] no cromatograma obtido na CLAE deveria diminuir ou desaparecer.

Analisando a Figura 37 conseguimos observar que o pico característico do peptídeo Hylina a1[W6] não está presente após 5 dias de incubação. Isto indica que o peptídeo foi degradado por substâncias liberadas pela biomembrana ou foi adsorvido pela biomembrana. Para descobrirmos qual das

duas hipóteses é a correta, repetimos o experimento de degradação retirando o látex da solução utilizada.

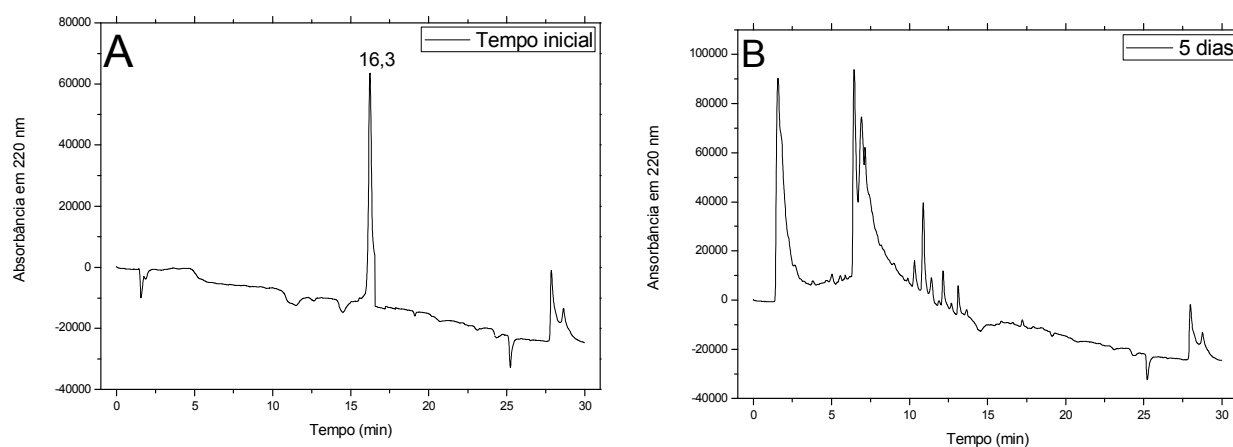


Figura 37. Análise por CLAE da solução inicial do peptídeo Hyline a1[W6] (A) e após 5 dias incubação com o látex (B).

4.5 Experimento de degradação sem a presença da biomembrana de látex

Os resultados obtidos da incubação da solução obtida do látex com o peptídeo estão apresentados na Figura 38. Essa análise evidenciou a degradação do peptídeo, comprovado pelo contínuo desaparecimento do pico característico da Hyline a1[W6] após 24 h por CLAE.

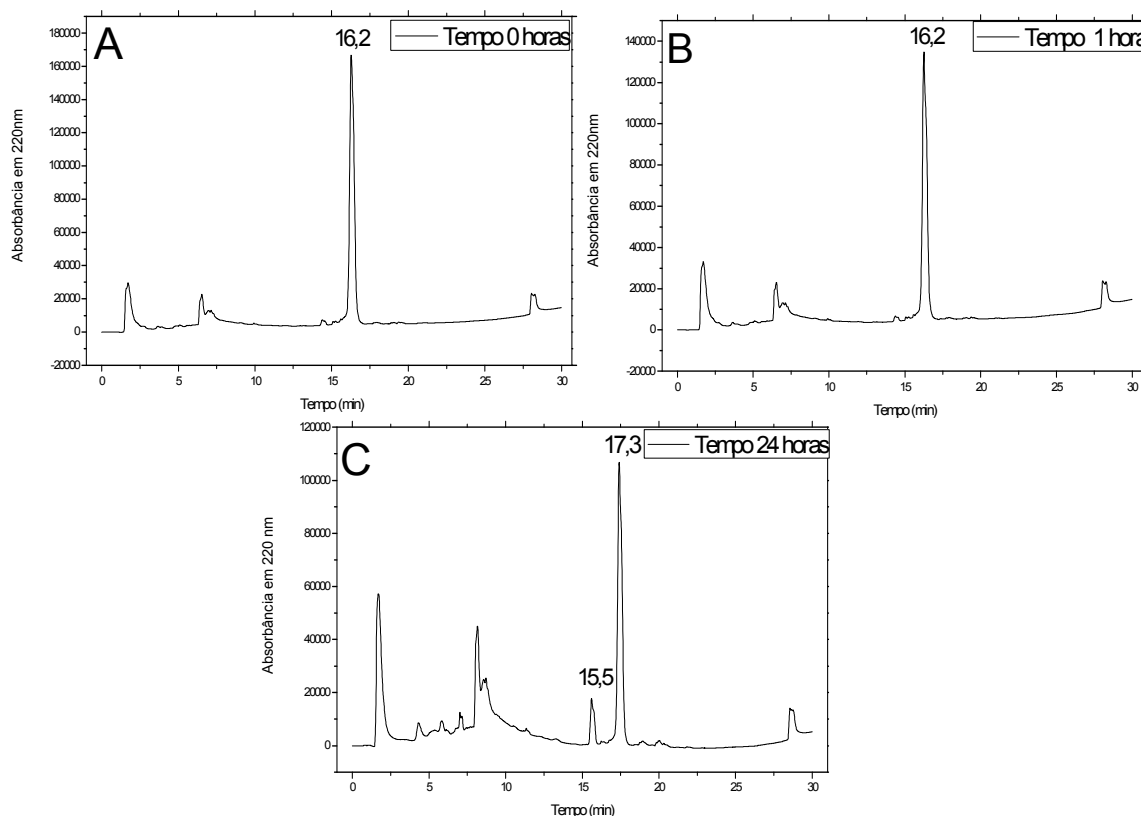


Figura 38. Análise por CLAE da degradação do peptídeo Hyline a1 pela solução liberada pelo látex nos tempos de: A) 0, B) 1 e C) 24 h.

4.6 Análise de degradação do peptídeo pelas enzimas liberadas pelo látex tratados termicamente

Após a confirmação de que o peptídeo era degradado pela solução do látex, provavelmente por proteases, realizamos experimentos adicionais visando viabilizar a utilização do látex como carreador para de liberação de peptídeos.

Desta forma, foram realizados diferentes tratamentos térmicos do material de partida, visando a desnaturação protéica. Os diferentes látex utilizados foram:

- autoclavado a 120°C por 20 min
- autoclavado a 120°C por 1 h
- aquecido na estufa a 80°C por 30 min

- aquecido na estufa a 80°C por 5 dias

A solução da membrana confeccionada com o látex aquecido por 5 dias em estufa a 80°C, praticamente não promoveu degradação do peptídeo Hylina a1[W6], enquanto os outros tratamentos não impediram a degradação do peptídeo (Figura 39).

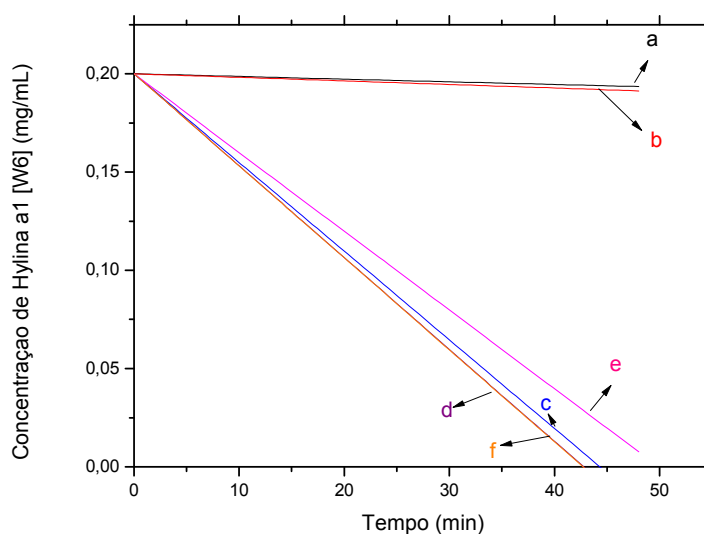


Figura 39. Análise de degradação dos peptídeos pela solução liberada pelo látex com diferentes tratamentos térmicos. a) Controle - peptídeo em água deionizada; b) Biomembrana confeccionada com o látex aquecido em estufa por 5 dias a 80°C; c) Biomembrana confeccionada com o látex aquecido em estufa por 30 min a 80°C; d) Biomembrana confeccionada com o látex autoclavado por 20 min a 120°C; e) Biomembrana confeccionada com o látex autoclavado por 1 h a 120°C; f) Controle - Biomembrana confeccionada com o látex sem tratamento térmico.

4.7 Ensaios de liberação de Hylina a1[W6] a partir do látex tratado em estufa a 80°C por 5 dias

Para avaliar se o tratamento a alta temperatura, viabilizaria o uso do látex para a liberação da Hylina a1[W6], realizamos a confecção de uma biomembrana contendo o látex, com o tratamento acima descrito, e o peptídeo.

O ensaio de liberação desta biomembrana foi analisado utilizando a absorção de luz na região do UV (Figura 40). Comparando a curva de absorção

deste material com o látex nativo, é possível verificar o aumento de material liberado.

No entanto, o perfil cromatográfico da solução de liberação com o látex contendo a Hyлина a1[W6] (Figura 41B) não apresentou o pico correspondente ao peptídeo Hyлина a1[W6] (Figura 41C). Somado a isto, podemos observar que o cromatograma de liberação do peptídeo obtido apresenta pico adicional em 15,8 min em comparação com o perfil de liberação do látex puro (Figura 41 A). Estes dados indicaram que, provavelmente não ocorreu a liberação do peptídeo ou novamente este foi degradado. Entretanto a primeira hipótese foi a mais aceita neste momento, visto que nos testes anteriores com a biomembrana de látex confeccionadas com o látex tratado 5 dias na estufa a 80°C mostrou uma provável desnaturação das enzimas. Uma hipótese sobre o que poderia estar ocorrendo é de que o tratamento térmico feito no látex ainda líquido possa ter alterado a propriedade do látex, o que afetaria a porosidade da biomembrana. Para verificar esta hipótese foi feita uma análise das biomembranas obtidas nestas condições em microscopia eletrônica de varredura.

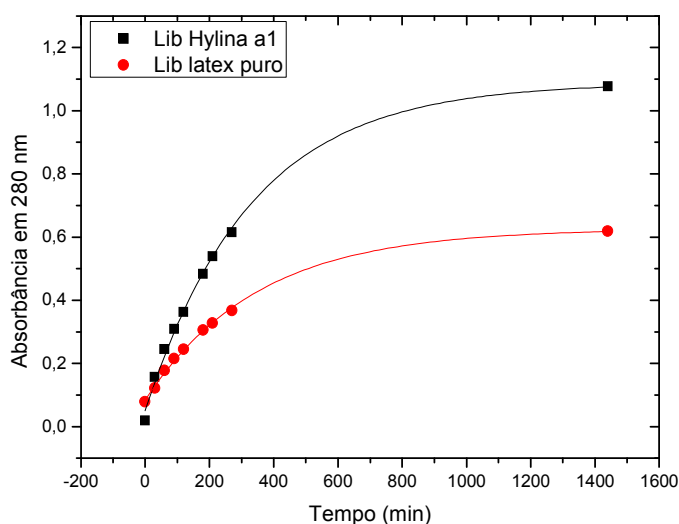


Figura 40. Comparação dos gráficos de liberação das biomembranas com e sem o Hyлина a1[W6] produzidas com o látex tratados na estufa por 5 dias a 80°C puro, obtidos em por meio da absorção na região do UV.

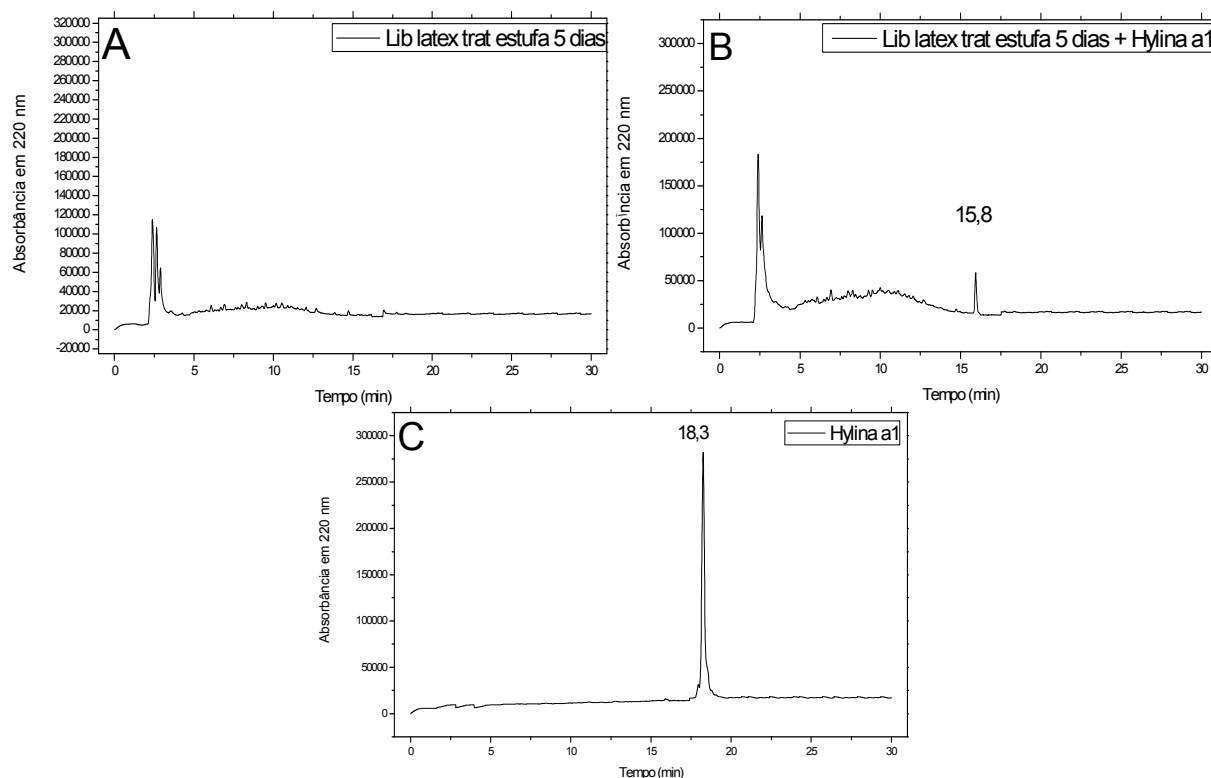


Figura 41. A) Perfis cromatográficos da solução de liberação do látex puro, B) solução de liberação do látex/Hylina a1[W6] e C) Hylina a1[W6] pura (biomembrana produzida com o látex tratados na estufa por 5 dias a 80°C).

4.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura

As análises realizadas mostraram que, em comparação com as biomembranas obtidas sem o tratamento térmico a porosidade das biomembranas foi alterada. A figura 42 mostra que a biomembrana após o tratamento e com a adição de água mostrou uma diminuição na porosidade, além de apresentar cavidades em sua superfície. A figura 43 também mostra a biomembrana liofilizada sem adição de água, que mostra uma grande queda na porosidade. A biomembrana polimerizada na estufa a 37°C (figura 44) continuou sem presença de poros.

Estes resultados nos levam a crer que um dos fatores responsáveis pela falta de liberação do peptídeo possa ser a diminuição da porosidade da biomembrana.

A soma de todos os estudos apresentados acima indicou que o uso do látex como carreador para liberação de peptídeos ainda carece de estudos adicionais.

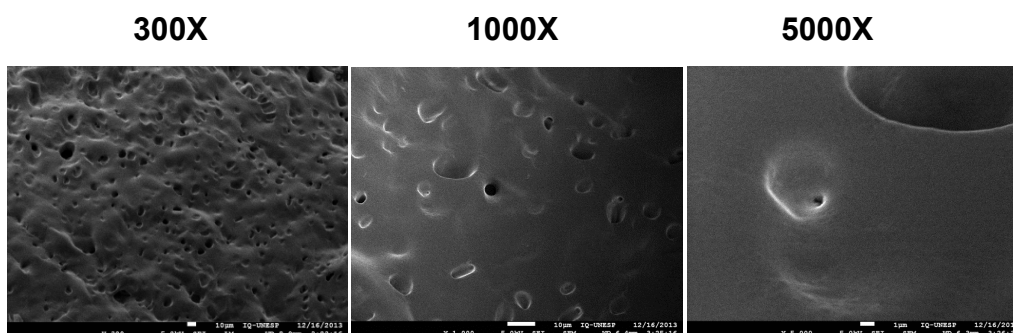


Figura 42. Microscopia eletrônica de varredura do látex puro tratado por 5 dias a 80°C com adição de água e polimerizado em liofilizador.

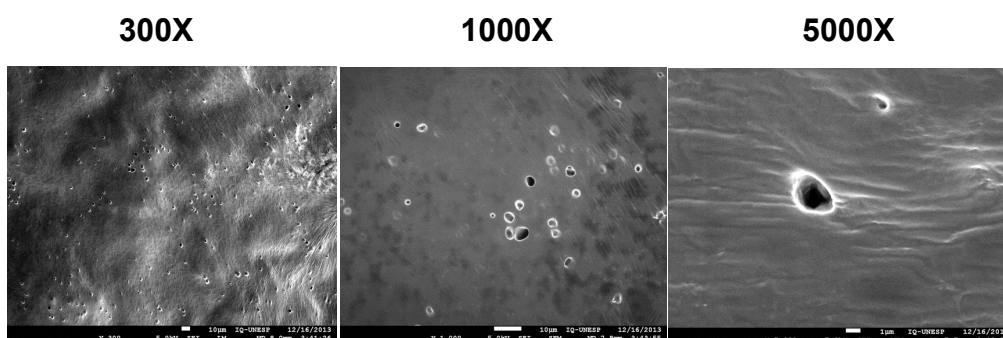


Figura 43. Microscopia eletrônica de varredura Látex puro tratado por 5 dias a 80°C e polimerizado em liofilizador.

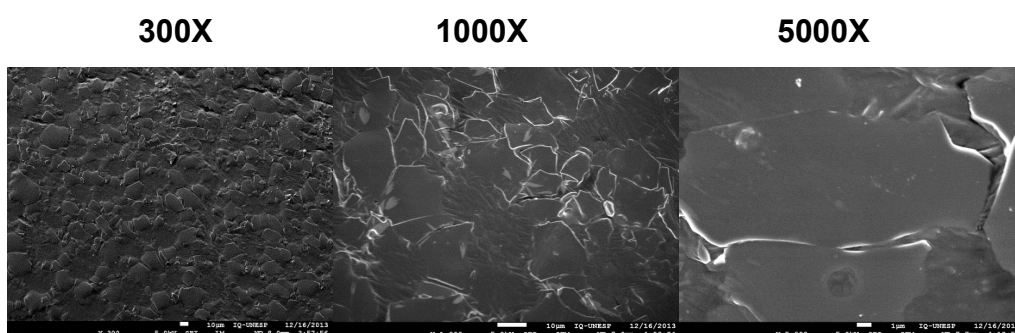


Figura 44. Microscopia eletrônica de varredura do látex puro tratado por 5 dias a 80°C e polimerizado em estufa a 37 °C.

4.9 Estudo da degradação do peptídeo Hylina a1[W6]

Usando o estudo da degradação da biomembrana com o látex autoclavado por 1 h (Figura 45), observamos que ao passar do tempo o pico característico da Hylina a1[W6] diminui, e ocorre o aparecimento de um novo pico. Esse pico foi isolado e analisado no espectrômetro de massas.

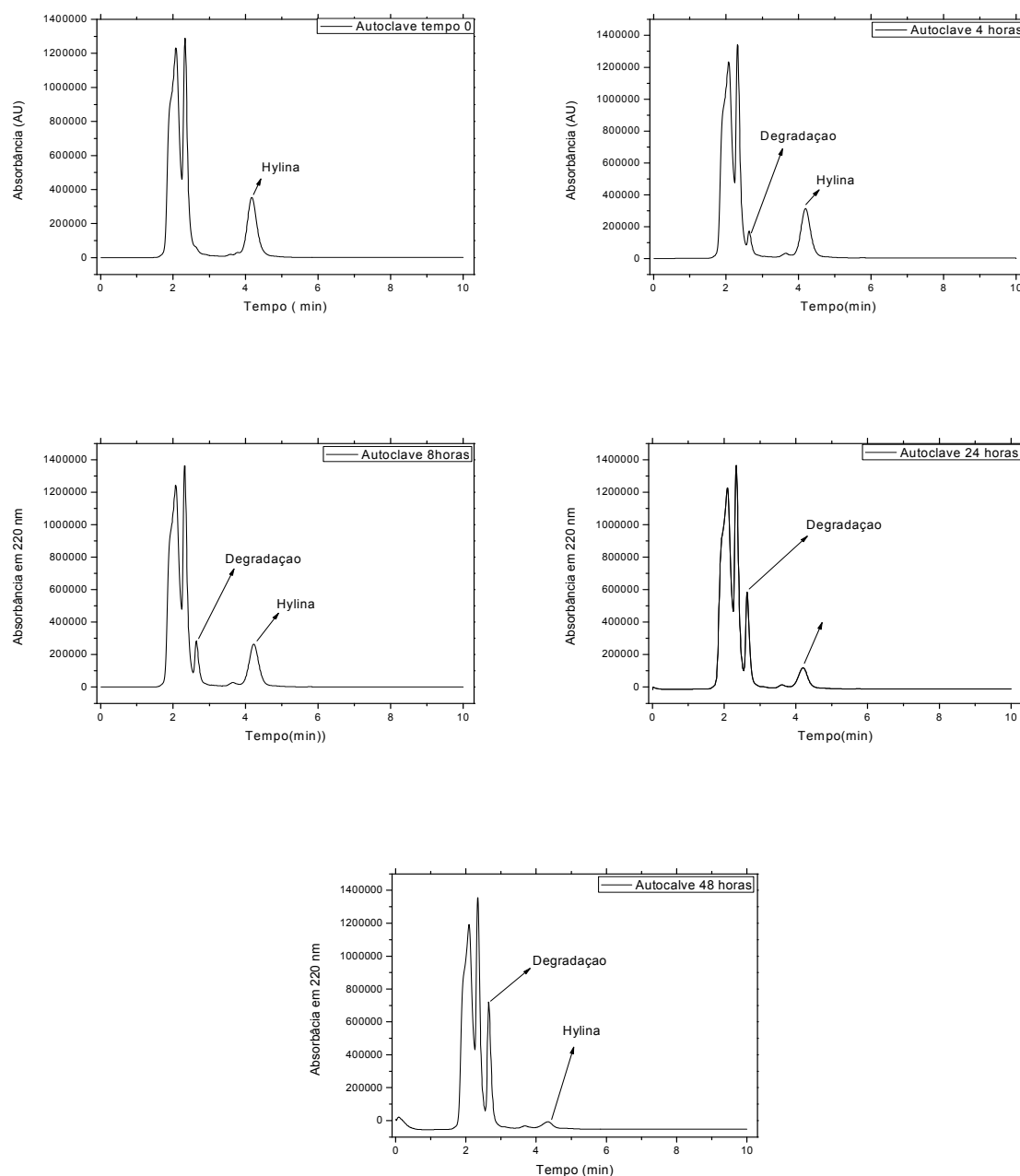


Figura 45. Cromatogramas obtidos da degradação do peptídeo Hylina a1[W6] na solução obtida de látex autoclavado por 1 h a 120°C no tempo de 0, 4, 8, 24 e 48 h.

A análise do pico correspondente a degradação do peptídeo Hylina a1[W6] pela espectrometria de massas (Figura 46), mostrou a presença dos íons moleculares de 910 g/mol ($Z=2$) e 540 g/mol ($Z=3$). A deconvolução destes picos mostraram a massa molecular de 1619 g/mol, sendo que a massa molar do peptídeo Hylina a1[W6] é de 1937 g/mol. Infelizmente não foi possível determinar a sequência deste material, pois nenhuma massa molar dos aminoácidos ou dos fragmentos pertencentes ao peptídeo Hylina a1[W6] foram identificados.

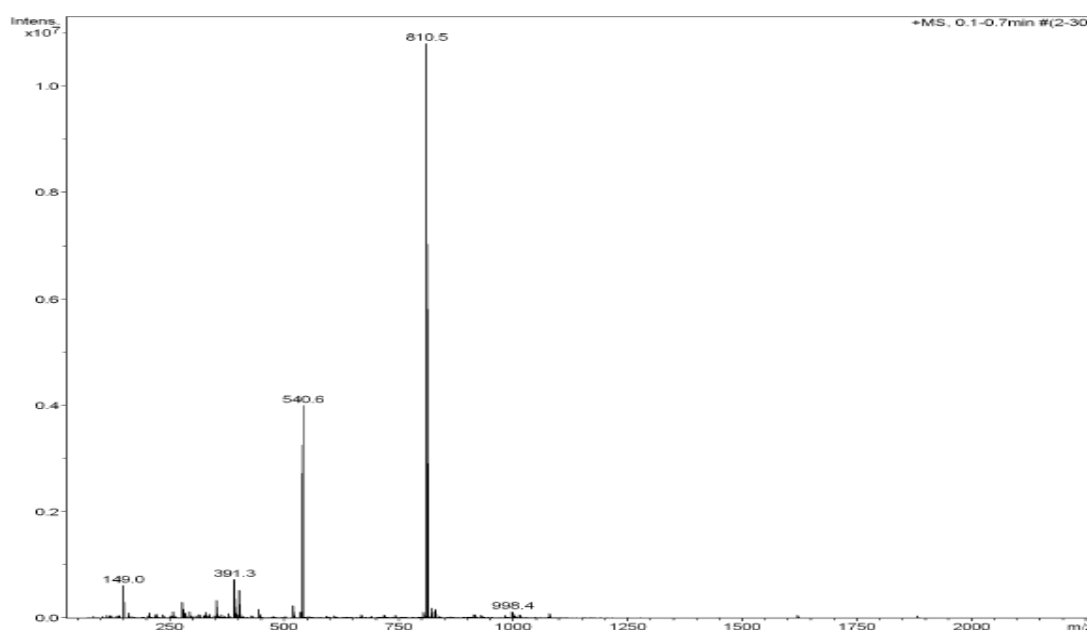


Figura 46. Espectro de massas do peptídeo obtido da degradação da Hylina a1[W6].

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de uma nova metodologia para polimerização da biomembrana de látex natural via liofilizador foi realizado. O látex obtido foi caracterizado por MEV, por ensaio resistência mecânica e análise de permeabilidade ao vapor de água. O material obtido após liofilização mostrou a presença de poros, menor resistência mecânica e elasticidade próxima das biomembranas produzidas pelo método convencional. A maior porosidade promoveu maior permeabilidade ao vapor de água. Essa maior permeabilidade aos gases é a grande inovação dessa nova biomembrana, pois permite maior troca de gases podendo ser uma alternativa mais eficaz para a produção de curativos.

Nas análises por MEV também foi possível concluir que a quantidade de poros pode ser regulada pela adição de água à solução de látex.

A liberação dos peptídeos Hyline a1[W6] e OGP(10-14) não ocorreu, mas esse resultado se deve provavelmente a degradação dos peptídeos pelas enzimas liberadas pelo látex.

Os peptídeos com 3 resíduos (Acetil-WAA) e com 5 resíduos (Acetil-WAAAA), que tem o mesmo número de resíduos que OGP(10-14), mostraram que o uso de peptídeos em biomembranas de látex é sequência dependente.

Conseguimos verificar também que na liberação do BSA a biomembrana polimerizada via liofilizador tem uma liberação lenta e continua em comparação com as biomembranas polimerizadas na estufa a 27°C e 37°C, que é uma característica interessante para a liberação controlada.

As análises de degradação mostraram que as enzimas provavelmente estão degradando o peptídeo Hyline a1[W6] e também apontou o melhor tratamento térmico para desnaturar as enzimas liberadas pelo látex. No entanto, esse mesmo tratamento no látex ainda líquido alterou a porosidade da biomembrana quando polimerizada.

Tendo em vista os resultados apresentados podemos concluir que, o uso do látex como carreador para liberação de peptídeos é sequência dependente, sendo que estudos adicionais são necessários para implementar esta tecnologia.

REFERÊNCIAS

- AIELO, P. B.; VILLELA, A.; HERCULANO, R. D. Avaliação da liberação controlada do diclofenaco de sódio empregando biomembranas de látex natural como carreador. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ORGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 7., 2012, Natal. **Anais...** Natal: [SLABO], 2012. Ref. 06-052.
- AIELO, P. B.; CHAGAS, P. A. M.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. Liberação sustentada de diclofenacos (sódio e potássio) utilizando o látex natural como suporte. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 58., 2011, Araraquara. **Anais...** São Paulo: Ed. UNESP, 2011. Não paginado.
- AKHGARI, A.; FARAHMAND, F.; AFRASIABI GAREKANI, H.; SADEGHI, F.; VANDAMME, T. F. Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 28, p. 307-314, 2006.
- ALVES, M. C. O. **Teste da angiogênese estimulada por membranas de látex natural**. 2003. 60 f. (Dissertação de Mestrado em Física Médica)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- BAB, I.; GAZIT, D.; CHOREV, M.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; GREENBERG, Z.; NAMDAR, M.; KAHAN, A. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. **EMBO J.**, v. 11, n. 5, p. 1867-1873, 1992.
- BALABANIAN, C. A. C. A.; COUTINHO NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; SUZIE, A. LACERDA, A. S.; BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.
- BORGES, F. A.; PERRI, E. G.; SANTOS, A. G. dos; TRECCO, A.; HERCULANO, R. D. Temperature influence in the extract release of *Casearia sylvestris* using NRL biomembrana. In: BRAZILIAN MRS MEETING, 12., 2013, Campos do Jordão. **Anais...** Rio de Janeiro: SBPMat, 2013. Ref. 6JXT.
- CARVALHO, H. A. S. **Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Thebrona cação monoliophthora perniciona***. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus, 2009.
- CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. F.; CRUSCA JUNIOR, E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUZA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, p. 291-296, 2009.

CHEN, Y. C.; BAB, I.; MANSUR, N.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; NAMDAR-ATTAR, M.; GAVISH, H.; VIDSON, M.; CHOREV, M. Structure bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)]. **J. Pept. Res.**, v. 56, p. 147-156, 2000.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 72, n. 3, p. 365-379, 1997.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. 242 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

CRUSCA JUNIOR, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. **Biopolymers**, v. 96, p. 41-48, 2010.

EHRET-SABATIER, L. D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, A. J.; DORSSCLAER, A. V.; BULET, P. Characterization of novel cysteine-scorpion blood. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 29537- 29544, 1996.

ERENO, C.; CATANZARO-GUIMARÃES, S. A.; HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; GRAEFF, C. F. O.; TAVANO, O.; BAFFA, O.; KINOSHITA, A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 95 n. 3, p. 932-939, 2010.

FRADE, M. A. C. MARTINELLI, S. A.; LOPEZ M. E.; COUTINHO, N. J.; TIRABOSCHI, F. N. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. **Med. Cután. Ibero-Lat.-Am.**, v. 34, n. 3, p. 133-138, 2006.

FRADE, M. A. C.; BRUM-CURSI, I.; FORTES-ANDRADE, F.; COUTINHO NETTO, J.; BARBETTA, F. M.; FOSS, N. T. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Med. Cután. Ibero-Lat.-Am.**, v. 32 n. 4 p. 157-162, 2004.

GIULIANO, C. B.; HERCULANO, R. D. Evaluation of ciprofloxacin and magnetic nanoparticles delivery system employing natural latex membranes as carrier. In: BRAZILIAN MRS MEETING, 12., 2013, Campos do Jordão. **Anais...** Rio de Janeiro: SBPMat, 2013. Ref. 6KCS.

HERCULANO, R. D. **Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas**. 2009. 129 f. Tese (Doutorado em Física Médica) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

HERCULANO, R. D.; BRUNELLO C. A.; GRAEFF C. F. O. Optimization of a novel nitric oxide sensor using a latex rubber matrix. **J. Appl. Sci.**, v. 7, p. 3801-3805, 2007.

HERCULANO, R. D.; GUIMARÃES, S. A. C.; BELMONTE, G. C.; DUARTE, M. A. H.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N.; KINOSHITA, A.; GRAEFF, C. F. O. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Mat. Res.**, v. 13, p. 57-61, 2010.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Chem.**, v. 34, p. 595-598, 1970.

KANG, H. S.; PARK, S. H.; LEE, Y. G.; SON, T. I. Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly(gamma-glutamic acid) for biological application: preparation, physical properties, and cytocompatibility. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 103, p. 386-394, 2006.

LLOYD, D. R.; KINZER, K. E.; TSENG, H. S. Microsporus membrane formation via thermally induced phase separation. I. Solid-liquid phase separation. **J. Membr. Sci.**, v. 52, p. 239-261, 1990.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2279-2282, 1986.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Purification and characterization of Hevain, a serine protease from *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 963-964, 1984.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149-54, 1963.

MRUÉ, F.; COUTINHO NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Mater. Res.**, v. 7, n. 2, p. 277- 283, 2004.

MURBACH, H. D.; HERCULANO R. D. Liberação sustentada de Ciprofloxacino empregando biomembrana de látex. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 58., 2011, Araraquara. **Anais...** São Paulo: Ed. UNESP, 2011. Não paginado.

NEVES JUNIOR, W. F. P.; FERREIRA, M.; ALVES, M. C. O.; GRAEFF, C. F. O.; BERNARDES, M. S.; COUTINHO NETO, J.; MULATO, M. Influence of fabrication process on the final properties of natural-rubber latex tubes for vascular prosthesis. **Braz. J. Phys.**, v. 36, p. 586-591, 2006.

PENG, Q.; ZHU, J.; LI, H.; TIAN, W. Cloning and characterization of a novel cysteine protease gene (HbCP1). **J. Biosci.**, v. 33, p. 681-690, 2008.

PINHO, E. C. C. M.; SOUSA, S. J. F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J. J. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arq. Bras. Oftalmol.**, 67, n. 1, p. 27-32, 2004.

RABELO, R. E.; PAULO, N. M.; SILVA, L. A.; SILVA, O. C. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0.1,% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. **Acta. Sci. Vet.**, v. 33, n. 2, p. 169-175, 2005.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI- NETO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES, J. R. P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 15, n. 4, p. 338-344, 2000.

SASKA, S. **Materiais compósitos-orgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP (10-14), para regeneração óssea**. 2011. 222 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) -Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.