

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

VICTÓRIA ZAGNA DOS SANTOS

**PREPARAÇÃO DE MATRIZES DE POLI(ÁCIDO LÁTICO)
CONTENDO O PEPTÍDEO JABURETOX PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO COMO CURATIVOS BIOATIVOS**

Porto Alegre, janeiro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

VICTÓRIA ZAGNA DOS SANTOS

**PREPARAÇÃO DE MATRIZES DE POLI(ÁCIDO LÁTICO)
CONTENDO O PEPTÍDEO JABURETOX PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO COMO CURATIVOS BIOATIVOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do Curso de Química Industrial como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial.

Dr.^a Fernanda Cortez Lopes
Orientadora

Prof. Dr. Douglas Gamba
Co-orientador

Porto Alegre, janeiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai para minha mãe pelo grande exemplo de mulher que é, por me dar todo o amor do mundo e sempre me apoiar.

Ao meu namorado Guilherme pelo amor, carinho e grande compreensão.

Ao meu 'cãopanheiro' Whisky por todos os dias me receber com festa e estar fielmente ao meu lado durante a escrita deste trabalho.

Aos meus irmãos e minhas tias pelo carinho e apoio.

A Fernanda, minha orientadora, pela confiança e grande parceria, por estar junto comigo durante todo esse trabalho e pelos grandes ensinamentos.

Ao Prof. Douglas, meu co-orientador, por toda ajuda e pelos grandes ensinamentos.

Ao Prof. Daniel Weibel e a Prof.^a Rosane Soares por disponibilizar seus laboratórios para o que eu precisei. Aos colegas do lab K102 pelas ajudas.

Aos meus colegas e amigos pelo apoio e pelos momentos de descontração.

RESUMO

A utilização de polímeros em aplicações biomédicas, particularmente na preparação de curativos, tem despertado grande interesse tecnológico. Dentre os diversos polímeros existentes, o poli(ácido láctico) (PLA) é o que apresenta significativo crescimento na área medicinal por ser biodegradável e biocompatível, assim como o poli(etilenoglicol) (PEG), o qual apresenta uma ampla utilização na área biomédica, mas especificamente no campo farmacêutico. Um curativo, além de biodegradável e biocompatível, pode ainda ser bioativo, se nesse for incorporado algum agente com propriedades biológicas, como é o caso do peptídeo Jaburetox, o qual vem sendo estudado devido às suas atividades antifúngicas e antibacterianas. Com isso, o presente projeto tecnológico tem como objetivo a preparação de matrizes de PLA e PLA/PEG, pela técnica de eletrospinning, com incorporação do peptídeo Jaburetox e avaliação de suas propriedades antifúngicas e antibacterianas, para potencial aplicação como curativos bioativos. As matrizes poliméricas foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e ângulo de contato. Ensaios antifúngicos e antibacterianos foram realizados, sendo que os melhores resultados foram obtidos contra o patógeno fúngico *Candida albicans* para ambas as matrizes. Dessa forma, as matrizes poliméricas funcionalizadas com Jaburetox apresentam um excelente potencial para aplicação como um curativo bioativo.

Palavras-chave: poli(ácido láctico), poli(etilenoglicol), *electrospinning*, Jaburetox, curativos bioativos.

ABSTRACT

The use of polymers in biomedical applications, particularly in the preparation of wound dressings have aroused great technological interest. Among several existing polymers, polylactic acid (PLA) is one that presents significant growth in the medicinal area due to its biodegradable and biocompatible nature, as well as polyethylene glycol (PEG), which presents a wide utilization in the biomedical area, more specifically in the pharmaceutical field. Wound dressings, in addition to be biodegradable and biocompatible, can still be bioactive, if there is incorporation of some agent with biological properties, such as Jaburetox peptide, which has been studied due to its antifungal and antibacterial activities. Based on this, the present technological project aims to prepare PLA and PLA/PEG matrices using the electrospinning technique, incorporating Jaburetox peptide and evaluating their antifungal and antibacterial properties, in order to potentially apply these matrices as wound healing dressings. The polymer matrices were characterized by thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and contact angle. Antifungal and antibacterial assays were performed, and the better results were observed to the fungal pathogen *Candida albicans*. Therefore, the polymeric matrices functionalized with Jaburetox show an excellent potential in their application as bioactive wound dressings.

Keywords: polylactic acid, polyethylene glycol, electrospinning, Jaburetox, wound healing dressings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação estrutural da unidade repetitiva do PLA.	13
Figura 2: Formas isoméricas para o ácido láctico.	14
Figura 3: Modelo representativo de arranjo experimental da técnica. A ampliação representa a formação do cone de Taylor durante a eletrofiação.	16
Figura 4: Número de patentes publicadas por década, no período de 1968 a 2017, utilizando como palavra-chave “ <i>polylactic acid</i> ”.	19
Figura 5: Exemplo das etapas de um ensaio de UFC.	25
Figura 6: Funcionalização das matrizes com superfície ativada e acoplamento do peptídeo Jaburetox, utilizando os reagentes EDC e NHS. Jaburetox está representado em vermelho, dando destaque para o seu grupamento amino terminal.	28
Figura 7: Potencial antifúngico das matrizes de PLA contendo Jbtx.	29
Figura 8: Potencial antifúngico das matrizes de PLA/PEG contendo Jbtx.	30
Figura 9: Potencial antibacteriano das matrizes de PLA contendo Jbtx.	31
Figura 10: Potencial antibacteriano de matrizes de PLA/PEG contendo Jbtx.	32
Figura 11: Termogramas de TGA das matrizes de PLA e de PLA/PEG em comparação com o polímero PEG.	33
Figura 12: Termograma de DSC (primeiro aquecimento).	34
Figura 13: Termograma de DSC (segundo aquecimento)	35
Figura 14: Imagem da gota sobre a matriz de PLA hidrolisado.	36
Figura 15: Média e desvio padrão dos resultados de ângulo de contato para as matrizes de PLA e PLA/PEG, branco, hidrolisadas, com Jbtx ads e Jbtx coval.	37
Figura 16: Equipamento de eletrofiação.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cotação dos reagentes utilizados na produção das matrizes.	38
Tabela 2: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA com Jaburetox adsorvido.	38
Tabela 3: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA com Jaburetox ligado covalentemente.	39
Tabela 4: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA/PEG com Jaburetox adsorvido.	39
Tabela 5: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA/PEG com Jaburetox ligado covalentemente.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DSC: calorimetria exploratória diferencial

EDC: N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Jbtx: Jaburetox

Jbtx ads: Jaburetox adsorvido

Jbtx coval: Jaburetox covalente

NHS: N-hidróxi succinimida

PBS: Tampão fosfato de sódio salino

PDLA: poli (ácido D-lático)

PDLLA: poli (ácido D, L-lático)

PEG: poli(etileno glicol)

PLA: poli(ácido lático)

PLLA: poli (ácido L-lático)

T_g: temperatura de transição vítrea

TGA: análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 BIOMATERIAIS E POLÍMEROS BIOCOMPATÍVEIS	12
3.2 POLI(ÁCIDO LÁTICO)	13
3.3 BLENDS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) E POLI(ETILENOGLICOL)	14
3.4 PRODUÇÃO DE FIBRAS POR ELETROFIAÇÃO	15
3.5 O PEPTÍDEO JABURETOX	17
4. PATENTES NA ÁREA	19
5. IMPACTO TECNOLÓGICO	21
6. METODOLOGIA	22
6.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO JABURETOX.	22
6.2 PRODUÇÃO DAS MATRIZES DE POR ELETROFIAÇÃO.	23
6.2.1 Preparação da solução de PLA 12 %	23
6.2.2 Preparação da solução de PLA/PEG	23
6.2.3 Obtenção das matrizes por eletrofiação	23
6.3 TRATAMENTO DAS MATRIZES PARA INTERAÇÃO E INCORPORAÇÃO DO PEPTÍDEO JABURETOX.	24
6.3.1 Hidrólise da superfície das matrizes	24
6.3.2 Incorporação física do peptídeo Jaburetox na superfície das matrizes	24
6.3.3 Funcionalização da superfície e incorporação química do peptídeo Jaburetox	24
6.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO	25

6.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO	26
6.6	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	26
6.7	ANÁLISE POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	26
6.8	DETERMINAÇÃO DE ÂNGULO DE CONTATO	27
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
7.1	ATIVAÇÃO DAS MATRIZES E INCORPORAÇÃO DO PEPTÍDEO À MATRIZ	28
7.2	POTENCIAL ANTIFÚNGICO	29
7.3	POTENCIAL ANTIBACTERIANO	30
7.4	COMPORTAMENTO TÉRMICO	32
7.5	AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE.	36
8.	CUSTOS DO PROJETO	38
9.	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. APRESENTAÇÃO

O crescente uso dos polímeros tem requerido cada vez mais empregos inovadores devido à gama de possíveis aplicações desses compostos. Na área biomédica tem-se buscado explorar materiais biocompatíveis e biodegradáveis, como o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(etilenoglicol) (PEG), e ainda aliar suas interessantes propriedades com compostos de interesse biotecnológico.

O PLA é um polímero de ácido láctico, obtido sinteticamente, com propriedade de ser biodegradado a produtos atóxicos como CO₂, ácido láctico e água, e ser também biocompatível, propriedade que tem sido bastante explorada na área de implantes, por exemplo. O PEG é um polímero de etilenoglicol, anfifílico e que tem demonstrado propriedades promissoras, como por exemplo, na área biomédica, sendo empregado na utilização de liberação controlada de fármacos. As propriedades do PEG também são exploradas junto as do PLA em blendas poliméricas.

O uso conjunto desses polímeros com compostos bioativos pode resultar em excelentes produtos para área biomédica. Um peptídeo bioativo de grande interesse biotecnológico, denominado Jaburetox, apresenta propriedades antifúngicas e antibacterianas, sendo derivado de uma proteína tóxica presente em sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*).

Neste contexto, a proposta deste projeto tecnológico é a produção de fibras de PLA e da blenda PLA/PEG pelo método de eletrofiação - uma técnica para produção de micro ou nanofibras, de baixo custo e de fácil manuseio - além da incorporação do peptídeo Jaburetox e da avaliação do potencial antifúngico e antibacteriano das matrizes, visando sua aplicação como curativo bioativo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver matrizes de poli(ácido láctico) através de eletrofiação e incorporar o peptídeo Jaburetox a essa matriz de forma física (adsorvido) e química (ligado covalentemente). Avaliar o potencial antifúngico e antibacteriano destas matrizes, visando sua aplicação como um curativo bioativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir o peptídeo recombinante Jaburetox na bactéria *Escherichia coli* e purificá-lo através de técnicas cromatográficas;
- Preparar matrizes de poli(ácido láctico) e a blenda poli(ácido láctico)-poli(etilenoglicol) pela técnica de eletrofiação;
- Hidrolisar a superfície das matrizes através de um tratamento alcalino, aumentando a disponibilidade de funções orgânicas reativas à funcionalização;
- Incorporar o peptídeo Jaburetox às matrizes de forma física (adsorvido) e química (ligado covalentemente);
- Caracterização físico-química das matrizes;
- Realizar ensaios microbiológicos para avaliar o potencial antifúngico e antibacteriano das matrizes funcionalizadas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BIOMATERIAIS E POLÍMEROS BIOCAMPATÍVEIS

A necessidade de materiais mais duráveis para utilização cotidiana fez com que os plásticos, com diversas aplicações e baixo custo, tivessem um grande aumento no seu consumo no mundo todo, conseqüentemente, elevando a quantidade de resíduos que demoram para se decompor (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Recentemente, a produção e a utilização de polímeros biodegradáveis vêm sendo uma alternativa, pois sua degradação é resultado da ação de micro-organismos e, sob condições favoráveis, pode ocorrer em semanas ou meses (BRITO et al., 2011).

As principais aplicações para esse tipo de polímero incluem embalagens, não-tecidos descartáveis, produtos higiênicos, bens consumíveis (FECHINE, 2013) e materiais hospitalares, dentre eles curativos bioativos.

Os polímeros possuem potencial significativo uma vez que apresentam grande diversidade química, podendo dar origem a materiais com múltiplas propriedades físicas, químicas e mecânicas (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Para aplicação como curativos, os polímeros biodegradáveis devem ser biocompatíveis, permitindo maior interação com a lesão, sem causar reações imunogênicas (STEFFENS et al., 2015), podendo ainda conter fármacos incorporados, promovendo, dessa forma, sua liberação gradual. Do ponto de vista de ciência básica, a capacidade de modular as propriedades químicas do biomaterial para apresentar propriedades materiais únicas é infinita, mas exige tempo e recursos financeiros significativos para chegar ao produto final. À medida que os biomateriais são aplicados no cenário clínico, surgem numerosos problemas que não podem ser adequadamente identificados e abordados em experimentos *in vitro* e com modelos *in vivo* anteriormente à sua aplicação (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

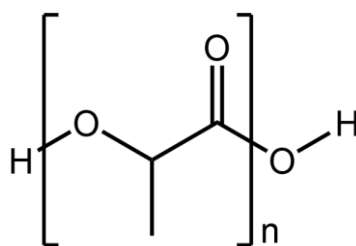
Por fim, avaliando o impacto da divulgação de estudos científicos sobre o uso de biocurativos por pacientes com doenças crônicas, viu-se que a procura por esse produto, após a divulgação na mídia foi, em dez dias, oito vezes maior que a procura por ano antes dessa divulgação, destacando a importância da reavaliação do

tratamento de pacientes com feridas crônicas, com uma visão mais sistêmica de saúde pública (COTRIM; DA SILVA; COTRIM, 2013).

3.2 POLI(ÁCIDO LÁTICO)

O poli(ácido lático), ou PLA, (Figura 1) é um poliéster de cadeia aberta, cujas unidades repetitivas são derivadas do ácido lático (ácido 2-hidroxiopropanoico). É um polímero termoplástico, hidrofóbico, biocompatível e biodegradável, derivado de fontes naturais como amidos e açúcares (RADĚR, 2016) ou através de síntese química.

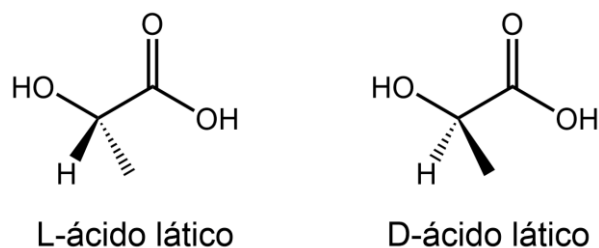
Figura 1: Representação estrutural da unidade repetitiva do PLA.



O PLA é biodegradado em subprodutos atóxicos (ácido lático, CO₂ e água) presentes no metabolismo de animais e de micro-organismos. Dessa forma, este polímero possui potencial para aplicação nas áreas médicas e farmacêuticas, principalmente como dispositivos temporariamente implantáveis (DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004).

A unidade repetitiva do PLA, o ácido lático é um hidroxiácido contendo um carbono assimétrico que pode existir em duas configurações opticamente ativas (Figura 2) ou na forma de mistura racêmica. Ambos os enantiômeros D- e L- são simultaneamente produzidos a partir de fermentação, de uma fonte de carboidratos, realizada por bactérias. Contudo, quando sintetizado através de métodos químicos, uma mistura racêmica é obtida (DATTA; HENRY, 2006).

Figura 2: Formas isoméricas para o ácido láctico.



As propriedades do PLA, como temperatura de fusão e de transição vítrea, cristalinidade e resistência mecânica, dependem da proporção de seus isômeros ópticos presentes no polímero. Polímeros contendo uma composição de isômero L- em sua estrutura superior a 93 % são semicristalinos, enquanto que entre 50-93 % desta composição são estritamente amorfos. Além disso, a temperatura de fusão pode variar de 130 °C a 180 °C enquanto a temperatura de transição vítrea pode variar de 50 °C a 80 °C. As propriedades mecânicas do PLA também podem mudar significativamente com o aumento da sua cristalinidade (GAMBA, 2013).

Os dois isômeros do ácido láctico podem produzir materiais distintos: o poli (ácido D-lático) (PDLA), um material cristalino com uma estrutura de corrente regular; o poli (ácido L-lático) (PLLA), que é semicristalino, também com uma estrutura de corrente regular; e o poli (ácido D, L-lático) (PDLLA) que é amorfo. PDLA, PLLA e PDLLA são solúveis em solventes comumente utilizados incluindo benzeno, clorofórmio, dioxano, dentre outros e são suscetíveis à degradação salina, tendo tempos de meia-vida, à 37 °C, de 4 a 6 meses para PDLA e PLLA, e de 2 a 3 meses para o PDLLA (XIAO et al., 2012).

3.3 BLENDA DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) E POLI(ETILENOGLICOL)

O PLA é um polímero hidrofóbico, instável em condições úmidas e biodegradável em produtos atóxicos. Entretanto, sua degradação *in vivo* ocorre devido a processos inflamatórios que não são desejados na recuperação médica, principalmente em função da sua hidrofobicidade (DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004).

Através da modificação química do PLA com polietilenoglicol (PEG), um copolímero anfifílico é formado, o qual é mais susceptível à degradação por hidrólise, com maior adsorção de proteínas, células, e/ou tecidos e, portanto, menos

susceptível a desencadear reações adversas (DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004). Diversas pesquisas têm incorporado o PEG com o objetivo de diminuir a hidrofobicidade de outros compostos, por exemplo, incorporado à lipases ou adsorvendo para distribuição de nanopartículas *in vivo* (DE JAEGHERE et al., 1999; ZACCHIGNA et al., 1998). Evidências de que o PEG é suscetível à degradação oxidativa em condições biologicamente relevantes já foram apresentadas (ULBRICHT; JORDAN; LUXENHOFER, 2014b), tornando, assim, o uso deste polímero ainda mais promissor.

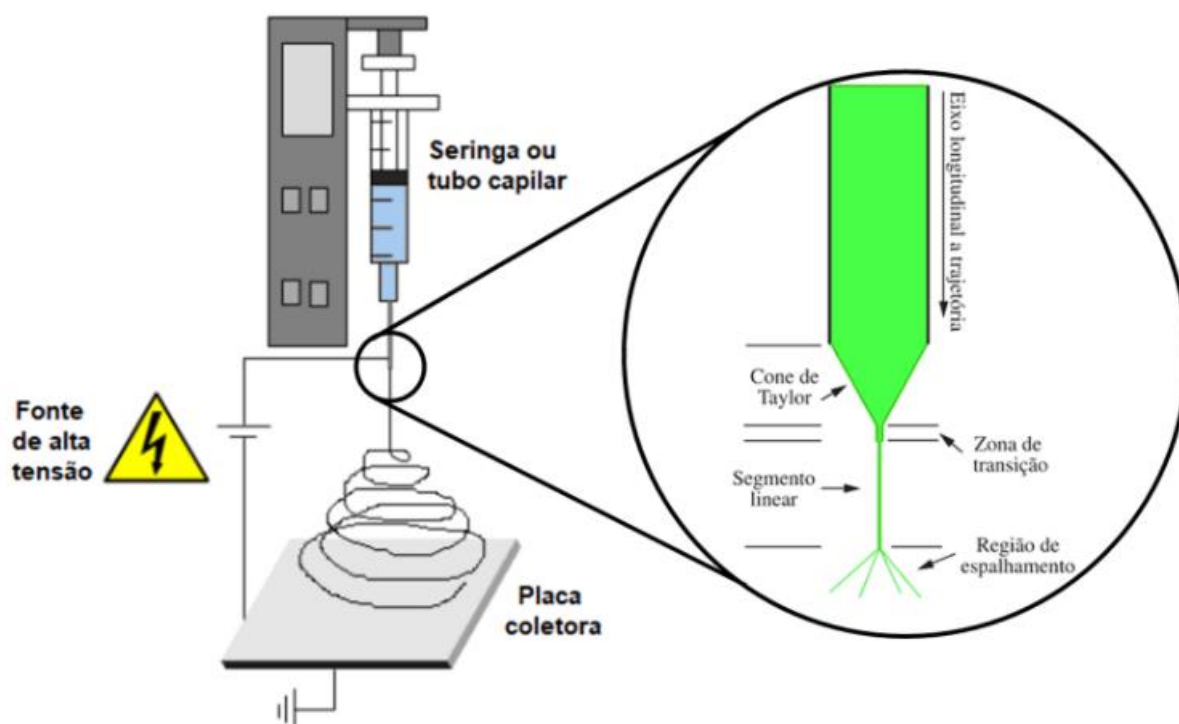
Nanopartículas produzidas a partir de PLA e da blenda PLA/PEG para administração intranasal do fármaco Zidovudina (AZT), um antiviral utilizado na terapia contra HIV (vírus da imunodeficiência humana), foram produzidas pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente. O estudo demonstrou que o PEG tem um papel importante na eficiência de encapsulação do fármaco, sendo que a quantidade de AZT encapsulada aumentou proporcionalmente em relação ao aumento de concentração de PEG na blenda. O PEG mostrou ser de grande importância para o aumento da biodisponibilidade do fármaco, visto que suas características hidrofílicas ajudam na estabilidade do sistema, prevenindo agregação e melhorando o transporte das nanopartículas no meio biológico (MAINARDES; KHALIL; GREMIÃO, 2010; SANTOS et al., 2015).

3.4 PRODUÇÃO DE FIBRAS POR ELETROFIAÇÃO

A importância no desenvolvimento de matrizes não depende apenas do polímero escolhido, mas também da técnica empregada na sua fabricação (GAMBA, 2013). A técnica de produção de fibras por eletrospinning (em inglês, *electrospinning*) é econômica, eficiente e versátil, podendo ser produzidas fibras tridimensionais em escala micro e nanométrica (NICOSIA et al., 2015).

O método é simples e direto, no qual uma solução de polímero é bombeada à uma taxa constante através de uma seringa ou um tubo capilar conectado à uma fonte de alta tensão e coletada sobre uma placa metálica (FELGUEIRAS; AMORIM, 2017) (Figura 3).

Figura 3: Modelo representativo de arranjo experimental da técnica. O detalhe representa a formação do cone de Taylor durante a eletrofiação.



Fontes: FELGUEIRAS; AMORIM, 2017; COSTA et al., 2012 adaptados.

Para maiores detalhes do processo, o jato eletrofiado pode ser dividido em quatro regiões distintas (detalhe da Figura 3). Uma gota sujeita a um potencial elétrico crescente é estirada até que tende a um formato cônico, chamado cone de Taylor, um maior estiramento forma a zona de transição e então o segmento linear. A estabilidade do jato é mantida a curtas distâncias (2 - 4 cm) do cone de Taylor, devido às tensões que o jato está submetido. Em maiores distâncias, as tensões causam uma instabilidade no jato e levam à região de espalhamento (COSTA et al., 2012).

As propriedades da solução, incluindo a tensão superficial, peso molecular do polímero, concentração, viscosidade, volatilidade e condutividade, têm uma importante influência no processo de *electrospinning* e na morfologia das fibras. A tensão superficial desempenha um importante papel na formação de gotas ao longo da extensão da fibra. A viscosidade da solução e suas propriedades elétricas determinam a extensão do alongamento do jato fibroso que, por sua vez, têm influência sobre o diâmetro das fibras resultantes. Contudo, os efeitos das propriedades da solução são difíceis de isolar, uma vez que a alteração de um

parâmetro, pode afetar as outras propriedades da solução (PORTELA; ROCHA; MÉNDEZ, 2010).

O ajuste dos parâmetros do processo, tais como campo elétrico aplicado, distância de trabalho e velocidade de injeção da solução, é essencial para a obtenção de fibras com as morfologias e diâmetros desejados (COSTA et al., 2012). A distância entre a ponta do bico injetor e o coletor, ou seja, a distância de trabalho deve ter um valor mínimo, para garantir a total evaporação do solvente e um valor máximo, para que o campo elétrico seja efetivo na estabilização do cone de Taylor e conseqüentemente, na formação das nanofibras. Um aumento na velocidade de injeção da solução polimérica pode levar à formação de gotas, devido ao tempo insuficiente para evaporar o solvente (RÄDER, 2016).

Os parâmetros ambientais como temperatura e umidade, também podem influenciar na formação e na morfologia das fibras. Dependendo da natureza química do polímero, o aumento da umidade relativa pode causar uma diminuição ou um aumento no diâmetro médio das fibras (COSTA et al., 2012).

3.5 O PEPTÍDEO JABURETOX

A Canatoxina é uma proteína tóxica isolada de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*). A toxina apresenta atividade inseticida contra algumas classes de insetos, porém nem todos são susceptíveis à mesma, pois sua atividade biológica é dependente da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa, denominado Pepcanatox. Esta hidrólise da proteína ocorre por ação de determinadas enzimas digestivas e por isso, nem todos os insetos são susceptíveis a essa proteína, já que seu arsenal digestivo é diversificado (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2000, FOLLMER et al., 2001).

Baseado na sequência parcial de aminoácidos do Pepcanatox e usando como molde a sequência de nucleotídeos de outra isoforma de urease de *C. ensiformis* (JBURE-II), foi possível a obtenção de um peptídeo recombinante, produzido por *Escherichia coli*, o Jaburetox-2Ec, com ampla atividade inseticida, incluindo ação contra insetos não susceptíveis à Canatoxina (MULINARI et al., 2007). Uma nova variante foi clonada e denominada apenas Jaburetox, a qual apresentou atividade antifúngica contra fungos filamentosos e leveduras, mantendo a atividade inseticida

já apresentada pelo primeiro peptídeo recombinante (POSTAL et al., 2012; MARTINELLI et al., 2014).

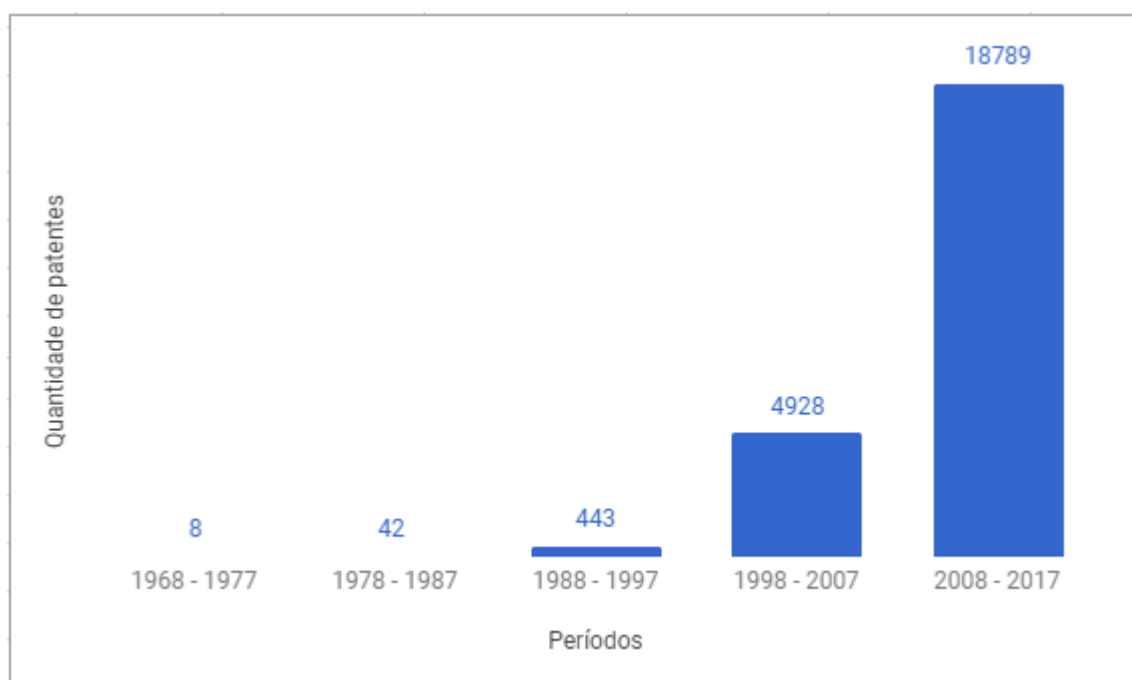
A estrutura tridimensional do Jaburetox foi elucidada por Ressonância Magnética Nuclear, caracterizando este peptídeo como da família das proteínas intrinsecamente desordenadas. Essa característica foi confirmada pela análise da sua estrutura secundária por Dicroísmo Circular, com a qual foi possível observar a termoestabilidade deste peptídeo. Jaburetox não apresentou alteração estrutural, mediante aumento de temperatura de até 90 °C e também é estável perante a uma ampla faixa de pH (Lopes et al., 2015). Recentemente, a atividade antibacteriana deste peptídeo foi descrita contra bactérias de importância clínica (BECKER-RITT; PORTUGAL; CARLINI, 2017). Dessa forma, este peptídeo apresenta um grande potencial biotecnológico, tanto no que diz respeito às suas atividades biológicas, quanto às suas características estruturais e de estabilidade, o que favorece, assim, a incorporação do mesmo em biomateriais.

4. PATENTES NA ÁREA

O estudo de patentes foi realizado na base de dados internacional *Derwent Innovations Index*, no dia 18 de dezembro de 2017. O período pesquisado foi de 1968 à 2017, dividido em décadas, sendo apresentados ao longo do tópico somente os períodos com publicações existentes. Antes de 1968 não há publicações nos tópicos pesquisados.

A primeira pesquisa foi apenas sobre o PLA, usando como palavra-chave “*polylactic acid*” no campo tópico. Na Figura 4 encontra-se o número de patentes publicadas.

Figura 4: Número de patentes publicadas por década, no período de 1968 a 2017, utilizando como palavra-chave “*polylactic acid*”.



Fonte: Derwent Innovations Index.

Analisando a figura acima podemos ver na última década - 2008 a 2017 - um expressivo aumento na quantidade de publicações de patentes com PLA, o que demonstra o crescente interesse de aplicação deste polímero em diversas áreas de pesquisa.

Para melhor compreensão do impacto tecnológico do presente trabalho, uma pesquisa mais restrita foi realizada, buscando dimensionar a quantidade de patentes que possuem, além do PLA, os demais componentes chave deste trabalho.

Buscando no campo tópico as palavras “*polylactic acid*” e “*electrospinning*”, foram encontradas publicações apenas nas duas últimas décadas. No período de 1998 a 2007 houve um total de 6 depósitos de patentes, já na última década, entre 2008 e 2017, foram depositadas 75 patentes, o que está relacionado não só com o aumento do interesse no PLA, mas também com o crescente emprego da técnica de eletrofição para obtenção de fibras em escala micro ou nanométrica.

Na pesquisa das palavras “*polylactic acid*” e “*biotechnology*”, foi encontrado um pequeno número de patentes depositadas, também apenas nas duas últimas décadas, com um total de 5 depósitos entre 1998 e 2007, e 13 publicações entre 2008 e 2017.

Ao pesquisar, no campo tópico, as palavras “*polylactic acid*”, “*electrospinning*” e “*biotechnology*”, foi encontrado apenas um depósito de patente, de número JP2011208286-A. Essa patente consiste na produção de fibras de seda, com adição de polioxiácido (copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e homopolímeros de ácido láctico ou ácido glicólico) e/ou polissacarídeos (quitosana, pululana, gelana, pectina celulose hidrolisada) para diversas aplicações como biotecnologia, energia e uso biomédico. Pesquisando no campo tópico, as palavras “*polylactic acid*”, “*electrospinning*” e “*wound healing dressing*”, uma patente foi encontrada, de número CN107261195-A. A invenção consiste na produção de uma rede eletrofiada de biomateriais antibacterianos, obtida pelo uso de copolímero de ácido glicólico e ácido láctico (PLGA), hidroxipropil-quitosana, policaprolactona, quitosana medicinal, colágeno tipo I, mostrando ser um produto diferente do apresentado nesse trabalho.

Por fim, ao pesquisar, no campo tópico, as palavras “*polylactic acid*”, “*electrospinning*”, “*wound healing dressing*” e “*polyethylene glycol*” não foram encontrados registros, demonstrando a inovação deste projeto tecnológico, bem como a possibilidade de um futuro depósito de patente.

5. IMPACTO TECNOLÓGICO

A constante busca por inovações menos agressivas ao meio ambiente motivou a busca por polímeros biodegradáveis para o desenvolvimento do trabalho.

Matrizes com potencial antifúngico e antibacteriano podem ser empregadas como revestimento interno de embalagens, ajudando a evitar a contaminação do produto, devido ao desenvolvimento de micro-organismos.

Curativos bioativos vêm sendo estudados para promover um tratamento diferenciado a pacientes com ferimentos de difícil cicatrização, principalmente pacientes diabéticos, que estão frequentemente sujeitos a amputações, em função de feridas de difícil cicatrização.

A presente monografia consiste na preparação de matrizes poliméricas para potencial uso como curativos bioativos, a partir dos polímeros biocompatíveis e biodegradáveis PLA e PEG com a incorporação do peptídeo antifúngico e antibacteriano Jaburetox.

6. METODOLOGIA

6.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO JABURETOX.

Células da bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3)-RIL contendo o plasmídeo pET23a-Jaburetox foram cultivadas em 20 mL de caldo LB (Luria Bertani), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloranfenicol. A cultura foi realizada por 16 h a 37 °C e 200 rpm. Todo o conteúdo foi inoculado em 1 L de meio de autoindução (triptona 10 g.L^{-1} , extrato de levedura 5 g.L^{-1} , glicerol 5 g.L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,3 g.L^{-1} , KH_2PO_4 6,8 g.L^{-1} , Na_2HPO_4 7,1 g.L^{-1} , glicose 0,5 g.L^{-1} e lactose 2 g.L^{-1} , com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloranfenicol) e cultivado a 37 °C, 200 rpm, até absorbância a 600 nm de aproximadamente 0,7. As condições de indução foram 16 h, 20 °C, 200 rpm. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 8000 x g durante 10 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 30 mL de tampão A (tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7,5) e lisadas em sonicador de ultrassom por 20 ciclos de 1 minuto com frequência de 99 Hz. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 15.000 x g por 40 min a 4 °C e adicionado à uma coluna de afinidade Chelating Sepharose (GE Healthcare) carregada com solução de NiCl_2 0,2 M, previamente equilibrada com tampão A. As proteínas não retidas foram lavadas utilizando dez volumes de tampão A. Foi efetuada lavagem da coluna com 10 volumes de tampão B (tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM e imidazol 70 mM) e a eluição foi realizada com tampão C (tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM). A fração rica em Jaburetox foi transferida para uma cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Hiloal Superdex 200 26/60 prep grade, pré-equilibrada com tampão D (fosfato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM e de tris (2-carboxietil) fosfina – TCEP 1 mM) montada em um sistema Äkta Purifier (GE Life Technologies). A cromatografia foi realizada a um fluxo de 2,5 mL.min^{-1} e frações de 5 mL foram coletadas. A pureza da amostra foi verificada através de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida desnaturante com SDS) 15 % e a concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (FRUTTERO et al., 2016; , BRADFORD, 1976). A proteína utilizada para incorporação nas matrizes foi dialisada exaustivamente em tampão PBS (NaH_2PO_4 20 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5). A produção e a purificação

do peptídeo Jaburetox foram realizados no Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

6.2 PRODUÇÃO DAS MATRIZES DE POR ELETROFIAÇÃO.

6.2.1 Preparação da solução de PLA 12 %

Uma solução de PLA 12 % (m/v) foi preparada a partir da solubilização de PDLLA comercial ($M_n = 120.000 \text{ g.mol}^{-1}$, 92 % isômero L e 8 % isômero D) em uma mistura dos solventes diclorometano:etanol, na proporção 4:1 em volume, com a utilização de balão volumétrico. A solução ficou em repouso por 24 h para completa solubilização do polímero (GAMBA, 2013).

6.2.2 Preparação da solução de PLA/PEG

Uma mistura de PDLLA e PEG (m/m), na proporção de 9:1, foi dissolvida, em balão volumétrico, com diclorometano:etanol (na proporção 4:1), de modo a se obter uma solução com 12 % (m/v) dos polímeros. A solução ficou em repouso por 24 h para completa solubilização dos polímeros, como foi realizado para a solução contendo apenas PLA.

6.2.3 Obtenção das matrizes por eletrofiação

Diferentes matrizes foram obtidas conforme a solução polimérica empregada. As soluções utilizadas estão descritas nos itens 6.2.1 e 6.2.2.

Uma seringa de vidro de 10 mL foi preenchida com solução polimérica e adaptada ao aparelho de eletrofiação. A solução foi ejetada a uma vazão de $4,4 \text{ mL.h}^{-1}$, através de uma agulha 0,7 mm de diâmetro. Entre a ponta da agulha e o coletor estático, separados por uma distância de 15 cm, foi aplicada uma diferença de potencial de aproximadamente 14 kV. O tempo de deposição do polímero sobre a placa coletora foi de 40 min. A sala estava à 22 °C com 66 % de umidade. A preparação das matrizes foi realizada no Laboratório Poli-BIO, do Instituto de Química da UFRGS.

6.3 TRATAMENTO DAS MATRIZES PARA INTERAÇÃO E INCORPORAÇÃO DO PEPTÍDEO JABURETOX.

6.3.1 Hidrólise da superfície das matrizes

As matrizes obtidas no item 6.2.2 foram cortadas em quadrados de 1 cm² e esses colocados separados em placas de poços. A superfície das matrizes de PLA foi coberta com solução de NaOH 0,5 M, ficando em contato por 25 min. Nas matrizes de PLA/PEG foi empregada uma solução de NaOH 0,1 M por 20 min; em seguida, as matrizes foram lavadas exaustivamente com água destilada e secas em estufa por 24 h à 37 °C.

6.3.2 Incorporação física do peptídeo Jaburetox na superfície das matrizes

Às matrizes com as superfícies hidrolisadas foram adicionados 500 µL de Jaburetox, na concentração de 33 µM (considerando o peptídeo monomérico, com 11.000 Da de massa molar, ou concentração de 0,363 mg/mL) em tampão PBS, ficando em contato por 24 h. Após esse período as matrizes foram lavadas com água destilada e secas em estufa à 37 °C.

6.3.3 Funcionalização da superfície e incorporação química do peptídeo Jaburetox

Um mL de uma solução contendo 2 mg.mL⁻¹ de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e 1,2 mg.mL⁻¹ de N-hidróxi succinimida (NHS) solubilizados em PBS foi colocado em contato com as matrizes de superfície hidrolisadas durante 3 h. Após esse tempo, retirou-se o excesso de solução das matrizes. A incorporação do Jaburetox a essas matrizes funcionalizadas se procedeu como no item 6.3.2.

As matrizes de PLA e de PLA/PEG sem nenhum tratamento (branco), com Jaburetox incorporado fisicamente (Jbtx ads) e com Jaburetox incorporado

quimicamente (Jbtx coval) compõem o grupo de amostras que serão empregadas nos ensaios biológicos.

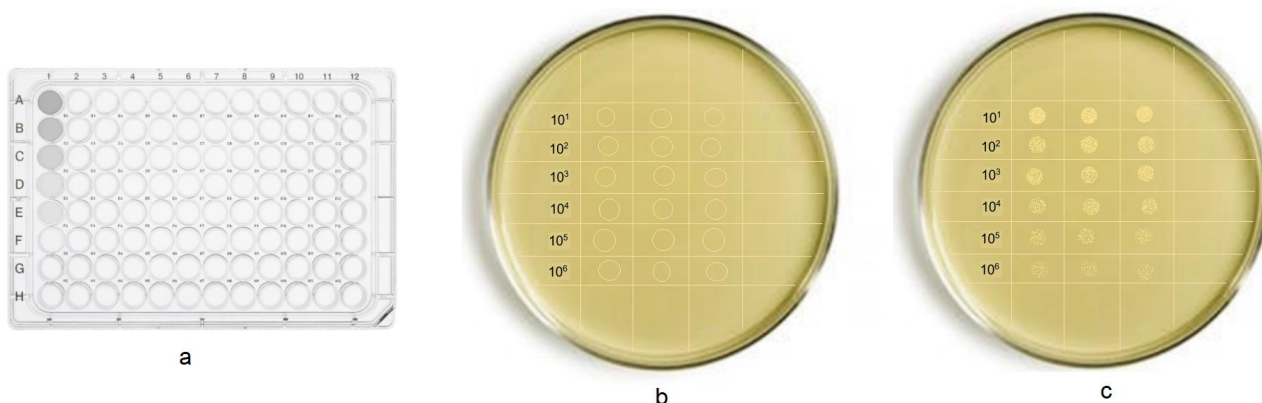
6.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO

O potencial antifúngico foi avaliado com a levedura *Candida albicans* CE022 cultivada em placas de ágar Sabouraud por 24 h à 28 °C.

Uma suspensão da levedura contendo 10^4 células.mL⁻¹ foi preparada e as células foram contadas em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. As matrizes em triplicata foram esterilizadas em luz ultravioleta em capela de fluxo laminar, por 10 min de cada lado e estas foram distribuídas em placa de 12 poços. Um mL desta suspensão fúngica foi colocado em cada replicata da amostra, deixando-se em cultivo por 24 h a 28 °C. Após o cultivo fez-se o ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC) que será detalhado abaixo.

O ensaio se deu da seguinte forma: o meio de cultivo de cada poço, após incubação, foi homogeneizado e alíquotas de 20 µL foram diluídas em solução salina 0,85 % de NaCl de 10 em 10 vezes, até o fator de diluição 10^6 . De cada diluição, uma alíquota de 20 µL foi cultivada em ágar Sabouraud em triplicata. Após 24 h contou-se o número de colônias desenvolvidas em cada replicata. Um exemplo das etapas do ensaio encontra-se na Figura 5.

Figura 5: Exemplo das etapas de um ensaio de Unidades Formadoras de Colônia.



a - diluição da solução que contém o micro-organismo estudado; b - aplicação das diluições em meio de cultura; c - colônias desenvolvidas após incubação.

6.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

O potencial antibacteriano foi avaliado com a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cultivada em placas de ágar LB por 24 h à 37 °C.

Foi preparada uma suspensão contendo 10^8 células.mL⁻¹ de bactéria em solução salina, sendo esta suspensão padronizada em espectrofotômetro (absorbância a 600 nm de 0,08 a 0,1). Com as amostras distribuídas em placa de 12 poços, previamente esterilizadas como no item 6.5, 1 mL dessa suspensão foi colocado em cada replicata da amostra, deixando-se em cultivo por 24 h a 37 °C. Após o cultivo, fez-se o ensaio de UFC.

Para esse ensaio de UFC se procedeu como descrito no item 6.4, entretanto a diluição foi até 10^8 vezes e a incubação foi realizada em ágar LB, a 37 °C.

6.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada nas amostras branco de PLA, PEG e PLA/PEG. As medidas foram realizadas em um aparelho TGA Q50 (*TA Instruments* MAT, UFRGS). Para cada análise, cerca de 6 mg de cada amostra foi acondicionada em um porta-amostra de platina e submetidas a uma rampa de aquecimento de 20 °C/min de 30 a 700 °C, em atmosfera de nitrogênio.

6.7 ANÁLISE POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada apenas nas amostras branco. As medidas foram efetuadas em aparelho modelo Q20 (*TA Instruments*). Usou-se em torno de 6 mg de amostra em cada análise, as quais foram pesadas em painéis de alumínio e aquecidas de -60 °C a 200 °C, a uma taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹. Após o resfriamento até -60 °C (taxa de 20 °C.min⁻¹), as amostras foram aquecidas novamente até 220 °C, empregando a mesma taxa de aquecimento. Todas as varreduras foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio.

6.8 DETERMINAÇÃO DE ÂNGULO DE CONTATO

Para a determinação da hidrofiliidade/hidrofobicidade das matrizes foram analisados os ângulos de contato das amostras de PLA e PLA/PEG branco, PLA e PLA/PEG hidrolisadas, Jbtx ads e Jbtx coval. Os ensaios foram realizados, em um goniômetro de ângulo de contato (DAS, Kruss), pelo método da adição de uma gota de água deionizada de 3 μ L sobre a superfície da amostra e capturando a imagem diretamente com uma câmera digital acoplada ao sistema e conectada ao computador. A imagem foi capturada em até 1 min após a adição da gota e então foi medido o ângulo de contato. Esse ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados biológicos e de ângulo de contato foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença significativa entre as amostras foi determinada pelo teste de Tukey, com $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.0.1 para Windows.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

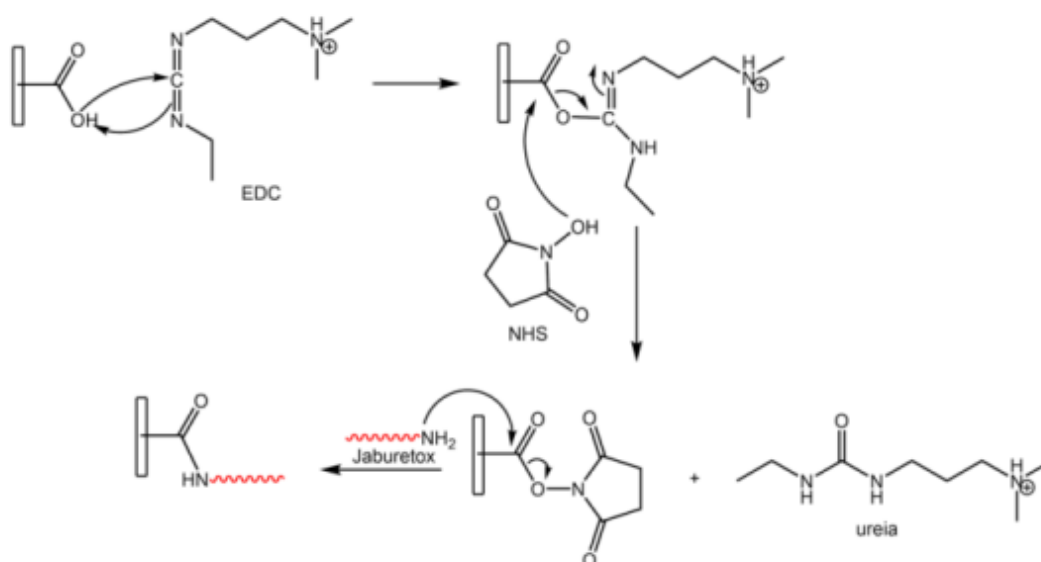
7.1 ATIVAÇÃO DAS MATRIZES E INCORPORAÇÃO DO PEPTÍDEO À MATRIZ

Uma incorporação química, seja por adsorção ou ligações covalentes, necessita de etapas reacionais para funcionalização da matriz, deixando-a disponível para a reação com o composto bioativo.

Uma primeira etapa de ativação da superfície das matrizes foi realizada com uma hidrólise alcalina, deixando disponível um grupamento de ácido carboxílico, o que permitiu a interação intermolecular com o peptídeo, de modo a se obter uma incorporação por adsorção.

Para as matrizes com incorporação via ligação covalente outras etapas reacionais, além da hidrólise, foram necessárias, chamadas de reações de acoplamento. A reação de acoplamento (Figura 6) foi realizada com EDC/NHS seguida pela reação de substituição com o Jaburetox.

Figura 6: Funcionalização das matrizes com superfície ativada e acoplamento do peptídeo Jaburetox, utilizando os reagentes EDC e NHS. Jaburetox está representado em vermelho, dando destaque para o seu grupamento amino terminal.



7.2 POTENCIAL ANTIFÚNGICO

Conforme citado, o potencial antifúngico foi avaliado contra *Candida albicans*, em ensaio de UFC. Este fungo foi utilizado como modelo para o ensaio antifúngico, em razão de sua crescente importância como patógeno médico.

C. albicans é um fungo leveduriforme que faz parte da microbiota humana, sendo encontrado em várias partes do corpo. Contudo, este micro-organismo pode causar infecções superficiais e até mesmo sistêmicas, que podem ser fatais. Nas últimas décadas, a ocorrência de infecções por *C. albicans* tem aumentado, principalmente entre pacientes imunocomprometidos. A habilidade de formar biofilmes, por esta levedura, também, é de importância clínica, uma vez que estas comunidades são mais resistentes a ação de agentes antifúngicos e às defesas naturais dos pacientes. Estes biofilmes podem ser encontrados em dispositivos médicos, por exemplo, muitas vezes agravando o estado de saúde do paciente (BELATO et al, 2018).

Os resultados obtidos com as matrizes de PLA e PLA/PEG estão demonstradas nas Figuras 7 e 8.

Figura 7: Potencial antifúngico das matrizes de PLA contendo Jaburetox.

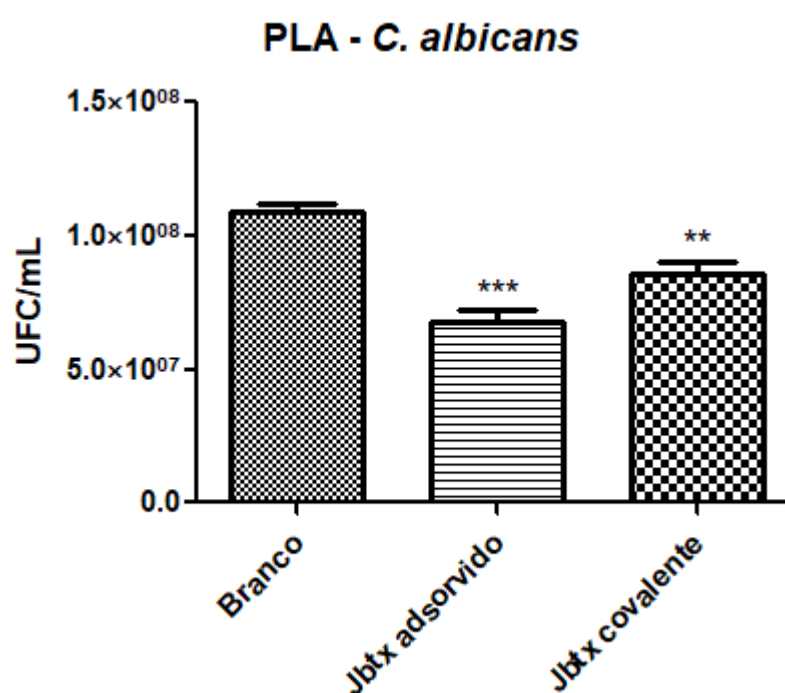
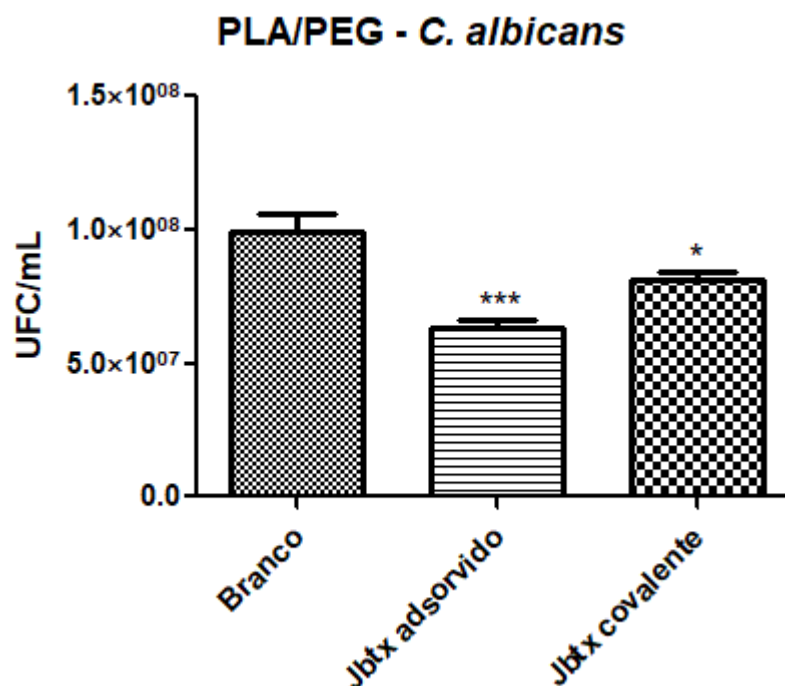


Figura 8: Potencial antifúngico das matrizes de PLA/PEG contendo Jaburetox.



Ocorreu inibição do crescimento fúngico nas matrizes PLA e PLA/PEG contendo Jaburetox, tanto adsorvido quanto ligado covalentemente, corroborando os resultados obtidos anteriormente com o peptídeo isolado contra *C. albicans* (POSTAL et al., 2012). Houve maior inibição do crescimento fúngico nas matrizes com Jaburetox adsorvido, tanto em matrizes à base de PLA como PLA/PEG, e isto pode se dar pelo fato deste não estar quimicamente ligado à matriz, sendo facilmente lixiviado para o meio de cultura, tornando, assim, o meio homogêneo com Jaburetox. A matriz com Jbtx covalente, possui esse peptídeo ligado quimicamente, o que permite ao peptídeo atuar apenas na fração de meio de cultura que está diretamente em contato. Como as amostras não recobriam todo o poço, haviam espaços não cobertos pela matriz, onde possivelmente houve o maior crescimento fúngico.

7.3 POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Conforme citado, o potencial antibacteriano foi avaliado com a bactéria *Staphylococcus aureus*, em ensaio de UFC. *S. aureus* é um importante agente patogênico em infecções hospitalares, sendo, assim, considerado um problema de

Saúde Pública. É responsável por manifestações clínicas incluindo doenças de pele, endocardite, pneumonia e septicemia. A eliminação desta bactéria é difícil, uma vez que linhagens resistentes a antibióticos constantemente aparecem. Além disso, algumas linhagens também são produtoras de biofilmes microbianos (BELATO et al, 2018).

As Figuras 9 e 10 apresentam os resultados obtidos nos ensaios com as matrizes PLA e PLA/PEG contra *S. aureus*.

Figura 9: Potencial antibacteriano das matrizes de PLA contendo Jaburetox.

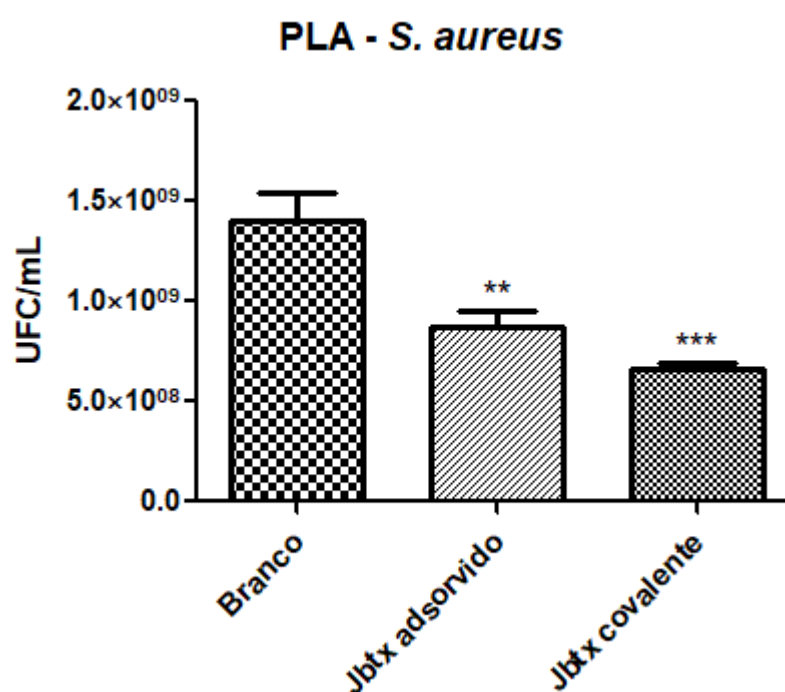
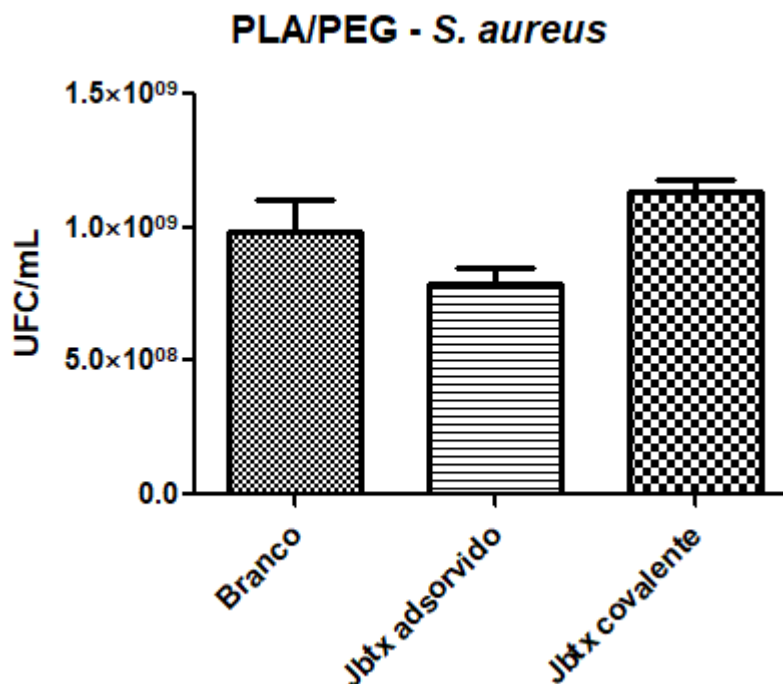


Figura 10: Potencial antibacteriano de matrizes de PLA/PEG contendo Jaburetox.



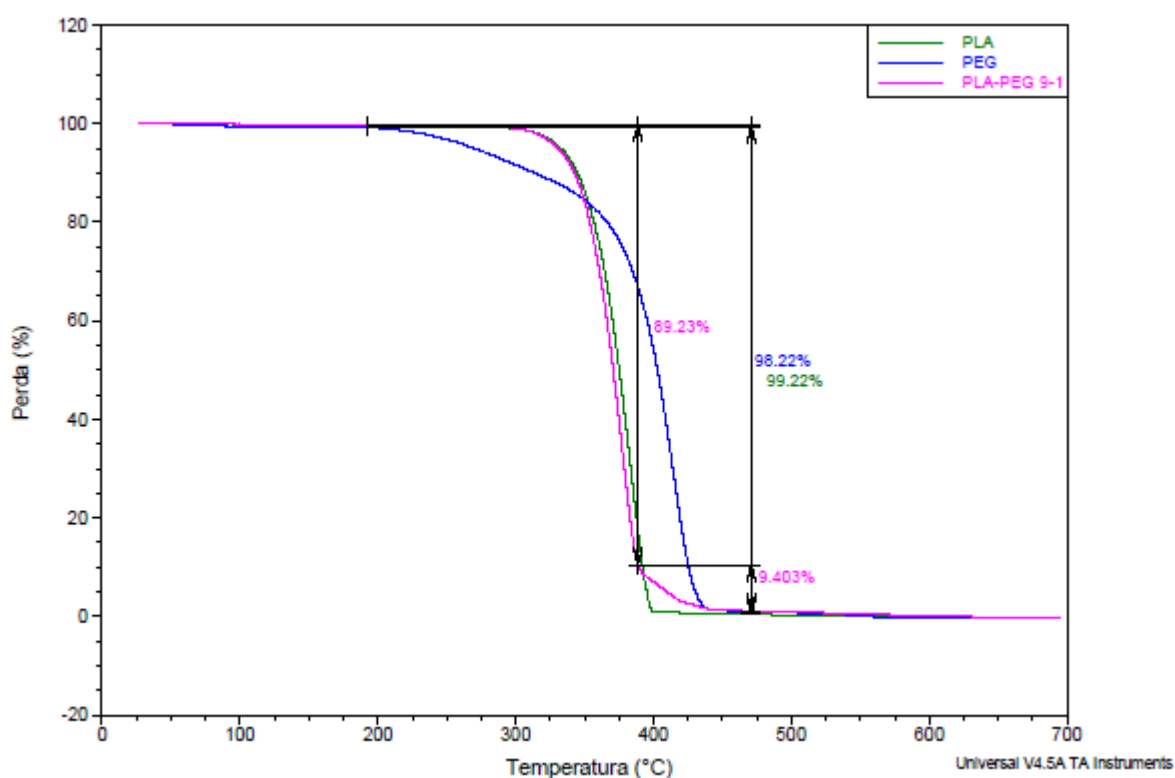
O ensaio antibacteriano com *S. aureus* com as matrizes à base de PLA demonstrou inibição em ambas condições, porém com maior inibição da matriz com Jaburetox ligado covalentemente, resultado diferente do que foi verificado nos ensaios antifúngicos. Para as amostras de PLA/PEG, não houve diferença significativa entre a matriz em branco e as matrizes com Jaburetox, evidenciando que não houve inibição do crescimento de *S. aureus* nas condições testadas. Serão necessários novos testes para verificar se realmente não ocorre inibição do crescimento bacteriano com estas matrizes à base de PLA/PEG, além de aprofundar os estudos com relação ao Jaburetox ligado covalentemente, que pareceu ser mais eficiente em relação ao Jaburetox adsorvido.

7.4 COMPORTAMENTO TÉRMICO

O comportamento térmico das fibras poliméricas obtidas por eletrofiação foi analisado pelas técnicas de TGA e DSC, com o objetivo de comparar o comportamento dos polímeros PLA e PEG puros e combinados na proporção 9:1 e também observar a influência da eletrofiação na história térmica do polímero.

A análise termogravimétrica nos mostra a temperatura de degradação dos polímeros e, pela sobreposição das curvas obtidas (Figura 11) é possível identificar um perfil único de perda para os polímeros puros, o que já era esperado. O percentual de degradação não alcança exatos 100 % pelo fato de haver cinzas remanescentes após o processo. Como se pode observar, a análise apresentou também um perfil de perda diferente para a mistura PLA/PEG, onde pode-se ver duas perdas de massa diferentes, sendo a primeira correspondente ao PLA e a segunda, de cerca de 9,4 %, referente ao PEG. A partir deste resultado foi possível confirmar que a composição da matriz está próxima daquela realizada durante a preparação da solução para a eletrofiação.

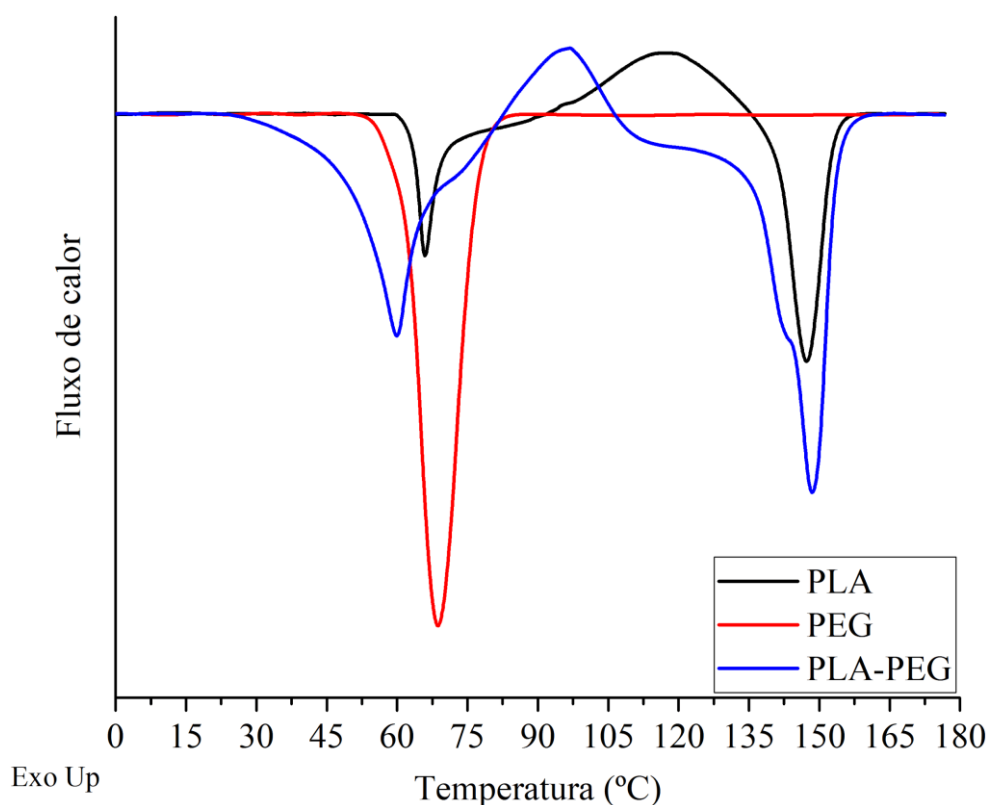
Figura 11: Termogramas de TGA das matrizes de PLA e de PLA/PEG em comparação com o polímero PEG.



A análise de calorimetria exploratória diferencial nos permite identificar as transições térmicas de uma amostra, assim como as entalpias relacionadas a essas transições. Neste trabalho foram avaliados dois ciclos de aquecimento, sendo as amostras os polímeros puros PEG e PLA e a mistura PLA/PEG, estes dois últimos na forma de fibras.

No primeiro ciclo de aquecimento das amostras (Figura 12) é possível identificar um intenso pico endotérmico, em torno de 60-70 °C, característico da transição vítrea (T_g) do PLA junto com uma entalpia de relaxação devido à tensão aplicada durante a eletrofiação (GAMBA 2013). Para o PEG, que possui uma T_g muito baixa, -70 °C, um pico endotérmico em 68,89 °C corresponde à fusão cristalina do polímero, assim como os picos em torno de 150 °C para o PLA e para a mistura (DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004). Entre 110 e 120 °C, para as análises de PLA puro e mistura, é possível identificar um pico exotérmico referente à cristalização desse polímero. Esses eventos de cristalização e fusão cristalina no PLA são característicos do processo de eletrofiação, uma vez que é um polímero amorfo e não apresentaria tal comportamento.

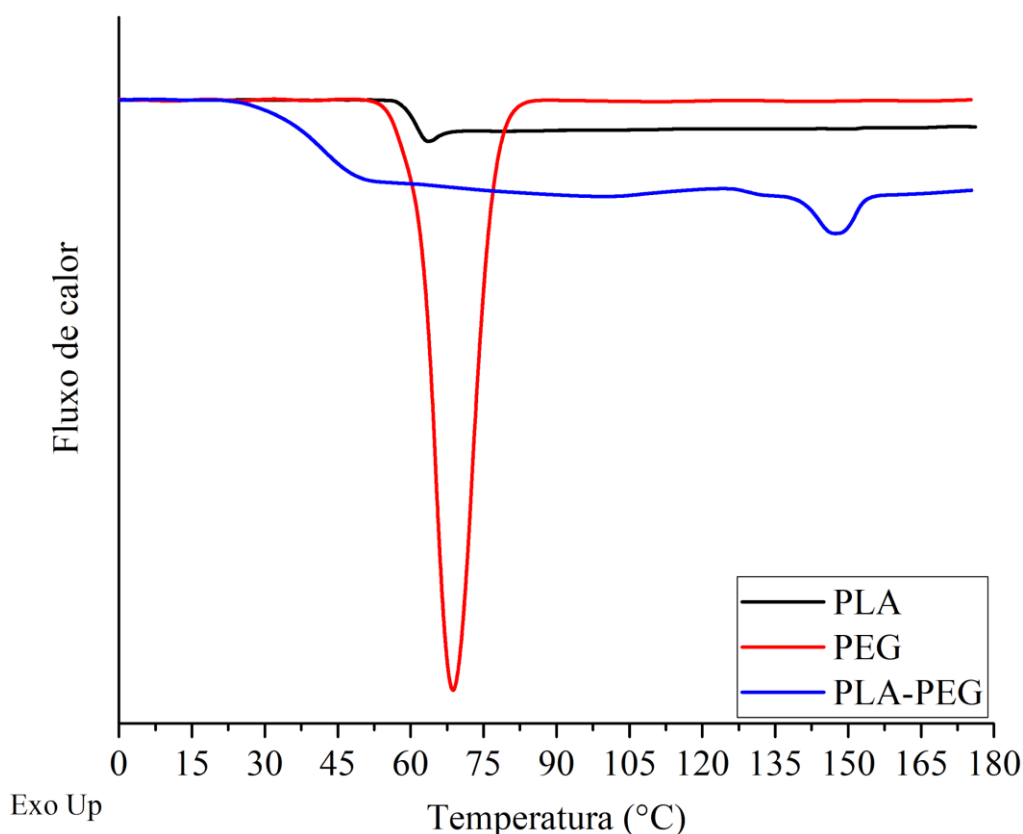
Figura 12: Termograma de DSC (primeiro aquecimento).



Um segundo aquecimento dessas amostras (Figura 13) apresenta igual pico de fusão cristalina para o PEG, em aproximadamente 70 °C, assim como a T_g do PLA. Entretanto, não é mais observado o intenso pico endotérmico devido à relaxação do polímero, pois o primeiro ciclo de aquecimento/resfriamento apaga a história térmica dos polímeros.

Nesse segundo aquecimento observou-se também, para a amostra da blenda dos polímeros, uma leve liberação de energia característica da cristalização do PLA, seguida por um pico endotérmico referente à fusão cristalina. Entretanto, esse comportamento do PLA não era esperado, como se pode ver na linear linha de base (acima de 75 °C) da amostra de PLA pura. Sugere-se que a presença do PEG pode ter induzido a cristalização do PLA, porém uma nova análise dessa blenda seria necessária para identificar a permanência do perfil. Outra mudança a ser observada é em relação à T_g da blenda, onde houve diminuição do valor da T_g em relação ao PLA puro. Este comportamento ocorre em função da presença das cadeias do PEG, as quais irão impossibilitar a completa interação entre as cadeias do PLA, atuando assim como um plastificante na blenda.

Figura 13: Termograma de DSC (segundo aquecimento)



7.5 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE.

O emprego do PEG na fabricação das matrizes teve como objetivo a diminuição da hidrofobicidade do PLA puro, buscando uma maior interação entre a matriz e o Jaburetox, além de facilitar o processo de hidrólise superficial. Durante os experimentos microbiológicos foi possível observar uma diferença de molhabilidade entre as amostras com e sem PEG, então um ensaio de ângulo de contato foi realizado buscando avaliar essa diferença.

Esse ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra, entretanto, como é medido o ângulo de contato nos dois lados da imagem da gota obtida (Figura 14), foram obtidos 6 valores de ângulo de contato para cada amostra. Os valores de média e desvio padrão desses resultados são apresentados na Figura 15.

Figura 14: Imagem da gota sobre a matriz de PLA hidrolisado.

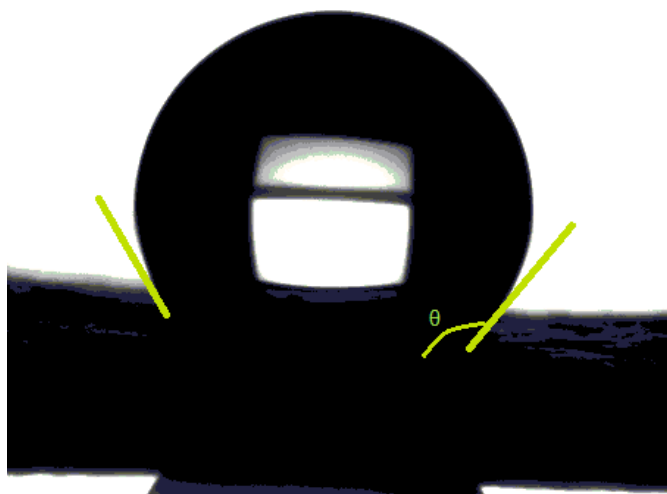
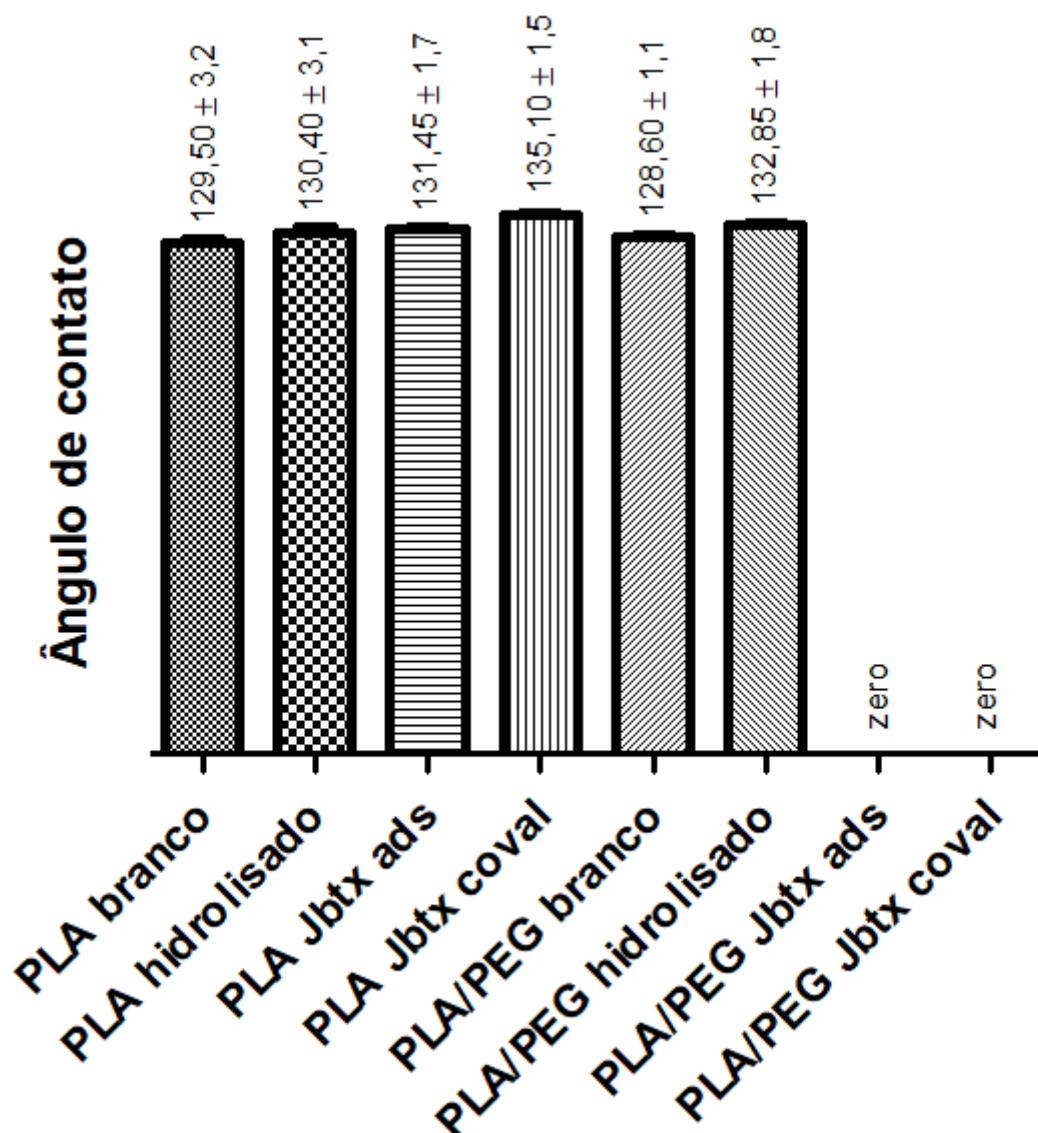


Figura 15: Média e desvio padrão dos resultados de ângulo de contato para as matrizes de PLA e PLA/PEG, branco, hidrolisadas, com Jbtx ads e Jbtx coval.



Os resultados aparentam ser muito semelhantes, e uma análise estatística desses valores mostrou que não há diferença significativa entre eles, exceto em relação às amostras de PLA/PEG com Jbtx, que absorveram a gota muito rapidamente, resultando em um ângulo de contato igual à zero.

Conforme foi citado, foi possível identificar visualmente uma maior molhabilidade das matrizes de PLA/PEG e, como o Jbtx possui afinidade por água, em função da sua origem proteica, deduz-se que por causa dessa combinação as amostras tenham ficado bastante hidrofílicas, não sendo possível manter uma gota de água sobre as amostras por tempo suficiente para medir o ângulo de contato.

8. CUSTOS DO PROJETO

Foram realizadas pesquisas do valor dos reagentes utilizados para a produção das matrizes com o peptídeo Jaburetox incorporado. Na Tabela 1 está descrita a cotação dos reagentes utilizados. Os reagentes foram cotados da Sigma-Aldrich devido à elevada pureza em função da aplicação proposta.

Tabela 1: Cotação dos reagentes utilizados na produção das matrizes.

Reagente	Quantidade	Valor (R\$)
Álcool Etílico	1 L	132,00
Diclorometano	1 L	66,00
Hidróxido de Sódio	2,5 kg	221,00
EDC	1 g	132,00
NHS	5 g	170,00
PLA	1 kg	1000,00
PEG	1 kg	649,00
Jaburetox	30 mL (33 μ M)	*15,00

*O valor do peptídeo Jaburetox foi estimado apenas com base no custo dos reagentes utilizados para a produção do mesmo.

Os valores estimados para a produção de 10 unidades de cada amostra com peptídeo Jaburetox incorporado, no tamanho 2x3 cm, encontram-se descritos nas Tabelas 2-5.

Tabela 2: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA com Jaburetox adsorvido.

Reagente	Quantidade	Custo (R\$)
PLA	0,5 g	0,50
Álcool Etílico	0,73 mL	0,10
Diclorometano	2,93 mL	0,20
Hidróxido de Sódio	0,03 g	<0,01
Jaburetox	30 mL	15,00
Total		15,80

Tabela 3: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA com Jaburetox ligado covalentemente.

Reagente	Quantidade (g)	Custo (R\$)
PLA	0,5 g	0,50
Álcool Etílico	0,73 mL	0,10
Diclorometano	2,93 mL	0,20
Hidróxido de Sódio	0,03 g	<0,01
EDC	0,12 g	15,84
NHS	0,072 g	2,45
Jaburetox	30 mL	15,00
Total		34,10

Tabela 4: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA/PEG com Jaburetox adsorvido.

Reagente	Quantidade (g)	Custo (R\$)
PLA	0,45 g	0,45
PEG	0,05 g	0,03
Álcool Etílico	0,73 mL	0,10
Diclorometano	2,93 mL	0,20
Hidróxido de Sódio	0,006 g	<0,01
Jaburetox	30 mL	15,00
Total		15,78

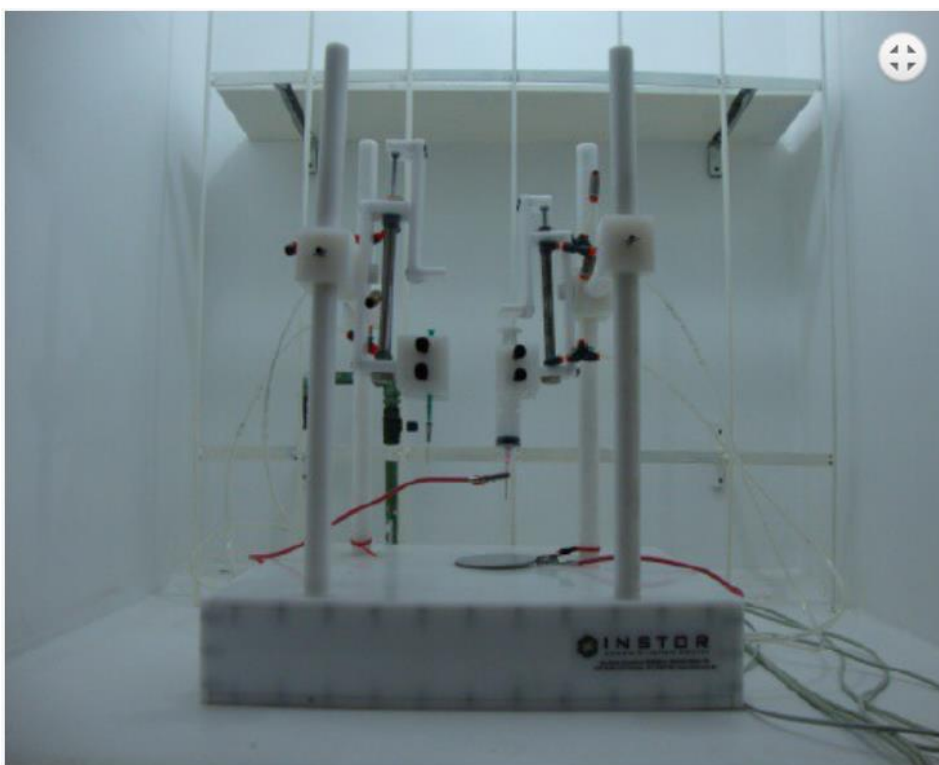
Tabela 5: Estimativa de custo de produção de 10 amostras de matriz de PLA/PEG com Jaburetox ligado covalentemente.

Reagente	Quantidade (g)	Custo (R\$)
PLA	0,45 g	0,45
PEG	0,05 g	0,03
Álcool Etílico	0,73 mL	0,10
Diclorometano	2,93 mL	0,20
Hidróxido de Sódio	0,006 g	<0,01
EDC	0,12 g	15,84
NHS	0,072 g	2,45
Jaburetox	30 mL	15,00
Total		34,07

Esses valores foram estimados apenas com base no custo dos reagentes empregados na fabricação das peças. Não se estimou custo de consumíveis, vidrarias, pessoal, local, entre outros.

Uma cotação do equipamento de eletrofiação (Figura 16) foi realizada com a empresa Instor, que revende o equipamento utilizado e possui parceria com a UFRGS, sendo estimado que seria necessário um investimento de aproximadamente 24 mil reais para aquisição deste equipamento.

Figura 16: Equipamento de eletrofiação.



Fonte: <http://www.instor.com.br/pesquisa-e-ensino-electrospinnings#prettyPhoto>, acesso em 29/12/2017.

9. CONCLUSÃO

A obtenção das matrizes pela técnica de eletrofiação foi simples e se mostrou muito eficaz para o material que se desejava obter.

A produção do peptídeo Jaburetox foi demorada e delicada, necessitando de grandes cuidados. Entretanto, foi possível a obtenção de significativa quantidade por litro de cultivo e em elevada pureza.

O ensaio antifúngico apresentou inibição do crescimento nas matrizes contendo Jaburetox. As matrizes com o peptídeo adsorvido se mostraram mais eficientes, provavelmente devido à lixiviação do composto, acarretando uma maior homogeneidade do meio. Neste ensaio as matrizes de PLA e PLA/PEG apresentaram resultados semelhantes de inibição fúngica.

O ensaio antibacteriano nas amostras de PLA demonstrou inibição na presença do Jaburetox, com destaque para as matrizes com Jaburetox ligado covalentemente. O ensaio com a matriz de PLA/PEG não apresentou inibição, sendo necessários novos experimentos para confirmar esse resultado.

O trabalho apresenta dados promissores para o objetivo proposto, tendo como perspectivas estudos de microscopia eletrônica de varredura para a determinação do tamanho das fibras e observação da colonização microbiana sob as matrizes, esperando que esta seja menor na superfície das matrizes funcionalizadas. Além disso, será preciso determinar a quantidade de Jaburetox que foi efetivamente ligado às matrizes, novos ensaios antibacterianos para confirmar os resultados obtidos, bem como testes *in vitro* de toxicidade utilizando células de mamíferos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELATO, K. K. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of thymol verified in murine macrophages (RAW 264.7) after antimicrobial analysis in *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans*. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 40, n. November 2017, p. 455–460, 2018.

BECKER-RITT, A. B.; PORTUGAL, C. S.; CARLINI, C. R. Jaburetox: Update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–8, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–54, 1976.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.

COSTA, R. G. F. et al. Eletrofição de Polímeros em Solução: parte I: fundamentação Teórica. **Polímeros**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.

COTRIM, O. S.; DA SILVA, L. L.; DEFFUNE, E. Impacto da Divulgação da Pesquisa Sobre Biocurativos e Avaliação Psicosocial dos Pacientes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 3, p. 7–23, 2013.

DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 81, n. 7, p. 1119–1129, 2006.

DE JAEGHERE, F. et al. Formulation and Lyoprotection of Poly(Lactic Acid-Co-Ethylene Oxide) Nanoparticles: Influence on Physical Stability and In Vitro Cell Uptake. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 859–866, 1999.

DRUMOND, W. S.; WANG, H. S.; MOTHÉ, C. G. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli(Ácido Láctico- B -Glicol Etilênico). **Polímeros** [online]. 2004, vol.14, n.2, pp.74-79. ISSN 0104-1428

Fechine, G. J. M. A Era dos Polímeros Biodegradáveis. **Plástico Moderno**. n. 423, 2010.

FELGUEIRAS, H. P.; AMORIM, M. T. P. Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 156, p. 133–148, 2017.

FERREIRA-DA-SILVA, C. T. et al. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of insect biochemistry and physiology**, [s. l.], v. 44, n. April, p. 162–171, 2000.

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C. & CARLINI, C. R. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **The Biochemical Journal**, 360: 217–224, 2001.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.

FRUTTERO, L. L. et al. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 412, 2016.

GAMBA, D. **Síntese e Caracterização de Poliésteres Biodegradáveis e Biorreabsorvíveis para a Utilização como Matrizes Tridimensionais em Engenharia de Tecidos**. 2013. 189 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LOPES, F. C. et al. Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 282, n. 6, p. 1043–1064, 2015.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 395, n. 1–2, p. 266–271, 2010.

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M. S.; PIOVESAN, A. R.; STANISÇUASKI, F.; DEMARTINI, D.R.; DAL BELO, C.A.; ALMEIDA, C.G.M; FOLLMER, C.; VERLI, H.; CARLINI, C.R. & PASQUALI, G. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1840(3): 935–944, 2014.

MULINARI, F. et al. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 2042–2050, 2007.

NICOSIA, A. et al. Air filtration and antimicrobial capabilities of electrospun PLA/PHB containing ionic liquid. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 154, p. 154–160, 2015.

PORTELA, P.M.D. **Montagem e Automatização de um Sistema de Electrospinning**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Minho, Braga, Portugal 2010.

POSTAL, M. et al. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012.

RÄDER, F. A. **Preparação e Avaliação do Potencial Antifúngico de Nanofibras de Poli(ácido láctico) Contendo Líquido Iônico Baseado em Sais Imidazólicos**. 2016. 41f. Monografia (Bacharelado em Química Industrial) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

SANTOS, C. G. et al. Uso de blendas poliméricas em nano e microencapsulação. **Disciplinarum Scientia. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 311–323, 2015.

STEFFENS, D. et al. Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute. **Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 975–987, 2015.

ULBRICHT, J.; JORDAN, R.; LUXENHOFER, R. Biomaterials On the biodegradability of polyethylene glycol , polypeptoids and poly (2-oxazoline) s. **Biomaterials**, [s. l.], v. 35, n. 17, p. 4848–4861, 2014.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, [s. l.], v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.

XIAO, L. et al. Poly(Lactic Acid) - Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. **Biomedical Science, Engineering and Technology**, 2012.

ZACCHIGNA, M. et al. Properties of methoxy(polyethylene glycol)-lipase from *Candida rugosa* in organic solvents. **II Farmaco**, [s. l.], v. 53, n. 12, p. 758–763, 1998.