

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDOS SOBRE A FORMAÇÃO DE FILMES
MONOMOLECULARES DA HIALURONIDASE BOVINA

Sílvia Belém Gonçalves

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof^ª. Vera Maria Martins Salim, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Dr^ª.Neuman Solange de Resende, D.Sc.

Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Junior, D.Sc.

Prof. Carlos José Leopoldo Constantino, DSc.

Dr^ª. Françoise Besson, PhD

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JANEIRO DE 2007

GONÇALVES, SÍLVIA BELÉM

Extração, Purificação e Estudos Sobre a
Formação de Filmes Monomoleculares da
Hialuronidase Bovina [Rio de Janeiro] 2007

XVI, 166 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,
Engenharia Química, 2007)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Hialuronidase Bovina
2. Adsorção
3. Hidroxiapatita
4. Filmes de Langmuir

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

A Fabricio, esposo, parceiro, amigo,
companheiro, namorado, amante...
e a Sara, filha, esperança, luz,
alegrias, sorrisos... Dádivas de Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter dado ao homem a capacidade de pensar, de criar e de modificar.

Agradeço em especial a Fabricio Machado Silva, pela paciência, a amizade, o carinho, o apoio, o companheirismo, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e também nos alegres enfim por fazer parte de minha vida.

Aos professores Tito Lívio Alves e Vera Maria Salim pela orientação, pela ajuda durante todo o trabalho de tese e, sobretudo pela amizade e compreensão em todos os momentos desta jornada.

A todos os funcionários e professores que compõem o PEQ/COPPE/UFRJ pelo auxílio na realização deste trabalho. Aos colegas de todos os laboratórios, em especial aos que trabalham no Laboratório de Bioprocessos, e NUCAT, pela convivência, pelos momentos felizes e pelo cafezinho toda manhã.

Aos amigos Helen, Roberto Bentes, Lívia, Ana Karla, Cândida, Rossano, Herval, meu sincero agradecimento pela participação direta no desenvolvimento desta tese.

Ao Laboratório Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques Université Claude Bernard Lyon 1 – França, pelo apoio durante a minha permanência na França. Aos colegas Jaqueline, Pierre, Achafre e Noelle pessoas que guardo boas lembranças. A Françoise Besson, pela orientação e a amizade quando mais precisei.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e suporte para pesquisa e Capes pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche, processo BEX 0801/04-6.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDO SOBRE A FORMAÇÃO DE FILMES MONOMOLECULARES DA HIALURONIDASE BOVINA

Sílvia Belém Gonçalves

Janeiro/2007

Orientadores: Vera Maria Martins Salim

Tito Livio Moitinho Alves

Programa: Engenharia Química

Este trabalho investigou a extração e purificação da hialuronidase de testículo bovino, contemplando um estudo inédito sobre a formação de filmes monomoleculares da hialuronidase bovina. Desenvolveu-se um processo simples e eficiente de separação que compreende as etapas de extração aquosa, precipitação de contaminantes, adsorção de proteínas contaminantes, resultando na obtenção de uma solução rica em hialuronidase. A extração foi realizada utilizando-se como agentes extratores o tampão tris-HCl 0,15 M em pH 8,5, água em pH 5,0 e 8,5 e soluções de sacarose 0,2 M em pH 5,0 e 8,5, sendo o tampão tris-HCl o mais eficiente na remoção de proteínas solúveis. Após a extração foi realizada uma primeira separação através da precipitação de proteínas contaminantes em pH 5,6 seguida de uma adsorção utilizando a hidroxiapatita como adsorvente de proteínas contaminantes. Ensaio preliminares com hialuronidase comercial mostraram que a enzima adsorve fracamente na hidroxiapatita, com uma constante de afinidade 40 vezes menor que a observada para BSA. Os testes de dessorção mostraram que a hialuronidase adsorvida é recuperada de forma quase pura. Estes resultados mostram que a hidroxiapatita pode ser empregada como adsorvente das proteínas contaminantes e na etapa final de purificação como adsorvente da hialuronidase.

A hidroxiapatita sintetizada e caracterizada no laboratório apresenta uma superfície específica de 43,5 m²/g, razão Ca/P de 1,59 e ponto isoelétrico em torno de 7,0. A caracterização da hialuronidase através da preparação de filmes de Langmuir mostrou que a proteína possui propriedades anfifílicas, área molecular média de 36 nm², apresentando forte atração pela interface ar/água, sendo estável em pH 5,3 mesmo em contato com o ar. Observou-se que a hialuronidase apresenta interações com o ácido hialurônico na interface ar/água. Ensaio de microscopia pelo ângulo de Brewster mostraram que a proteína é capaz de permanecer na interface ar/água mesmo na presença de moléculas fortemente anfifílicas. As caracterizações por espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) revelaram que a conformação da proteína é modificada pela variação de pH e a modelagem tridimensional da proteína por homologia indicou que a área superficial da hialuronidase apresenta regiões hidrofóbicas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

EXTRACTION, PURIFICATION AND STUDIES ON THE FORMATION OF
MONOMOLECULAR FILMS OF THE BOVINE HYALURONIDASE

Sílvia Belém Gonçalves

January/2007

Advisors: Vera Maria Martins Salim

Tito Livio Moitinho Alves

Department: Chemical Engineering

This work investigated the extraction and purification of the bovine testicular hyaluronidase, including a pioneering investigation on the formation of monomolecular films prepared with bovine hyaluronidase. A simple and efficient separation process was developed, comprising the extraction of total proteins in aqueous phase followed by contaminant proteins precipitation and adsorption. The extraction was carried out using 0.15 M tris-HCl buffer, pH 8.5, distilled water, pH 5.0 and 8.5, and 0.2 M sucrose solution, pH 5.0 and 8.5. At the end, a hyaluronidase-enriched solution was obtained. Best results were obtained using the tris-HCl buffer. Afterwards, contaminant proteins were separated by precipitation at pH 5.6. Subsequently, remaining contaminant proteins were removed by adsorption on hydroxyapatite. Preliminary tests with commercial hyaluronidase showed that the enzyme adsorbs weakly on hydroxyapatite, with an affinity constant 40 times lower than that observed for BSA. Also, it was observed that highly purified hyaluronidase is recovered after desorption. These results point out that hydroxyapatite can be used as adsorbent of contaminant proteins and at the final step of purification, as hyaluronidase adsorbent.

The hydroxyapatite synthesized and characterized at the laboratory presented superficial area of 43.5 m²/g, Ca/P ratio of 1.59 and isoelectric point around 7.0. A. The study of Langmuir films prepared with bovine hyaluronidase showed that this protein exhibits amphiphilic properties, with a superficial area of 36 nm², presenting a strong attraction by the air/water interface and it is stable at pH 5.3, even in contact with air. The experimental studies showed that hyaluronidase presents interactions with the hyaluronic acid at the air/water interface. Analysis through Brewster angle microscopy (BAM) showed that the protein remains at the air/water interface even in the presence of highly amphiphilic molecules. The characterization of the hyaluronidase through Infrared Spectroscopy (FTIR) revealed that the protein conformation is modified by the pH. Using tridimensional modeling by homology it was verified that the hyaluronidase surface has hydrophobic zones.

ÍNDICE

Introdução e Objetivos	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivos.....	4
Revisão Bibliográfica - Hialuronidase	5
2.1 Introdução.....	5
2.2 Hialuronidase.....	5
2.2.1 – Características da Hialuronidase	5
2.2.2 – A Hialuronidase e o Homem	12
2.2.2-1 – Hialuronidase Testicular de Mamíferos	13
2.2.3 - Extração e Purificação da Hialuronidase	14
2.2.4 – Hialuronidase Recombinante.....	18
2.2.5 – Aplicações da Hialuronidase	20
2.3 Ácido Hialurônico	23
2.3.1 - Características do Ácido Hialurônico	23
2.3.2 – Fontes de Ácido Hialurônico.....	25
2.4 Atividade Enzimática da Hialuronidase	25
2.5 Inibidores da Atividade Enzimática da Hialuronidase	27
Revisão Bibliográfica – Separação de Proteínas	29
3.1 Introdução.....	29
3.2 Extração.....	29
3.3 Precipitação	29
3.4 Adsorção.....	30
3.4.1. Adsorventes	30
3.4.2. Hidroxiapatita.....	31
3.5 Separação de Proteína.....	36
3.5.1 Adsorção.....	36
3.5.1-1. Adsorção de Proteínas.....	37
3.5.1-2. Adsorção de Proteínas em Hidroxiapatita.....	41

Revisão Bibliográfica - Filmes Monomoleculares	45
4.1 Introdução	45
4.2 Filmes Monocamadas	45
4.3 Histórico sobre o Desenvolvimento de Filmes Finos	46
4.4 Propriedades de Filmes	47
4.4.1 – Tensão Superficial	47
4.4.2 – Pressão de Superfície	49
4.5 Filmes de Langmuir	50
4.6 Filmes de Langmuir- Blodgett	53
4.7 Filmes de Biomoléculas e Algumas Aplicações	57
 Materiais e Métodos	 66
5.1 Introdução	66
5.2 Extração da Hialuronidase	66
5.3 Síntese da Hidroxiapatita	67
5.4 Caracterização do Adsorvente	68
5.4.1 Composição Química Mássica	68
5.4.2 Composição Química de Superfície	68
5.4.3 Propriedades Texturais	68
5.4.4 Análise de Estrutura e Pureza de Fases	69
5.4.5 Determinação de Propriedades Elétricas - Potencial Zeta	69
5.4.6 Determinação do Tamanho de Partículas	69
5.5 Adsorção em Batelada	69
5.6 Dosagem de Proteína	70
5.7 Determinação dos Parâmetros das Isotermas de Adsorção	71
5.8 Ensaio Preliminares de Dessorção da Hialuronidase	71
5.9 Atividade Enzimática da Hialuronidase	72
5.10 Formação de Filmes Monomoleculares	73
5.11 Medidas de Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	 74
5.12 Modelagem Tridimensional da Estrutura da Hialuronidase de Testículo Bovino	 75
5.13 Microscopia pelo Ângulo de Brewster (BAM)	75

Resultados e Discussões	76
6.1 Introdução	76
6.2 Síntese e Caracterização da Hidroxiapatita	77
6.2.1 Síntese da Hidroxiapatita.....	77
6.2.2 Composição Química Mássica e de Superfície	77
6.2.3 Propriedades Texturais	77
6.2.4 Análise da Estrutura e Pureza das Fases dos Adsorventes	78
6.2.5 Potencial Zeta	79
6.2.6 Tamanho de Partícula	79
6.3 Adsorção da Hialuronidase em Hidroxiapatita.....	81
6.3.1 Influência do Tempo de Adsorção da Hialuronidase em Hidroxiapatita em Função do pH	81
6.3.2 Avaliação do pH Ótimo.....	83
6.3.3 Isotermas de Adsorção.....	85
6.3.4 Adsorção da Mistura Binária.....	86
6.3.5 Dessorção da Mistura Binária.....	88
6.3.5.1 – Teor Total de Proteína	88
6.3.5.2 – Curva Padrão de Calibração da Atividade da Hialuronidase pelo Método de Turbidez	90
6.3.5.3 – Atividade da Hialuronidase pelo Método de Turbidez nas Etapas de Dessorção da Mistura Binária.....	91
6.4 Extração da Hialuronidase do Testículo Bovino	92
6.5 Adsorção e Dessorção dos Extratos Contendo a Hialuronidase.....	93
6.6 Novos Testes de Adsorção do Extrato do Testículo Bovino em Hidroxiapatita	96
6.7 Caracterização da Hialuronidase	101
6.7.1 - Localização da Hialuronidase no Testículo Bovino.....	101
6.7.2 - Modelagem da Estrutura da Hialuronidase do Testículo Bovino	102
6.7.3 – Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para Avaliação da Estrutura Secundária da Hialuronidase.....	105
6.8 Formação de Filmes Monomoleculares da Hialuronidase	108
6.8.1 - Propriedades Interfaciais da Hialuronidase do Testículo Bovino	108
6.8.2 - Isotermas da Hialuronidase na Interface Ar / Água	109
6.8.3 - Quantificação da Área Molecular da Hialuronidase	111

6.8.4 - Avaliação da Influência do pH e da Presença de NaCl na Subfase na Isoterma de Adsorção de Hialuronidase na interface ar / água	112
6.8.5 - Influência na Forma de Deposição da Proteína.....	116
6.8.6 - Estudo da Afinidade da Hialuronidase pelo N-Acetil Glucosamina.....	119
6.8.7 - Adsorção do Ácido Hialurônico em Monocamada da Hialuronidase...	120
6.8.8 - Estudo do Comportamento da Hialuronidase na Presença de uma Monocamada Lipídica	121
6.8.9 – Microscopia pelo Ângulo de Brewster (BAM)	123
Conclusões e Sugestões	131
7.1 Conclusões.....	131
7.2 Sugestões	135
Referências Bibliográficas.....	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura do ácido hialurônico e produto após a clivagem através da ação de lise da hialuronidase do tipo 1 (testicular, lisossomal ou proveniente de veneno), adaptada de VERCRUYSSSE et al. (1995).....	7
Figura 2.2 – Estrutura do ácido hialurônico e o produto após a clivagem através da ação de lise da hialuronidase do tipo 2 (de sanguessuga e de minhocas), adaptada de VERCRUYSSSE et al. (1995).....	8
Figura 2.3 – Estrutura do ácido hialurônico e a estrutura sendo clivada através da ação de lise da hialuronidase do tipo 3 (de bactérias), adaptada HOVING e LINKER (1999).	8
Figura 2.4 – (a) Estrutura do ácido hialurônico em três dimensões (adaptada da página www.pdb.ufmg.br , acesso 14/05/2004); (b) Esquema da cadeia do ácido hialurônico associada a outras moléculas, conforme encontrada na pele (adaptada de MURRAY, 1996, 24 ed).....	24
Figura 3.1 - Configuração espacial da hidroxiapatita (eixo z).	32
Figura 3.2 – Representação esquemática dos grupos funcionais da HAp. Adaptado de GORBUNOFF, 1984.....	33
Figura 3.3 – Esquema representando as modificações sofridas na conformação de uma proteína no processo de adsorção.	37
Figura 3.4 - Esquema da distribuição de cargas de uma superfície plana (1) e de uma proteína (2), com seus gradientes correspondentes de potencial eletrostático ψ , onde H é a distância entre a proteína e a superfície através do meio. Adaptada de NORDE (1986).....	38
Figura 3.5 – Isotermas típicas do processo de adsorção. (a) Isotherma típica de moléculas flexíveis, altamente solvatadas. (b) Isotherma típica de moléculas rígidas.....	40
Figura 3.6 – Representação esquemática do mecanismo de interação proposto por GORBUNOFF et al. (1984).	42
Figura 4.1 – Esquema ilustrativo da balança de Langmuir como a placa de Wilhelmy e as barreiras móveis.	48
Figura 4.2 – Esquema do princípio da formação de filmes de Langmuir. Figura adaptada de GIRARD-EGROT et al. (2005).....	51
Figura 4.3 – Gráficos típicos da área de superfície em função da pressão de superfície para materiais em diferentes fases. Adaptada de GIRARD-EGROT et al. (2005). 52	

Figura 4.4 – Esquema da deposição de uma monocamada em um substrato sólido. Tipos diferentes de deposição de multicamadas dos filmes de Langmuir – Blodgett. As figuras foram adaptadas de GIRARD-EGROT et al. (2005).	53
Figura 4.5 - Esquema da estrutura do filme utilizado por BERZINA et al. (1996).	58
Figura 4.6 - Princípio do método proposto por TROITSKY et al. (1996). (a) - deposição da monocamada, (b) - Substrato sendo fechado pela placa e (c) – Sistema substrato-placa removido da subfase aquosa, P – placa e S substrato.....	60
Figura 4.7 – Oxidação da monocamada de colesterol. Curva representativa da ação da oxidase em muitas monocamadas de esterol (SLOTTE, 1992).....	63
Figura 6.1 – Difratoograma da HAp.....	78
Figura 6.2 - Potencial Zeta da hidroxiapatita em função do pH.....	79
Figura 6.3 - Diâmetro de partícula da HAp com o uso de ondas de ultra-som.	80
Figura 6.4 - Diâmetro de partícula da HAp não submetido a ondas de ultra-som.	80
Figura 6.5 – Influência do tempo de contato na adsorção da hialuronidase em HAp (0,350 g), $C_0=0,1$ g/L, $V=15$ ml a 25°C	82
Figura 6.6 – Influência do pH nos testes de adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita, concentração inicial = $0,2$ g/L, $V= 15$ mL e $T = 25^\circ\text{C}$, Tempo = 1h	83
Figura 6.7 – Avaliação da interação do material que compõe o frasco de adsorção da hialuronidase, concentração inicial = $0,2$ g/L, $V= 15$ mL e $T = 25^\circ\text{C}$, Tempo = 1h.	84
Figura 6.8 – Isoterma de adsorção da hialuronidase, BSA e lisozima em HAp, dados experimentais (pontos) e ajuste ao modelo de Langmuir (linha), $T = 25^\circ\text{C}$	85
Figura 6.9 – Avaliação da adsorção da mistura binária de Hya e BSA em HAp, $C_0 = 0,1$ g/L, $V_0 = 15$ mL, massa de HAp = $0,075$ g e $T = 25^\circ\text{C}$, Tempo = 1h.....	87
Figura 6.10 – Adsorção da BSA e da hialuronidase em HAp em pH 7,0 a 25°C e dessorção dessas proteínas em tampão fosfato de potássio.....	88
Figura 6.11 – Adsorção da BSA e da hialuronidase em HAp em pH 7,0 a 25°C e dessorção dessas proteínas com soluções de cloreto de cálcio.....	89
Figura 6.12 – Curva de calibração da atividade da hialuronidase, utilizando o método de turbidez.	90
Figura 6.13 – Dessorção com tampão fosfato da hialuronidase em HAp adsorvida na mistura binária e atividade enzimática da proteína medida pelo método de turbidez	91

Figura 6.14 – Fotos dos testículos bovinos com o epidídimo (a) e do testículo sem o epidídimo (b e c).....	92
Figura 6.15 – Adsorção de proteínas do testículo bovino obtidos com tampão Tris – HCl e água em hidroxiapatita e dessorção dessas proteínas com tampão fosfato em concentração molar crescente.....	93
Figura 6.16 – Atividade da hialuronidase pelo método de turbidez. Amostras na etapa de lavagem com água em pH 7,2 (igual ao pH de adsorção). Eluição com tampão fosfato para as proteínas extraídas com tampão Tris – HCl e água em pH 9,0.....	94
Figura 6.17 – Adsorção do extrato do testículo bovino em hidroxiapatita, variando-se o pH de 5 a 8,3, $C_0 = 25 \text{ g/L}$ a 25°C	96
Figura 6.18. Fluxograma dos processos de extração e separação da hialuronidase.....	97
Figura 6.19 Gráfico do consumo de ácido hialurônico por proteína total, para o sobrenadante do extrato do testículo bovino em diferentes valores de pH. Onde Inicial corresponde ao sobrenadante antes da adsorção e final após a adsorção....	98
Figura 6.20. Eletroforese: hialuronidase comercial (1), sobrenadante 1 em pH 8,5 (2), sobrenadante 1 em pH 5,6 (3), sobrenadante 2 em pH 5,6 (4), sobrenadante 2 em pH 5,6 diluído 5 vezes (5) e sobrenadante 4 (6).....	100
Figura 6.21 – Alinhamento da seqüência de aminoácidos da hialuronidase de testículo bovino com a hialuronidase de veneno abelha.....	103
Figura 6.22 – Comparação da estrutura tridimensional da hialuronidase de testículo bovino com a hialuronidase do veneno de abelha. As cores verde e cinza correspondem às regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente e a região em vermelho o sítio ativo. Imagens A e C correspondem às visões superior e lateral da hialuronidase do veneno de abelha e as imagens B e D correspondem às visões superior e lateral da hialuronidase bovina.....	104
Figura 6.23. Espectro de FTIR da hialuronidase em pH 5,3. Concentração da hialuronidase 10 mg/mL	106
Figura 6.24. Influência do pH nos espectros de FTIR da Hialuronidase. A- Espectros de FTIR da hialuronidase em pH 5,3 (a), 6,2 (b), 7,2 (c) e 8,0 (d). B- Diferença dos espectros de infravermelho da hialuronidase, obtidos por subtração do espectro do pH 5,3 para os espectros dos valores de pH 6,2 (a), 7,2 (b) e 8,0 (c).....	107
Figura 6.25 – Cinética da pressão de superfície devido a adsorção da hialuronidase na interface ar / água a 21°C . Foi injetada $12 \mu\text{g}$ da proteína solubilizada em tampão fosfato 100 mM contendo 150 mM NaCl em pH 5, 3 e área 7 cm^2	108

Figura 6.26 - Sucessivas isotermas de adsorção da hialuronidase na interface ar / água a 21 °C. Após a injeção de 12µg de hialuronidase na subfase composta de tampão fosfato pH 5,3, velocidade de agitação de 100 rpm.....	110
Figura 6. 27 - Isoterma da hialuronidase, 20 µg da proteína, velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.....	111
Figura 6. 28 - Isotermas da deposição de 12 µg da hialuronidase, subfase composta de tampão fosfato 0,1M mais 0,15 M NaCl em valores de pH variando de 5,3 a 8,0, a temperatura de 21°C, sem agitação.	112
Figura 6. 29 – Avaliação da cinética de adsorção da hialuronidase na interface ar / água em função do pH da subfase, a temperatura de 21°C, na presença de 0,15 M de NaCl.....	113
Figura 6. 30 - Isotermas da deposição de 12 µg da hialuronidase, subfase composta de tampão fosfato 0,1M em valores de pH variando de 5,3 a 8,0, a temperatura de 21°C.....	114
Figura 6. 31 - Comparação das isotermas da deposição de 12 µg da hialuronidase, subfase composta de tampão fosfato 0,1M em valores de pH variando de 5,3 a 8,0 e o mesmo tampão sem adição de sal, a temperatura de 21°C. (a) – pH = 5,3, (b) – pH = 6,2, (c) – pH = 7,2 e (d) – pH = 8,0.....	115
Figura 6.32 - Avaliação da forma de deposição. Isotermas da deposição sucessivas a cada 3µg da hialuronidase até a quantidade de 12 µg e a isoterma da deposição de 12 µg de uma só vez [12 µg (única)], subfase composta de tampão fosfato 0,1M em valores de pH variando de 5,3 a 8,0, a temperatura de 21°C. (a) pH = 5,3, (b) pH = 6,2, (c) pH = 7,2 e (d) pH = 8,0.	118
Figura 6. 33 - Isotermas da hialuronidase e da hialuronidase mais o NAC em função do tempo. Foram injetados 12 µg da proteína e 90µg de NAC , velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.....	119
Figura 6.34 - Isotermas da hialuronidase e da hialuronidase mais o ácido hialurônico. Foram injetados 12 µg da proteína e 1mg de ácido hialurônico, velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.....	121
Figura 6.35 – Estrutura do glicolípido colesterol- E3 – N-acetil-glucosamina (GL)..	122
Figura 6.36 – Estrutura da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).....	122
Figura 6.37 - Isoterma do glicolípido e do glicolípido mais hialuronidase em função do tempo. Foram depositadas 40µL da solução do GL 0,545 µg/L e injetadas 12 µg da proteína, velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.	122

Figura 6.38 - Fotos obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster da monocamada de hialuronidase nas pressões de 0 a 12 mN/m.	124
Figura 6.39 - Isoterma da hialuronidase. Foram depositados 40 µg da proteína, sem agitação, a temperatura de 21°C.	125
Figura 6.40 - Imagens obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster da monocamada de GL e GL mais hialuronidase nas pressões de 0 a 20 mN/m.	127
Figura 6.41 - Isoterma do GL (50µL de uma solução 0,545 mM) e do GL mais hialuronidase (30 µL de uma solução 1mg /mL) a temperatura de 21°C.	128
Figura 6.42 - Imagens obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster da monocamada de DPPC e DPPC mais hialuronidase nas pressões de 0 a 12 mN/m.	130
Figura 6.43 - Isoterma do DPPC (40 µL de uma solução 0,545 mM) e do DPPC mais hialuronidase (30 µL de uma solução 1mg /mL) a temperatura de 21°C.	130

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais características e propriedades das diferentes hialuronidasas.....	10
Tabela 2.1 – Continuação	11
Tabela 2.2 – Purificação da hialuronidase testicular (BORDERS e RAFTERY, 1968).	15
Tabela 2.3 – Extração e purificação da hialuronidase de <i>Streptococcus hyalurolyticus</i> (OHYA e KANEKO, 1970).	16
Tabela 2.4 – Extração e purificação da hialuronidase do testículo de rato (GUPTA e GOLDBERG, 1981).	17
Tabela 2.5 - Extração e purificação da hialuronidase de fígado humano.....	18
Tabela 3.1 - Propriedades da HAp cerâmica Macro-Prep (Bio-Rad).....	33
Tabela 4-1 – Visão global das técnicas mais relevantes para a caracterização da estrutura e organização dos filmes de Langmuir-Blodgett. Tabela adaptada de GIRARD-EGROT et al. (2005).....	56
Tabela 6.1 – Relação cálcio / fósforo, mássica e de superfície da hidroxiapatita.	77
Tabela 6.2 – Propriedades texturais e composições químicas.....	78
Tabela 6.3 - Atividade da hialuronidase nos extratos obtidos.....	93
Tabela 6.4 - Atividade da hialuronidase após as etapas de purificação.	100
Tabela 6.5 – Quantificação da Atividade da Hialuronidase e da Fosfatase Alcalina em Diferentes Frações.	102

CAPÍTULO I

Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

A hialuronidase é uma enzima que exerce importantes funções biológicas, participando de processos vitais como a fertilização de mamíferos. Esta enzima atua sobre biopolímeros que constituem estruturas de sustentação e proteção de órgãos dos seres superiores, sendo de fundamental importância o estudo da ação catalítica exercida por esta enzima na interface plasma-biopolímero, visando o melhor entendimento da ação desta enzima em sistemas biológicos. Para uma melhor compreensão de suas funções torna-se necessário a obtenção da proteína na forma pura, biologicamente ativa e sua caracterização completa.

Embora a hialuronidase tenha sido descoberta em 1928, muitas das suas funções ainda não foram bem esclarecidas. Isto provavelmente deve-se ao fato de que há uma grande variedade de hialuronidases. Os valores de propriedades fundamentais como massa molar e ponto isoelétrico, variam de acordo com a fonte e órgãos onde se encontra a hialuronidase, o que dificulta a sua caracterização. Em alguns processos a função que a enzima desempenha já está bem esclarecida, mas por outro lado, sabe-se que em células tumorais há um grande acúmulo desta proteína (KOSAKI *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2001; CSOKA *et al.*, 2001), porém neste tipo de células, o mecanismo de atuação da hialuronidase ainda não foi esclarecido (CHRISTOPOULOS *et al.*, 2006).

Em trabalhos anteriores do grupo, GONÇALVES (2002), estudou as interações entre as proteínas albumina do soro bovino (BSA) e lisozima em hidroxiapatita. Foi observado que a hidroxiapatita possui alta seletividade e grande capacidade de adsorção de proteínas, devido aos seus diferentes sítios de adsorção, diferentes forças de interação atuam neste sistema, que podem ser do tipo forte (interações eletrostáticas) e/ou forças secundárias (pontes de hidrogênio e forças de van der Waals). Além disto, a metodologia e a padronização da síntese da hidroxiapatita já haviam sido estabelecidas

em trabalhos anteriores (SALIM *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1996; BHERING *et al.*, 1998).

A maioria dos trabalhos que estudam a purificação da hialuronidase utiliza colunas de DEAE-celulose e/ou Sephadex e apresentam resultados que podem ser otimizados (YAMADA *et al.*, 1977; YANG e SRIVASTAVA 1974). A literatura aberta apresenta somente três trabalhos sobre a utilização da hidroxiapatita na etapa de purificação da hialuronidase (ARONSON e DAVIDSON, 1967; MARGOLIS *et al.*, 1972 e GOLD, 1982). Os dois primeiros não obtiveram bons resultados, porém, o trabalho de Gold 1982 mostrou resultados muito promissores (mais detalhes no Capítulo II).

A técnica de Langmuir-Blodgett é a mais promissora no preparo de filmes finos, pois possibilita um controle preciso da espessura e deposição homogênea da monocamada. Estudos de filmes de Langmuir de biomoléculas têm um interesse especial, pois podem ser estendidos para compreender a organização destas moléculas em sistemas biológicos *in natura* (CONSTANTINO *et al.*, 1998). O emprego desta técnica possibilitará uma caracterização da hialuronidase do testículo bovino de forma simples, utilizando-se apenas pequenas quantidades da proteína (na ordem de μg).

Com base na literatura e nos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, observou-se que a hidroxiapatita apresenta um grande potencial para a separação da hialuronidase extraída do testículo bovino, tanto em etapas primárias, através da adsorção de contaminantes, como em etapas finais da separação, através da adsorção da hialuronidase. Para isto, faz-se necessário um estudo mais detalhado das características da proteína e do adsorvente. Neste trabalho é apresentada a caracterização da hidroxiapatita e a caracterização da hialuronidase, utilizando a técnica de filmes monomoleculares. Apresenta-se ainda um estudo da adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita e a extração da enzima de uma fonte natural.

Este trabalho está estruturado em oito capítulos, incluindo a introdução. Segue-se uma breve descrição de cada capítulo:

Os Capítulos II, III e IV são destinados à revisão bibliográfica. No Capítulo II é feita uma explanação das propriedades, fontes, aplicações e principais métodos utilizados para a separação da hialuronidase, bem como as características do principal substrato desta enzima que é o ácido hialurônico. No Capítulo III apresenta-se uma revisão sobre a hidroxiapatita, bem como uma revisão dos processos de adsorção. O Capítulo IV fornece um breve histórico do desenvolvimento, dos tipos, de algumas técnicas e das principais aplicações de filmes monomoleculares.

No Capítulo V descrevem-se os procedimentos experimentais, os métodos analíticos, as técnicas empregadas para a síntese, a caracterização do adsorvente e a metodologia empregada para a obtenção de isotermas de adsorção, os testes de dessorção e os materiais e a metodologia empregados para obtenção de filmes monomoleculares.

No Capítulo VI apresentam-se os resultados e discussões da síntese e caracterização dos adsorventes empregados neste trabalho. São descritos os resultados e as discussões sobre a adsorção e a dessorção da hialuronidase comercial e de uma mistura binária, de hialuronidase e albumina de soro bovino (BSA), realizadas para observar a influência de variáveis, tais como o pH, a concentração molar, as proteínas contaminantes entre outras. Este capítulo apresenta ainda os resultados da extração da hialuronidase do testículo bovino e os ensaios iniciais de adsorção e dessorção em batelada destes extratos em hidroxiapatita. Os resultados e discussões do estudo de filmes monomoleculares da hialuronidase do testículo bovino, evidenciando as propriedades interfaciais da proteína, também estão descritos neste capítulo. Por fim os resultados e discussões do estudo da purificação da hialuronidase bovina utilizando a técnica de adsorção em hidroxiapatita são apresentados.

O Capítulo VII contém as principais conclusões deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros. O Capítulo VIII registra as referências bibliográficas dos trabalhos citados no corpo deste trabalho.

1.2 Objetivos

Esta tese tem como principal objetivo a extração, separação e caracterização da hialuronidase do testículo bovino e, além disso, estudar as interações entre a hidroxiapatita e a hialuronidase em sistemas binários e multicomponentes, identificando as diferentes forças envolvidas na etapa de adsorção e dessorção das proteínas, etapa importante para a avaliação do emprego da hidroxiapatita como adsorvente.

Para uma melhor caracterização da proteína foi empregada pela primeira vez a técnica de formação de filmes monomoleculares, que possibilita o estudo das propriedades da hialuronidase em um sistema organizado e controlado, de forma a caracterizar esta proteína em um sistema *in vitro*, similar à membrana plasmática. A hialuronidase é uma enzima que atua principalmente na interface como, por exemplo, no processo de fertilização, portanto é de interesse a avaliação do comportamento desta enzima em interfaces, o que favorece um estudo do comportamento catalítico da hialuronidase em condições similares às aquelas encontradas *in vivo*.

CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica - Hialuronidase

2.1 Introdução

Neste capítulo apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre a enzima hialuronidase, discutindo diferentes aspectos, como por exemplo, propriedades, aplicações, fontes da proteína, extração e a purificação da proteína proveniente de diversas fontes, bem como a produção desta proteína por métodos como a clonagem e a expressão em células recombinantes. Neste capítulo também serão abordados diferentes métodos de quantificação da sua atividade enzimática e serão discutidas, as propriedades, as aplicações e fontes do ácido hialurônico, principal substrato da hialuronidase.

2.2 Hialuronidase

2.2.1 – Características da Hialuronidase

A hialuronidase foi descoberta por Duran Reynals em 1928 (FISZER-SZAFARZ, 1984). Em 1936, Meyer e colaboradores observaram a atuação desta proteína como fator difusivo, denominada assim por se tratar de uma enzima que facilita o transporte de moléculas através da matriz extracelular. Anos mais tarde, a proteína foi chamada de hialuronidase (MALMGREN, 1953). De acordo com MIO *et al.* (2000) e KREIL (1995), apesar de ter sido descoberta em 1928 e estar presente em quase todos os órgãos dos mamíferos, participando de importantes processos, como por exemplo, a fertilização, nos últimos anos, poucos são os estudos realizados sobre a hialuronidase.

Porém, é importante salientar que nos últimos quatro anos observa-se um crescente aumento das publicações envolvendo a hialuronidase e o ácido hialurônico.

Por muitos anos, o termo hialuronidase tem sido sinônimo de fator de difusão e, embora toda hialuronidase extracelular seja realmente um fator de difusão, vale salientar que nem todo fator de difusão é uma hialuronidase. Recentemente, o termo hialuronidase tem sido empregado para descrever enzimas que são capazes de romper o ácido hialurônico, embora algumas destas enzimas também sejam capazes de clivar sulfetos de condroitina (HYNES e WALTON, 2000; HYNES *et al.*, 2000; AZEREDO *et al.*, 2001; HOVINGH e LINKER, 1999; MENZEL e FARR, 1998). As enzimas hialuronidasas são classificadas segundo o tipo de clivagem do substrato em três tipos:

1 – Hialuronato-4-glicanohidrolases (EC 3.2.1.35), também denominada PH20, são as hialuronidasas do tipo testicular, encontradas nos espermatozóides dos mamíferos, lisossomais e no veneno de vários insetos e cobras. CHERR *et al.* (1996) observaram a presença de dois tipos de hialuronidasas (PH-20) em espermatozóides de macacos, uma de 64 kDa e outra de 53 kDa, sendo que a primeira apresentava-se ativa em diferentes valores de pH, apresentado um pH ótimo em torno de 7,0 e a segunda de 53 kDa somente exibia atividade em pH ácido (4,0). Este tipo de hialuronidase atua principalmente sobre o ácido hialurônico, sendo que algumas podem também clivar sulfetos de condroitina. O modo de ação desta classe de enzima tem como produto final da reação enzimática polissacarídeos tetra- e hexa-sacarídeos.

2 - Hialuronato-3-glicanohidrolase (EC 3.2.1.36), que é produzida por sanguessuga e algumas minhocas. Este tipo de hialuronidase apresenta sua ação catalítica somente sobre a cadeia de ácido hialurônico (MENZEL e FARR, 1998), assim como as hialuronidasas do tipo 1, esta classe de hialuronidasas através da reação enzimática rompe o ácido hialurônico produzindo polissacarídeos tetra- e hexa-sacarídeos.

3 – Hialuronidases de bactérias ou hialuronato liases (EC 4.2.2.1 ou EC 4.2.99.1). Estas por sua vez degradam o ácido hialurônico através da reação de β -eliminação na qual as ligações insaturadas α, β são quebradas, tendo como produto final da reação o ácido úrico (HOVINGH e LINKER, 1999). Este tipo de hialuronidase normalmente não é recomendado para usos terapêuticos, pois a etapa de purificação, deste tipo, comparada com as do tipo 1, é dispendioso devido à presença de grandes quantidades de endotoxinas no caldo fermentado.

O modo de atuação da hialuronidase sobre o ácido hialurônico está representado de forma simplificada nas Figuras 2.1, 2.2 e 2.3, observa-se que as hialuronidase do tipo 1 e 3 atuam sobre o ácido hialurônico quebrando a ligação β -1-4 (Figura 2.1 e 2.3), enquanto que as hialuronidase do tipo 2 clivam o ácido hialurônico na ligação β -1-3 (Figura 2.2).

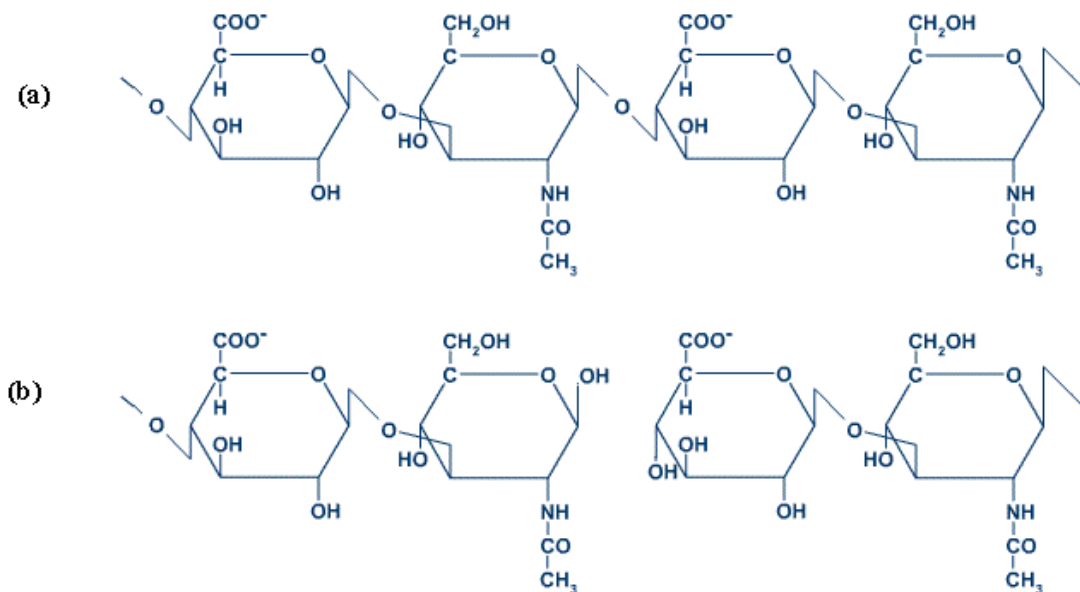


Figura 2.1 – Estrutura do ácido hialurônico e produto após a clivagem através da ação de lise da hialuronidase do tipo 1 (testicular, lisossomal ou proveniente de veneno), adaptada de VERCRUYSSSE *et al.* (1995).

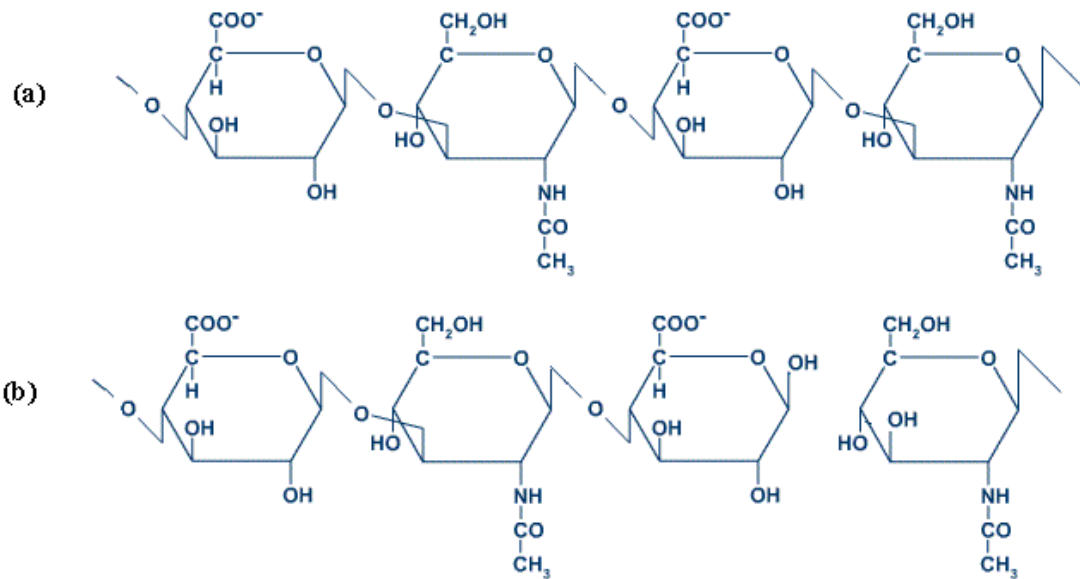


Figura 2.2 – Estrutura do ácido hialurônico e o produto após a clivagem através da ação de lise da hialuronidase do tipo 2 (de sanguessuga e de minhocas), adaptada de VERCRUYSSSE *et al.* (1995).

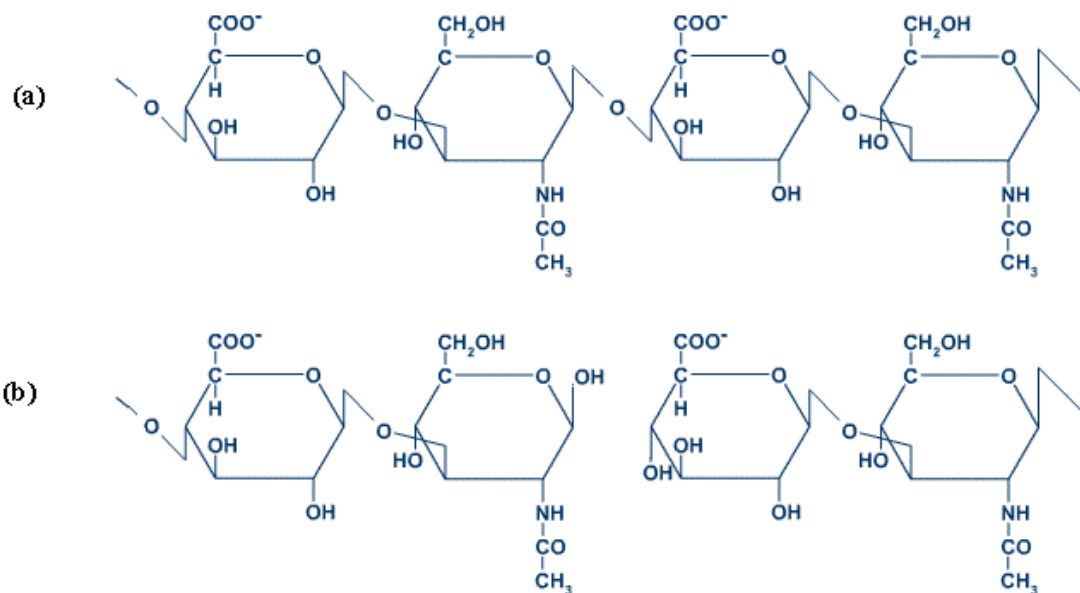


Figura 2.3 – Estrutura do ácido hialurônico e a estrutura sendo clivada através da ação de lise da hialuronidase do tipo 3 (de bactérias), adaptada HOVING e LINKER (1999).

A hialuronidase do tipo 3 é produzida por quase todos microorganismos patogênicos, por exemplo: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium perfringens*, etc (HYNES e WALTON,

2000). Poucas exceções, como os actinomicetos (família de bactérias gram-positivas) não produzem a hialuronidase (AZEREDO *et al.*, 2001). Em microorganismos gram-negativos esta enzima é produzida no periplasma e posteriormente excretada para o meio extracelular (YILDIRIM *et al.*, 2002).

A hialuronidase produzida por microorganismos patogênicos funciona como agente difusivo, facilitando a penetração de moléculas através da pele. Além disto existe a possibilidade de a hialuronidase participar do metabolismo intracelular de microorganismos patogênicos. Neste caso, a ação de clivagem do ácido hialurônico (molécula polimérica) serviria para transformar esta macromolécula em pequenos dissacarídeos, que seriam facilmente absorvidos pelo microorganismo. Neste caso, a enzima passaria a ter um papel fundamental no crescimento celular (HYNES e WALTON, 2000).

As hialuronidases apresentam características importantes como: ponto isoelétrico, o tamanho e o pH ótimo de atividade, variando de acordo com a espécie e a origem desta enzima (vide Tabela 2.1). Observa-se ainda, que para uma mesma proteína, de acordo com a forma de extração e purificação aplicada, variações em uma propriedade podem ser encontradas. Por exemplo, MALMGREN (1953) observou que a hialuronidase testicular extraída, empregando três métodos similares, porém que se diferenciam nas etapas posteriores ao fracionamento com sulfeto de amônia, ou seja na etapa de purificação, apresentavam ponto isoelétrico diferente. O trabalho de MALMGREN (1953), pode ser resumidamente descrito da seguinte forma:

A hialuronidase *a* (purificada por Hahn), utiliza precipitações seguidas com soluções de sulfato de cobre, cloreto de sódio e acetato de chumbo visando a remoção do material inativo e finalizando com uma reprecipitação com sulfato de amônia. Para a obtenção da hialuronidase *b* (purificada por Tint e Bogash), foi realizado o fracionamento seqüencial, primeiro com sulfato de amônia e depois com álcool a frio, seguido do refractionamento do precipitado. A hialuronidase *c* (purificada por Hogberg), é obtida pela extração com clorofórmio após o fracionamento com sulfato de amônia e purificada por eletroforese. MALMGREN (1953) observou que as hialuronidases apresentam diferentes pontos isoelétricos, sendo 5,7, 5,9 e 6,5 para os tipos *a*, *b* e *c*, respectivamente.

Observa-se ainda uma variação maior do pI quando a hialuronidase é proveniente de fontes diferentes. Por exemplo: a hialuronidase da placenta humana apresenta o pI = 5,2 (YAMADA *et al.*, 1977), do veneno de tarântula [*Dugesia hentzi* (Girard)] pI = 6,9 (SCHANBACHER *et al.*, 1973), do veneno de abelha (*apis mellifera*) pI = 9,0 (KEMENY *et al.*, 1984) e a do fígado de porco pI = 5,0 (JOY *et al.*, 1985).

A Tabela 2.1 apresenta as principais características das diferentes hialuronidasas encontradas.

Tabela 2.1 - Principais características e propriedades das diferentes hialuronidasas

<i>Tipo</i>	<i>pH</i> <i>ótimo</i>	<i>Origem</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Particularidade</i>	<i>Fonte</i>
Hyal-1	4,0	Plasma, urina, fígado, rins, baço, e coração dos mamíferos.	57 kDa	Primeira hialuronidase a ser purificada dos tecidos dos mamíferos	Csoka <i>et al.</i> , 2001
Hyal-2	4,0	Membrana plasmática, tecidos somáticos.			Csoka <i>et al.</i> , 2001
Hyal-3	4,0	Coluna vertebral, testículos			Csoka <i>et al.</i> , 2001
Hyal-4		Placenta e músculos		Primeira Condroitinase identificada nos tecidos dos vertebrados.	Csoka <i>et al.</i> , 2001
PH-20	7,0 e 4,0	Testículos e espermatozoides dos mamíferos.	64 kDa (pH 7) e 53 kDa (pH 4)	A atividade desta enzima pode ser inibida por apigenina	Csoka <i>et al.</i> , 2001
PH-20	4,3	Testículo de Carneiro	62 kDa		Yang e Srivastava 1974

Tabela 2.1 – Continuação

PH-20		Espermatozóide de Coelho	55 kDa		Polakoski <i>et al.</i> , 1972
PH-20		Testículo Bovino	61 kDa		Zaneveld <i>et al.</i> , 1973
Hialuronidase de bactérias		<i>S. agalactiae</i>	121 kDa		Hynes e Walton, 2000
Hialuronidase de bactérias		<i>S. pneumoniae</i>	107 kDa		Hynes e Walton, 2000
Hialuronidase de bactérias		<i>S. aureus</i>	92 kDa		Hynes e Walton, 2000
Hialuronidase de bactérias		<i>P. acnes</i>	82 kDa		Hynes e Walton, 2000
Hialuronidase de Aranha	5,0 a 6,6	Veneno da aranha marron (<i>Loxosceles laeta</i>)	63 kDa 33 kDa	Esta enzima é inibida na presença de Fe ⁺³ e Cu ⁺²	Wright <i>et al.</i> , 1973
Hialuronidase de Escorpião	4,5	Veneno de Escorpião preto da Índia (<i>Palamaneus Gravimanus</i>)	52 kDa		Morey <i>et al.</i> , 2006
Hialuronidase de tarântula	3,5	Veneno da tarântula (<i>Dugesiella hentzi</i> (Girard))	39,6 kDa	Maior constituinte do veneno da tarântula	Schanbacher <i>et al.</i> , 1973
Hialuronidase de Peixe	6,0	Peixe (<i>Synanceja horrida</i>)	64 kDa	Primeira hialuronidase aquática que foi clonada e caracterizada.	Ng <i>et al.</i> , 2005

2.2.2 – A Hialuronidase e o Homem

A hialuronidase está presente em todos os mamíferos (BORDERS e RAFTERY, 1968). Como já mencionado anteriormente, no corpo humano ela é encontrada nos testículos, no baço, na pele, nos olhos, no fígado, nos rins, no útero e na placenta (MENZEL e FARR, 1998). Em seres humanos e ratos existem seis genes que podem expressar a hialuronidase, agrupados em dois grupos de três, de acordo com os sítios cromossômicos 3p21.3 e 7q31.3. No primeiro sítio, localizam-se os seguintes genes HYAL1, HYAL2 e HYAL3, já no segundo sítio estão os genes HYAL4, PH20/SPAM1 e HYALP1 (CSOKA *et al.*, 2001).

A Hyal-1 (produzida através do gene HYAL1) está presente no plasma, na urina, e em níveis elevados no fígado, nos rins, no baço e no coração. A Hyal-2 (produzida através do gene HYAL2) juntamente com a Hyal-1 constituem a maioria das hialuronidases presentes nos tecidos somáticos. Pouco se conhece da Hyal-3 (produzida através do gene HYAL3), admite-se que seja um forte modelo de expressão, sendo formada na coluna vertebral e nos testículos. A Hyal-3 de ratos possui aproximadamente 80% da seqüência de aminoácidos idêntica à dos humanos. Uma grande quantidade de aminoácidos idênticos é também observada entre a Hyal-1 dos ratos e do seres humanos, havendo cerca de 73% de homologia entre elas (CSOKA *et al.*, 2001).

A Hyal-2 apresenta sua atividade em pHs ácidos, tendo uma de suas formas ligada à membrana celular através de uma ligação com a molécula de GPI (glicosilfosfatidilinositol), apresentando também uma forma solúvel, sendo que a diferença funcional das duas isoformas ainda não é conhecida (STERN 2004). A Hyal-2 cliva moléculas de ácido hialurônico de massa molar muito elevada, obtendo-se como produto moléculas de tamanho aproximado de 20 kDa, mais ou menos 50 unidades de dissacarídeos. Por sua vez a Hyal-1, que tem estrutura semelhante a Hyal-2, é capaz de clivar moléculas do ácido hialurônico com elevada massa molar, transformando-o em moléculas bem pequenas, apresentando uma predominância de tetrasacarídeos no produto final. Apesar de a Hyal-1 e a Hyal-2 apresentarem estruturas moleculares

semelhantes, esta diferença de massa molecular no produto final da reação ainda permanece não elucidada (STERN 2004).

A PH-20 é encontrada na membrana plasmática dos espermatozoides de homens, macacos, porcos da Índia e ratos. Além disso, a hialuronidase do testículo bovino é uma provável PH-20 (CHERR *et al.*, 1996). A hialuronidase testicular, PH-20/SPAM1, desempenha um papel muito importante durante o processo de fertilização do óvulo pelo espermatozoide, facilitando a penetração do espermatozoide, através do rompimento do ácido hialurônico, que é o principal constituinte da membrana do gameta feminino. Segundo MARTIN-DELEON (2006) a PH-20/SPAM1, assim como a Hyal-2, apresenta uma forma ligada a um GPI.

Devido a sua eliminação antecipada, a sexta sequência HYALP1 é um pseudo gene em humanos, causando uma terminação prematura do código. CSÓKA *et al.* (2001) sugeriram que ocorreu uma mutação na sequência humana, o que indica que o HYALP1 pode ter sido degenerado somente há pouco tempo, da escala evolutiva, em um pseudogene, podendo ser funcional em outras espécies. Humanos e ratos possuem 68% da cadeia de aminoácidos desta proteína idênticas.

CSÓKA *et al.* (1997) purificaram a hialuronidase da urina humana, a qual mostrou duas formas, uma de 57 kDa e outra de 45 kDa, enquanto o plasma apresenta somente a hialuronidase de massa molar 57 kDa. A hialuronidase de 45 kDa tem sua atividade em pH ácido, comum a este tipo de enzima, enquanto que as enzimas do plasma e as testiculares apresentam maior atividade em pH neutro (FROST e STERN, 1997).

2.2.2-1 – Hialuronidase Testicular de Mamíferos

Os primeiros pesquisadores que identificaram a hialuronidase no espermatozoide foram McCLEAN e HOFFMANN 1931 e DURAN-REYNALS em 1931. Posteriormente, esta enzima foi associada ao acrossomo (estrutura presente na região anterior da cabeça de espermatozoide). Segundo ZANEVELD *et al.* (1973), a quantidade de hialuronidase presente no espermatozoide dos mamíferos é diferenciada

para cada espécie. Comparando-se alguns mamíferos, Zaneveld *et al.* (1973) observaram que a quantidade de hialuronidase presente nos testículos destes mamíferos diminuem na seguinte ordem: carneiro, coelho, boi, homem, javali e rato. Os pesquisadores também estudaram o esperma do galo e não observaram a presença de hialuronidase.

A seqüência de aminoácidos da hialuronidase testicular (PH-20) apresenta 36% de homologia com a hialuronidase encontrada em veneno de abelha, o que corresponde a uma região de 300 aminoácidos, na qual encontra-se o sítio ativo da proteína, que é idêntico para as duas formas de hialuronidase (CHERR *et al.*, 1996).

Segundo ZANEVELD *et al.* (1973), a hialuronidase proveniente do esperma é idêntica à hialuronidase testicular, porém é significativamente diferente da hialuronidase lisossomal encontrada em outros tecidos.

A hialuronidase do testículo do boi apresenta um pH ótimo 6,75. De acordo com ZANEVELD *et al.* (1973), este tipo de hialuronidase pode ser armazenada sob refrigeração, em freezer e/ou geladeira, sem sofrer alteração nas suas propriedades. Esta enzima sofre desnaturação quando é colocada em pH abaixo de 3,0 ou em temperaturas acima de 50 °C. A hialuronidase testicular requer pequenas quantidades de sal para permanecer estável, da ordem de micro gramas, porém, sua atividade não é inibida na presença de íons Fe^{++} , Fe^{+++} ou heparina e apresenta inibição na presença dos íons Mn^{++} , Mg^{++} e Ca^{++} em concentrações 0,1M, também é inibida na presença de EDTA.

2.2.3 - Extração e Purificação da Hialuronidase

O processo de extração da hialuronidase é bastante antigo. Desde a década de 50 já se fazia a extração da hialuronidase testicular (BORDERS e RAFTERY, 1968). Este processo ainda é muito estudado, especialmente no que se refere as fontes e os métodos empregados. KRISHNAPILLAI *et al.* (1999), estudaram a extração da hialuronidase do hepatopâncreas de lagostas. Entretanto, a hialuronidase mais empregada é geralmente obtida dos testículos bovinos e ovinos ou de bactérias.

BORDERS e RAFTERY (1968) purificaram a hialuronidase testicular utilizando colunas cromatográficas com resinas de troca iônica (bio-Rex 70) e de filtração em gel (Sephadex G-75). Como resultado, obtiveram a proteína com atividade de 45.500 unidades/mg. As etapas da purificação estão descritas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Purificação da hialuronidase testicular (BORDERS e RAFTERY, 1968).

Passo	Quantidades recuperadas			Atividade enzimática (U/ mg proteína)	Atividade relativa	Rendimento %
	Volume (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Massa de Proteína (mg)			
Caldo enzimático			25880	280	1,0	100
Bio –Rex 70			2130	2300	8,2	67,6
Primeira passagem na Sephadex em 0,1 M NaCl	40	2,85	114	21600	77	34,2
Segunda passagem na Sephadex em 0,1 M NaCl	70	0,89	62	31100	111	26,6
Terceira passagem na Sephadex em água	90	0,32	28,8	45500	163	18,1

As etapas empregadas por OHYA e KANEKO (1970), no processo de purificação da hialuronidase de *Streptococcus hyalurolyticus*, estão descritas na Tabela 2.3, que ilustra os tipos de coluna utilizados, bem como a atividade total e específica da enzima. Para quantificação da atividade enzimática os autores empregaram o método de turbidez, este método é bastante empregado para hialuronidasas do tipo 1 e 2, porém não é usual o seu emprego para este tipo da enzima (hialuronidasas do tipo 3).

Tabela 2.3 – Extração e purificação da hialuronidase de *Streptococcus hyalurolyticus* (OHYA e KANEKO, 1970).

Passo	Atividade total	Atividade específica (unidades/mg proteína)
Caldo da cultura	400.000	13
Fracionamento alcoólico	287.500	59
Duolite A-2	250.000	192
Duolite ES-33	238.000	384
Duolite ES-80	151.200	8.308
Celulose – DEAE	114.800	17.500
Celulose - CM	95.600	63.733

WRIGHT *et al.* (1973) estudaram os componentes do veneno da aranha marrom (*Loxosceles laeta*) e separaram duas hialuronidasas, utilizando colunas cromatográficas de filtração em gel (Sephadex) e eletroforese (pH 8.3), obtendo um extrato com atividade final de 200-250 U/mg.

YANG e SRIVASTAVA (1974) separaram e avaliaram as propriedades da hialuronidase do espermatozóide de carneiro, utilizando na separação uma coluna Sephadex G-100, seguida de uma coluna de DEAE-celulose, obtendo um rendimento de 53,5% na primeira e 22,4% na segunda, com atividade específica (N.F) de 269 e 1320, respectivamente. Os autores observaram que a hialuronidase permanecia estável à temperatura ambiente por vários dias, apresentando um pH ótimo de atividade em 4,3.

YANG e SRIVASTAVA (1975) purificaram a hialuronidase do espermatozóide bovino, utilizando sulfato de amônia no fracionamento e colunas de DEAE-celulose e Sephadex na etapa de purificação. Foi obtida a proteína com atividade (68,73 N.F unidades por mg de proteína) e rendimento de 2%.

Outra fonte de hialuronidase testicular bastante estudada é a hialuronidase do testículo do rato. GUPTA e GOLDBERG (1981) extraíram e isolaram a hialuronidase do testículo do rato, através de um fracionamento com sulfato de amônia e separação por cromatografia de troca iônica, de filtração em gel e cromatografia de afinidade. No

final do processo de purificação, a enzima apresentava 12,2 unidades de atividade (N.F). A proteína era relativamente estável à temperatura na faixa de 50-55 °C por 10 min. Os rendimentos e a atividade para cada etapa da purificação estão apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Extração e purificação da hialuronidase do testículo de rato (GUPTA e GOLDBERG, 1981).

Passo	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/ mg proteína)	Atividade relativa	Rendimento (%)
Atividade inicial, após o tratamento com detergente	2387	316	0,13	1	100
Fracionamento (NH₄)SO₄	400	166	0,41	3	63
DEAE-Celulose	109	118	1,02	8	37
Filtração (Sephadex G-200)	21	68	3,24	25	22
Cromatografia de afinidade (Concanavalina)	5	61	12,2	94	19

Na literatura a maioria dos trabalhos que estudam a purificação da hialuronidase, independente da fonte, utilizou colunas de filtração em gel, DEAE-celulose e/ou Sephadex.

O primeiro trabalho na literatura que utilizou a hidroxiapatita como adsorvente na purificação de hialuronidase foi realizado por ARONSON e DAVIDSON (1967). Estes pesquisadores utilizaram uma coluna cromatográfica para purificar a hialuronidase do fígado de rato e observaram que a hialuronidase apresentava pouca afinidade com a hidroxiapatita, e que a maioria das outras proteínas presentes no extrato, adsorviam fortemente à coluna. A eluição foi conduzida em tampão fosfato pH 7,4 0,2 M. Os autores ainda registraram dificuldades em obter a reprodutibilidade dos resultados na coluna de hidroxiapatita.

MARGOLIS *et al.* (1972) também utilizaram uma coluna de hidroxiapatita durante a etapa de purificação da hialuronidase do cérebro bovino e do cérebro de rato. Os resultados mostraram que, apesar de ocorrer a adsorção da hialuronidase, a mesma

não pode ser eluída utilizando tampão fosfato (pH 7,4 e concentração de 0,2 M). Observaram, ainda que a hialuronidase apresentava um pH ótimo de atividade em 3,7 perdendo sua atividade em pH maior que 4,5.

A hidroxiapatita também foi utilizada na purificação da hialuronidase do fígado humano por GOLD (1982). O resultado obtido neste trabalho foi bem diferente dos dois anteriores (MARGOLIS *et al.*, 1972; ARONSON e DAVIDSON, 1967). Apesar de ARONSON e DAVIDSON (1967) terem trabalhado com a hialuronidase do fígado de rato, GOLD conseguiu obter uma boa separação quando utilizou a hidroxiapatita como adsorvente, como apresentado na Tabela 2.5. A enzima apresenta um pH ótimo de 3,8-4,0 e o massa molar de 76.000 kDa, determinada por filtração em gel.

Tabela 2.5 - Extração e purificação da hialuronidase de fígado humano

Passo	Atividade específica (U/mg)	Passo de Purificação	Rendimento %
Tecido homogeneizado	0,027	1,0	100,0
Fracionamento com (NH₄)SO₄	0,120	4,3	96,0
Cromatografia de hidroxiapatita	1,10	39,6	82,0
DEAE - celulose	5,50	203,0	44,0
Eletroforese (gel de poliacrilamida)	25,0	960,0	5,0

2.2.4 – Hialuronidase Recombinante

Nos últimos anos, a clonagem de genes de certos organismos tem sido feita com frequência e com êxito na maioria dos casos. O microorganismo hospedeiro mais comum é a bactéria *Escherichia coli*, por se tratar de uma bactéria bem conhecida e cujo genoma já foi seqüenciado. Desta forma, a hialuronidase pode ser produzida por via bacteriana em *E. coli*, sem os riscos oriundos dos cultivos com microorganismos patogênicos. HYNES *et al.* (2000) clonaram o gene da hialuronidase de *Streptococcus pyogenes* em *E. coli*, porém, a hialuronidase produzida não apresentou atividade.

FARRELL *et al.* (1995) clonaram o gene da hialuronidase de *Streptococcus aureus* em *E. coli* e obtiveram a hialuronidase com massa molar de 94 kDa, porém com baixa atividade enzimática.

Como já descrito anteriormente, a Hyal-2 apresenta duas isoformas, sendo que uma delas apresenta uma molécula de GPI ancorada. CHOW *et al.* (2006) clonaram esta enzima e expressaram em células humanas (fibroblastos), porém os autores observaram que as moléculas expressas não apresentavam sua funcionalidade na membrana plasmática externa. Esta falta de funcionalidade foi atribuída ao fato de que a enzima expressa não apresentava o GPI ancorado (CHOW *et al.*, 2006).

STAIR NAWY *et al.* (1999) conseguiram expressar a hialuronidase em fibroblastos da pele humana (HS27), com atividade equivalente a atividade da Hyal-1. BOOKBINDER *et al.* (2006) estudaram a produção de hialuronidase recombinante, após clonarem a PH-20 humana, eles também observaram que a enzima clonada apresentava atividade semelhante à apresentada pela enzima nativa. NAGY (2005) realizou um estudo comparativo entre a hialuronidase bovina e uma recombinante humana, empregando ambas no processo de fertilização de ratos. De acordo com o autor, a hialuronidase recombinante mostrou-se tão eficiente quanto a hialuronidase nativa.

Assim como a produção de hialuronidase a de ácido hialurônico sintase também vem sendo estudada através de expressão em células humanas. ADAMS *et al.* (2006) estudaram a expressão de algumas enzimas ácido hialurônico sintase 1, 2 e 3, e de varias hialuronidases Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4 e PH20 em células do osteoblasto (MG63). Os autores observaram que algumas das proteínas não foram expressas (ácido hialurônico sintase 1, 2; Hyal-1 e PH20). As outras formas que foram expressas não apresentavam-se plenamente ativas.

2.2.5 – Aplicações da Hialuronidase

As hialuronidases de testículos bovinos e ovinos têm sido utilizadas na técnica de fertilização *in vitro*, para a digestão da membrana que circunda o óvulo de vários mamíferos (GMACHL *et al.*, 1993).

Devido à habilidade da hialuronidase em clivar o ácido hialurônico, esta proteína tem sido utilizada principalmente em aplicações médicas, facilitando a difusão de drogas e anestésicos em tecidos ricos neste composto. Vários trabalhos têm sido realizados, buscando a confirmação desta aplicação da hialuronidase (AOKI *et al.*, 2005; MOLNAR *et al.*, 2004). ALWITRY *et al.* (2002) estudaram a aplicação de pequenas quantidades de hialuronidase associadas a um anestésico em cirurgias oculares. Os resultados mostraram que as diferenças só são sensíveis até os primeiros cinco minutos. Resultado muito importante, uma vez que este tempo é suficiente para atuação do princípio ativo do anestésico.

Para fins terapêuticos somente a hialuronidase com elevado teor de pureza (quantificada pela sua atividade enzimática) pode ser utilizada. A hialuronidase testicular com elevada pureza possui cerca de 40.000 a 50.000 IU/mg. As contaminações mais frequentes nos extratos de hialuronidase são proteases e glucoronidases (MENZEL e FARR, 1998).

O emprego clínico da hialuronidase do testículo de boi tem sido avaliado, associado a drogas específicas, no tratamento de infarto do miocárdio. Nestes casos, a hialuronidase é utilizada para facilitar a penetração da droga no tecido. Testes clínicos em progresso na Inglaterra têm mostrado que a hialuronidase testicular tem reduzido significativamente a mortalidade de pacientes com infarto do miocárdio (FLINT *et al.*, 1982).

SPALLICCI *et al.*, 2005 e SURITA *et al.*, 2005 realizaram estudos visando a utilização da hialuronidase em mulheres com problemas durante o parto. Os pesquisadores afirmaram que o emprego da enzima mostrou-se muito eficaz e seguro mesmo nos casos de mulheres em que a cesariana era recomendada. FELDMAN *et al.* (2006) estudaram o efeito da hialuronidase no tratamento de feridas na pele humana.

Neste processo a enzima atuou como agente difusivo para uma melhor penetração das drogas ativas. Segundo os autores, a hialuronidase mostrou-se muito eficiente.

A utilização da hialuronidase vem sendo avaliada no tratamento de fímose (FREITAS *et al.*, 2006). Estes estudos foram realizados com a utilização de um creme contendo 0,2% de hialuronidase mais o princípio ativo. Este método apresentou-se eficiente após oito semanas de tratamento. Esta enzima também vem sendo utilizada no tratamento de feridas (SALAMEH e SHOUFANI, 2004).

DIDOLKAR *et al.* (1980) estudaram o efeito do ácido acetilsalicílico e metamizol na atividade da hialuronidase em espermatozoides de ratos e observaram que ocorre uma diminuição da atividade e na quantidade da hialuronidase. TANYILDIZI e BOZKURT (2003), e TANYILDIZI e TURK, (2004) em trabalhos semelhantes com espermatozoides de carneiros, obtiveram resultado contraditório ao encontrado por DIDOLKAR *et al.* (1980).

Tem sido estudado o comportamento da hialuronidase em tecidos cancerígenos. Observou-se um aumento excessivo de ácido hialurônico, substrato da hialuronidase, nestes tecidos (LIU *et al.*, 2001; CSOKA *et al.*, 2001). A elucidação do mecanismo de ação da hialuronidase nestes tecidos, ainda não foi bem esclarecido (PODYMA *et al.*, 1997).

O nível de ácido hialurônico está freqüentemente correlacionado com a agressividade do tumor, quanto maior a quantidade de ácido hialurônico encontrado nestes tecidos mais agressivo é o tumor (ZHANG *et al.*, 2004). Nestas regiões existe uma baixa atividade da hialuronidase, o que pode significar um passo importante no avanço do processo cancerígeno, uma vez que há um acúmulo de ácido hialurônico. MATOUSEK *et al.* (2004), estudando o efeito combinado da hialuronidase e do polietilenoglicol, observaram que o emprego desta proteína era benéfico ao tratamento de células tumorais.

CHRISTOPOULOS *et al.* (2006) estudaram a presença da hialuronidase, bem como do ácido hialurônico em tecidos cancerígenos. De acordo com a análise dos autores, a migração e a proliferação de células cancerígenas sofrem a influência de

pequenas moléculas de ácido hialurônico que podem propagar um aumento de tecidos cancerígenos.

É importante enfatizar que o papel da hialuronidase e do ácido hialurônico em células cancerígenas ainda não foi bem explicado. Estudos da presença da hialuronidase e do ácido hialurônico em pacientes com câncer de bexiga vêm sendo realizados e mostram que a presença da hialuronidase e do ácido hialurônico é elevada na urina dos pacientes com câncer (ABOUGHALIA, 2006; SCHROEDER *et al.*, 2004). A presença de grandes quantidades da hialuronidase e do ácido hialurônico em outros tipos de câncer também é reportada na literatura (DAVID *et al.*, 2004).

STERN (2005) apresentou um estudo detalhado da presença da hialuronidase e do ácido hialurônico em tecidos cancerígenos. O autor atribui a presença elevada do ácido hialurônico nestes tecidos à quantidade elevada das enzimas 1 e 3 ácido hialurônico sintase, responsáveis pela produção de ácido hialurônico nestas células. O autor ainda registra que a enzima ácido hialurônico sintase – 2, em contraste com as outras duas proteínas, inibe o crescimento do tumor. Quanto à presença da hialuronidase, STERN (2005) descreve separadamente a presença e a influência de cada hialuronidase, sendo que a Hyal -1 apresenta evidências de seu efeito anti-câncer. A elevada expressão da enzima Hyal-2 acelera a formação de alguns tumores. PH20 é citada na literatura tanto pela sua presença em tumores malignos, como na diminuição de crescimento tumoral junto com a Hyal-1. O Papel da Hyal-3 em células tumorais foi descrito por PAIVA *et al.* (2005), evidenciando que está enzima esta associada à progressão do câncer de útero.

Observa-se que nos últimos dois anos ocorreu um avanço considerável no entendimento do papel da hialuronidase e do ácido hialurônico em células cancerígenas, o trabalhos de STERN (2005) é um marco neste avanço. Porém, é importante observar que ainda há muito a ser esclarecido neste sentido.

Poucos casos de alergia a hialuronidase foram relatados até os dias atuais. MUSA *et al.* (2006) observaram um caso de inflamação ocular, após uma cirurgia realizada em uma paciente de 50 anos. Os autores atribuem esta inflamação ao emprego da hialuronidase, proveniente da CP Pharmaceuticals, durante o processo cirúrgico.

Contudo, a alergia à hialuronidase não é uma ocorrência comum. Outro caso relatado de inflamação ocular ocorreu com uma paciente de 70 anos após uma cirurgia (QUHILL *et al.*, 2004). Na França, o emprego da hialuronidase neste tipo de cirurgia está proibido (RIPART e NOUVELLON, 2004).

MENZEL e FARR (1998) observaram que a hialuronidase é rapidamente eliminada do plasma. Cerca de 45 minutos após uma injeção de 5000 IU por grama de massa corporal, toda hialuronidase injetada havia sido excretada na urina.

A hialuronidase tem importância fundamental no processo de tenderização na indústria alimentícia, atuando como fator difusivo dos condimentos (WU *et al.*, 1982).

2.3 Ácido Hialurônico

2.3.1 - Características do Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (HA) é uma molécula de polissacarídeo de alta massa molar (média de 10.000 g / gmol), composta de unidades repetidas dos dissacarídeos, ácido glucurônico e N-acetil-glucosamina. Esta substância é essencial para manter a integridade da matriz extracelular. Alterações em sua estrutura e concentração podem afetar numerosas funções celulares como fagocitose, proliferação e diferenciação (FISZER-SZAFARZ, 1984). Esta molécula também é conhecida por causar distúrbios nos seres humanos, tais como artrite reumática, e facilitar o crescimento de metástases cancerígenas e proliferação de células (IKEGAMI-KAWAI e TAKAHASHI, 2002).

Sendo o maior componente da matriz extracelular, o ácido hialurônico tem sua concentração rapidamente aumentada na circulação em resposta a estresse agudo, trauma, e em tecidos de reparos como em queimaduras e infecções (CSOKA *et al.*, 2001; MIO *et al.*, 2000). O aumento da concentração do ácido hialurônico está provavelmente relacionado ao mecanismo de defesa. O ácido hialurônico também participa da manutenção da matriz estrutural, bem como no balanço de água e troca de eletrólitos. Observou-se também que o ácido hialurônico tem se mostrado essencial para

o crescimento celular, embriogênese e locomoção celular (PODYMA *et al.*, 1997; STERN 2004).

A Figura 2.4a apresenta a estrutura tridimensional do ácido hialurônico onde os átomos de carbono estão apresentados em cinza, os de oxigênio em vermelho e os de nitrogênio em azul. A Figura 2.4b mostra um esquema do ácido hialurônico, com base em fotos de microscopia eletrônica, presente nos tecidos da epiderme, associado a outras moléculas.

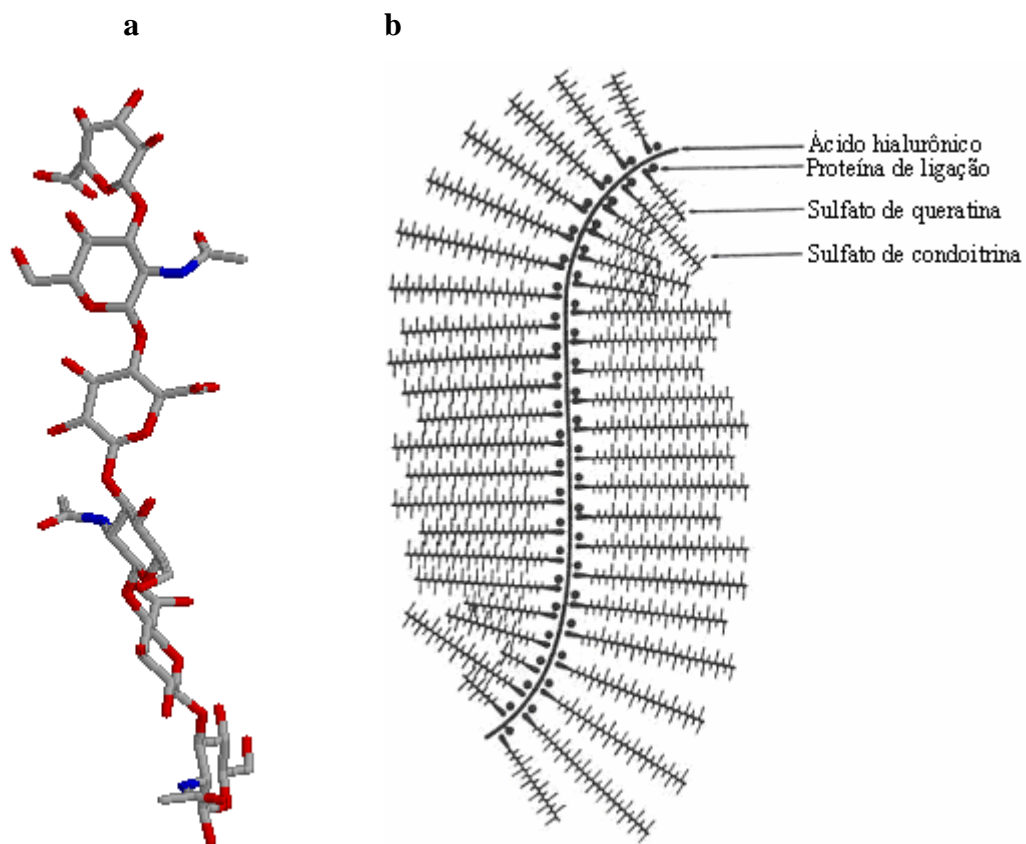


Figura 2.4 – (a) Estrutura do ácido hialurônico em três dimensões (adaptada da página www.pdb.ufmg.br, acesso 14/05/2004); (b) Esquema da cadeia do ácido hialurônico associada a outras moléculas, conforme encontrada na pele (adaptada de MURRAY, 1996, 24 ed).

Observam-se níveis elevados de ácido hialurônico em inflamações, edemas, inchação de órgãos transplantados, traumas, inflamação do miocárdio, ferimentos e em cânceres (CSÓKA *et al.*, 2001). No entanto poucos estudos têm sido conduzidos no

sentido de entender e explicar o papel do ácido hialurônico em processo infecciosos (STERN *et al.*, 2006), uma vez que pedaços da cadeia do ácido hialurônico podem ser responsáveis pela migração de células cancerígenas para regiões saudáveis dos organismos, pode-se imaginar que em processos infecciosos o ácido hialurônico possa exercer papel semelhante.

2.3.2 – Fontes de Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico é encontrado principalmente nos tecidos do corpo e nos fluidos dos organismos superiores, como no cordão umbilical, nas cartilagens, no cérebro e nos músculos, sendo o maior componente da matriz extracelular. Aproximadamente 50% do ácido hialurônico nos seres humanos se encontra na camada abaixo da pele (HYNES e WALTON, 2000). O ácido hialurônico encontra-se em alta concentração na crista de galo e é produzido por bactérias do gênero *Streptococcus* (HYNES e WALTON, 2000; LAURENT e FRASER, 1992), sendo que o ácido hialurônico isolado de qualquer uma destas fontes apresenta a mesma estrutura.

STERN *et al.* (2006) observaram que, em contraste com outro glicosaminoglicanos, o ácido hialurônico não é sintetizado no complexo de Golgi mas na superfície do citoplasma de membranas plasmáticas. O ácido hialurônico é transportado para fora da célula provavelmente por um caminho do sistema de transporte de resistência a multi-drogas. BLUNDELL e ALMOUND (2006) estudaram métodos enzimáticos e químicos para a produção do ácido hialurônico, porém, os resultados mostram um alto nível de impureza no produto final.

2.4 Atividade Enzimática da Hialuronidase

A atividade enzimática da hialuronidase é afetada por vários ativadores, dentre eles a adrenalina, a histamina e as fosfatases ácidas formadas na próstata, no baço, no rim, nos eritrócitos e na placenta, e inibidores como a heparina e a vitamina C (MENZEL e FARR, 1998).

Os métodos para determinar a atividade da hialuronidase, utilizando o ácido hialurônico como substrato, baseiam-se na redução da N-acetilglucosamina. Os métodos clássicos são os de turbidez e o de viscosidade. O método de turbidez foi desenvolvido por KASS e SEASTONE (1944) e TOLKSDORF *et al.* (1949), sendo que a quantificação da atividade se dá através de duas reações. A primeira é reação, onde a hialuronidase cliva o ácido hialurônico, tem tempo de reação de 10 minutos. Para a quantificação da atividade enzimática é realizada uma segunda reação, na qual o ácido hialurônico não digerido reage com uma solução de BSA hidrolisada. Esta reação também tem tempo de 10 minutos e o produto da segunda reação é uma solução turva. Para os testes é necessário o preparo de uma curva de calibração utilizando técnicas espectroscópicas, sendo o grau de turbidez associado a uma quantidade preestabelecida de ácido hialurônico.

NAGATA *et al.* (2004) desenvolveram um novo método para a quantificação da atividade da hialuronidase, o teste se baseia na massa molar do ácido hialurônico, utilizando ensaios de fluorescência. Apesar de já existirem outros métodos baseados em ensaios de fluorescência, os autores afirmam que o desenvolvido por eles é mais eficiente, apresentando resultados mais rápidos, proporcionando a análise de várias amostras num curto espaço de tempo.

BONNER *et al.* (1966) desenvolveram um método colorimétrico para determinar a atividade da hialuronidase, baseado na liberação de sacarídeos como o N-acetilglucosamina (NAG), grupamento liberado pela quebra do ácido hialurônico. A quantificação da atividade enzimática é realizada através da reação a quente do NAG com uma solução alcalina de tetraborato. O produto formado reage com p-dimetilaminobenzaldeído em meio ácido, que resulta em um produto colorido. Desde então, este método vem sendo utilizado com pequenas modificações (KOLAROVA e BRADA, 1969; KOLAROVA *et al.*, 1970; FISZER e GULLINO, 1970; SALKIE, 1971), porém, alguns pesquisadores chamam a atenção de que a atividade da hialuronidase quantificada através deste método é bastante sensível à variação de pH e das concentrações da proteína e do seu substrato (WILKINSON *et al.*, 1996).

CASHMAN *et al.* (1969) compararam as unidades enzimáticas da hialuronidase testicular, utilizando diferentes métodos, obtendo 100 USP para ensaios de redução, o

que corresponde a 90 unidades nos testes de turbidez e 6,1 unidades para atividades determinadas pelo método de viscosidade.

Alguns métodos de quantificação da atividade de hialuronidase são bem definidos como os apresentados por TOLKSDORF *et al.* (1949) e KASS e SEASTONE (1944). Entretanto, a atividade da hialuronidase sofre interferência na presença de vários agentes inibidores ou ativadores. WILKINSON *et al.* (1996) avaliaram a inibição da hialuronidase pelo próprio substrato, e observaram que a relação é negativa, ou seja, quanto maior a concentração de HA menor é a atividade da hialuronidase.

2.5 Inibidores da Atividade Enzimática da Hialuronidase

A inibição na atividade da hialuronidase já foi verificada desde a metade do século passado (HAAS, 1946; DORFMAN, 1948). Segundo MIO *et al.* (2000), estudos relacionados à inibição enzimática da hialuronidase foram quase que ignorados por cerca de 40 anos.

O mais conhecido dos inibidores de hialuronidase é o íon magnésio Mg^{2+} . Seu poder de inibição da atividade da hialuronidase foi descoberto e observado por FREEMAN *et al.* (1949). Estudos detalhados do mecanismo de inibição só foram realizados nos últimos anos (MIO e STERN, 2002; MIO *et al.*, 2000). Observa-se também que derivados de substâncias comuns, como a vitamina C, apresentam a capacidade de inibir algumas hialuronidases. SPICKENREITHER *et al.* (2006) estudaram o efeito do 6-O-hexadecanoato, um derivado do ácido ascórbico, na atividade da hialuronidase de bactéria e da hialuronidase bovina. Os autores observaram que este composto era um inibidor em potencial de ambas as hialuronidases.

MIO *et al.* (2000) estudando uma nova classe de inibidores, denominados intra- α -inibidores, observaram que estes “novos” inibidores apresentam massa molar elevada, aproximada a de uma glicoproteína, variando de 130 a 240 kDa, sendo necessária a presença de íons magnésio para sua completa atividade. No entanto, em processos cancerígenos estes inibidores não requerem a presença do íon magnésio. O efeito dos inter- α inibidores já havia sido relatado por HEIMBURGER (1974), e foram estudados

mais detalhadamente por MIO *et al.*, (2000) e MIO e STERN, (2002). Os autores estudaram o efeito do intra- α -inibidores nas atividades das hialuronidases provenientes do testículo bovino, de venenos de cobra, de abelhas e de bactérias do gênero *Streptomyces*. Estes trabalhos mostram que estes inibidores reduzem de forma significativa a atividade enzimática em todas as hialuronidases estudadas, com exceção da hialuronidase de *Streptomyces*.

O estudo do papel da hialuronidase em células cancerígenas levou a descoberta de que níveis elevados de hialuronidase e de ácido hialurônico também podem causar a inibição desta enzima (ASTÉRIOU *et al.*, 2006). Os estudos revelaram que pelo menos no caso de células cancerígenas, há uma implicação biológica de forma não linear e não monotônica da dependência de regulação da razão ácido hialurônico / hialuronidase com o tamanho de cadeia do ácido hialurônico.

OHYA e KANEKO (1970), já haviam observado que a ação efetiva do inibidor depende do tipo de hialuronidase. A hialuronidase de *Streptomyces* não é inibida por heparina, sulfato de condroitina, sulfato de álcool polivinílico, enquanto que a hialuronidase testicular não apresenta atividade na presença desses compostos.

CHEN *et al.* (1992) sugerem que os inibidores de hialuronidase que pertencem à família dos intra- α -inibidores podem formar uma ligação covalente com o ácido hialurônico presente na membrana do óvulo, regulando a atividade da hialuronidase (PH-20) durante o processo de penetração do espermatozóide no óvulo.

MACHIAH *et al.* (2006) observaram um inibidor da hialuronidase, purificado de plantas medicinais (*Withania somnifera*), ressaltando também que este inibidor era bastante eficiente quando aplicado contra veneno de cobras (*Naja naja*) e de vespas (*Daboia Russelli*). CHOI *et al.* (2006) também estudaram a inibição da hialuronidase através da utilização de plantas (*Schisandra*) e observaram que o extrato desta planta era eficiente na inibição da hialuronidase.

CAPÍTULO III

Revisão Bibliográfica – Separação de Proteínas

3.1 Introdução

Este capítulo descreve as características, propriedades e aplicações da hidroxiapatita, que será utilizada como adsorvente da hialuronidase, bem como o estudo do fenômeno de adsorção e as vantagens da utilização deste processo na purificação de proteínas.

3.2 Extração

A extração de proteínas é normalmente a etapa inicial no processo de purificação destas moléculas de uma fonte natural. A extração pode ser realizada utilizando-se vários agentes extratores, que podem ser orgânicos ou aquosos.

Na purificação de proteínas podem usar-se várias técnicas como, por exemplo: centrifugação fracional, precipitação ou dissolução por ação de sais e variadas técnicas cromatográficas (filtração em gel, troca iônica, cromatografia de afinidade, etc.). Essas técnicas são, em geral, usadas sequencialmente.

3.3 Precipitação

Uma das etapas iniciais da separação de proteínas é a precipitação destas moléculas de uma solução aquosa concentrada (extrato). Vários agentes precipitantes podem ser empregados, incluindo sais, calor, pH e solventes orgânicos.

Proteínas diferentes que compõem uma mistura, normalmente apresentam um grau de solubilidade diferente. Esta diferença na solubilidade de proteínas é devida, em

grande parte, a resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície das moléculas. Como a solubilidade é diferente as proteínas respondem de modo distinto ao agente precipitante, assim podendo ser separadas.

3.4 Adsorção

Adsorção é a adesão de moléculas de um fluido a uma superfície, o grau de adsorção depende da temperatura, da pressão e da área da superfície. As forças que atraem o adsorvato podem ser químicas ou físicas.

A adsorção química, também chamada de quimissorção, é específica e é empregada na separação de misturas. Nela as moléculas (ou átomos) unem-se à superfície do adsorvente através da formação de ligações químicas (geralmente covalentes) e tendem a se acomodar em sítios que propiciem o maior número de coordenação possível com o substrato. A adsorção física é também chamada de fisissorção, neste processo a molécula fisicamente adsorvida retém sua identidade, embora possa ser deformada pela presença dos campos de força da superfície.

3.4.1. Adsorventes

Adsorventes são substâncias que possuem como principais características, a afinidade com um ou mais compostos presentes na mistura, a estabilidade no meio, a alta capacidade de retenção e uma boa resolução na eluição.

Os primeiros adsorventes utilizados na separação de biomoléculas foram as celuloses (CM - celulose e fósforo - celulose) em sua forma natural. Posteriormente, foram empregados adsorventes sintéticos como polímeros ou adsorventes naturais modificados. Com a evolução dos processos biotecnológicos e o desenvolvimento de novos adsorventes, técnicas mais recentes empregam o uso de materiais com ligantes específicos, denominados adsorventes de afinidade (VOET e VOET, 1995) e materiais poliméricos com características bioespecíficas (ALVAREZ *et al.*, 1996).

Dentre os adsorventes inorgânicos clássicos a sílica se apresenta como o mais utilizado (FENG e ANDRADE, 1994), seguido da hematita (NORDE e ANUSIEM, 1992) e, mais recentemente, o óxido de titânio e a hidroxiapatita (KANDORI *et al.*, 1995).

O estudo da interação da hidroxiapatita com macromoléculas recebe uma atenção especial devido às suas propriedades físico – químicas, que lhe conferem propriedades de biocompatibilidade e osteointegração. O fosfato de cálcio e especialmente as apatitas são largamente usados em um grande número de aplicações biomédicas, como por exemplo, confecção de próteses, de enxertos de dentes e carreadores de drogas, com efeito prolongado.

A literatura apresenta vários trabalhos analisando o comportamento da hidroxiapatita na confecção de próteses, estudos de biocompatibilidade, osteointegração e, frente ao fenômeno de adsorção em diferentes fluidos corporais como saliva e sangue, e adsorção de biomoléculas e antibióticos. Desde o trabalho clássico de TISELIUS *et al.* (1956), diferentes trabalhos posteriores registram sua aplicação na separação de proteínas, como adsorvente de alta seletividade (HONDA *et al.*, 1998), uso em colunas de cromatografia líquida (AKAZAWA *et al.*, 1999) e adsorção de vírus e ácidos nucléicos (YIN *et al.*, 2001).

3.4.2. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é o principal constituinte inorgânico dos tecidos calcificados e tem no seu equivalente sintético um material com alta capacidade de substituição de ossos humanos nos implantes de próteses, devido as suas propriedades de biocompatibilidade e de osteointegração.

As apatitas, com fórmula geral $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$, cristalizam geralmente segundo o sistema hexagonal. Na hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (M=Ca, X=P e Y=OH), os átomos de cálcio e os de oxigênio dos grupos PO_4^{-3} formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo **z** de maior simetria (Figura 3.1).

Na estrutura hexagonal da hidroxiapatita (HAp), os seis átomos de cálcio que se encontram mais ao centro da célula compreendem dois grupos de três íons em $z = 1/4$ e $3/4$. O arranjo espacial destes átomos pode ser visualizado na Figura 3.1, que compreende uma configuração espacial da hidroxiapatita no eixo z .

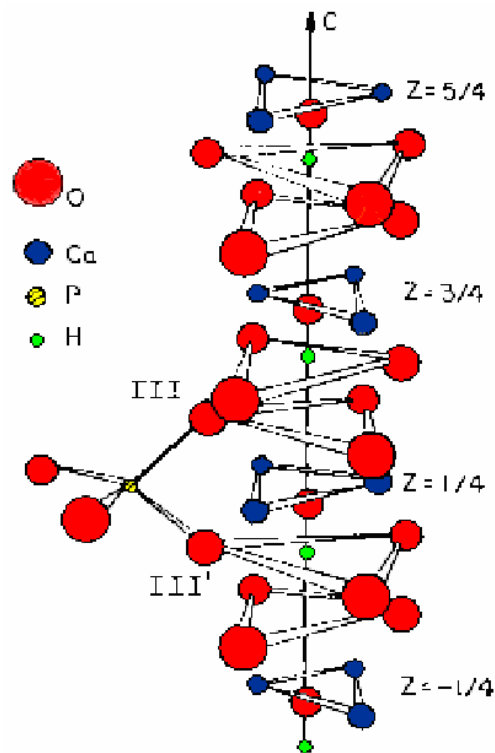


Figura 3.1 - Configuração espacial da hidroxiapatita (eixo z).

Os seis íons fosfato compreendem dois conjuntos de três em $z = 1/4$ e $3/4$. Os oxigênios dos grupos OH situam-se ao longo de z , fora dos planos dos triângulos de cálcio, cerca de $0,4 \text{ \AA}$. Além dos grupos funcionais PO_4^- e OH^- , a hidroxiapatita possui dois tipos de sítios cálcio, com reatividades distintas.

Em um modelo simplificado pode-se representar a HAp como um conjunto de grupos funcionais, onde os pares de íons cálcio são carregados positivamente, constituindo os sítios cálcio (Ca^{++}), que podem se comportar como sítios ácidos de Lewis e como aglomerados de átomos de oxigênio carregados negativamente que, por sua vez, constituem os sítios fosfato (PO_4^{-3}) que podem se comportar como sítios básicos de Lewis. As hidroxilas (OH^-) se apresentam distribuídas sobre a superfície do

crystal, podendo se comportar como sítios básicos de Brönsted. Uma representação esquemática dos grupos funcionais da HAp pode ser vista na Figura 3.2.

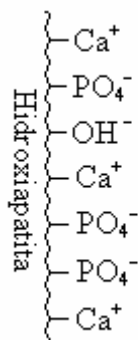


Figura 3.2 – Representação esquemática dos grupos funcionais da HAp. Adaptado de GORBUNOFF, 1984.

Os laboratórios *Bio-Rad* desenvolveram dois tipos diferentes de hidroxiapatita cerâmica para utilização em escala industrial nos processo cromatográficos. Os materiais possuem características de eluição semelhantes à HAp cristalina, porém permitem a operação a elevado fluxo. O tipo I tem alta capacidade de retenção de proteínas (25 mg de lisozima/g HAp). O tipo II possui uma capacidade menor (12,5 mg de lisozima/g HAp), permitindo uma melhor resolução na eluição das proteínas e de ácidos nucleicos. A Tabela 3.1 apresenta algumas características da HAp cerâmica comercializada pela *Bio-Rad*.

Tabela 3.1 - Propriedades da HAp cerâmica Macro-Prep (*Bio-Rad*).

Capacidade de retenção dinâmica	> 25 mg lisozima / g (tipo I) 12,5 mg lisozima / g (tipo II)
Tamanho de partícula nominal	20, 40 e 80 μm
Diâmetro de poro nominal	500 – 1000 Å
Fluxo linear máximo	5.000 cm/h
pH	5,5 – 14
Autoclavável (121 °C, 30 min)	Sim

Estudos de caracterização e de preparação de hidroxiapatitas com uma melhor estrutura para o emprego no campo de adsorção, como carreadores e em transplante estão sendo realizados, bem como o estudo de adsorção de proteínas constituintes da saliva (GINEBRA *et al.*, 2004; CARLÉN *et al.*, 2004; REES *et al.*, 2004; SHELLIS *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2006).

Modificações na forma de preparação de HAp têm sido muito estudadas nos últimos anos, objetivando a obtenção de materiais com maior resistência mecânica e com maior biocompatibilidade para uso em transplantes (SUCHANEK *et al.*, 1996; TANCREDO *et al.*, 1998; YASUDA *et al.*, 2000; GUILLE *et al.*, 2005; RITZOULIS *et al.*, 2005; ZREIQAT *et al.*, 2005). A cobertura de polímeros ou metais com hidroxiapatita também tem sido estudada como uma forma de preparar um material biocompatível e resistente (KOKUBO *et al.*, 1999; WANG e BONFIELD, 2001; NAYAR *et al.*, 2006; FUJII *et al.*, 2006; JALOTA *et al.*, 2006; SAITO *et al.*, 2005; TAMAI *et al.*, 2005; KAWAI *et al.*, 2004; WEI e MA, 2004).

Mais recentemente, estuda-se a preparação da HAp em meios orgânicos similares aos líquidos corpóreos onde ocorre a formação do osso. Estes estudos visam a formação de hidroxiapatita para implantes com propriedades ainda mais idênticas ao osso, simulando condições *in vivo* (WANG *et al.*, 2004; TSIRIDIS *et al.*, 2006; ZHAI e CUI, 2006; BOZEC *et al.*, 2005; BENIASH *et al.*, 2005; KAMAKURA *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005; KUMTA *et al.*, 2005; SACHSE *et al.*, 2005; TURHANI *et al.*, 2005). Em alguns casos estes estudos estão bem avançados, sendo realizados *in vivo*, utilizando ratos como cobaias (AROSARENA e COLLINS, 2005; GORDJESTANI *et al.*, 2005; KILIAN *et al.*, 2005).

Outra linha também muito adotada é a da modificação das características da HAp através de tratamentos térmicos e da adição de aditivos após a preparação (MURALITHRAN e RAMESH, 2000, SLAVICA *et al.*, 2001; NISHIKAWA, 2001; HELIOTIS *et al.*, 2006).

A hidroxiapatita é muito utilizada em bioprocessos, não só na purificação ou separação de biomoléculas, mas também é empregada como carreador de fármacos (MATSUMOTO *et al.*, 2004; GINEBRA *et al.*, 2006; TURHANI *et al.*, 2005; KWON *et al.*, 2005; MIZUSHIMA *et al.*, 2006; ONO *et al.*, 2004; SALEEM *et al.*, 2005), na elaboração de novas técnicas e de novos equipamentos (sensores) (MONKAWA *et al.*, 2006).

No processo de purificação de proteínas a hidroxiapatita tanto pode ser utilizada em etapas intermediárias (RIVIECCIO *et al.*, 2006; JEONG *et al.*, 2004; KOHL e KERR 2004; LAIRD *et al.*, 2004; SCHLATTERER *et al.*, 2004; SOLOMON *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004) como na etapa final do processo (ABDALLAH *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2004). O emprego deste material é muito adequado nos processos de purificação e separação de biomoléculas.

A HAp utilizada neste trabalho foi sintetizada no Laboratório de Núcleo de Catálise (NUCAT) do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ pelo método de precipitação, buscando-se obter uma HAp estequiométrica com a razão molar cálcio/fósforo de 1,67. O estudo da influência de parâmetros de preparação nas propriedades físico-químicas foi desenvolvido em trabalhos anteriores em um projeto conjunto entre pesquisadores do CBPF e do NUCAT. Nesta etapa, avaliou-se a reprodutibilidade da preparação e sistematizou-se a preparação de materiais com diferentes propriedades físico-químicas, inclusive de materiais com propriedades padrão para amostras dosimétricas (SALIM *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1996).

O estudo da preparação de carboapatita do tipo A e do tipo B também foi desenvolvido, enfatizando-se o desenvolvimento ou aplicação de técnicas de caracterização que permitissem a quantificação e localização precisa de substituições na estrutura (BHERING *et al.*, 1998; RESENDE *et al.*, 1996).

3.5 Separação de Proteína

O processo de purificação de proteínas é a etapa limitante no processo de obtenção de biomoléculas, uma vez que estas moléculas são sensíveis, exigindo controle das variáveis como: pH, temperatura dentre outros, para evitar o processo de desnaturação. Dentre estes processos, a adsorção se mostra bastante eficiente, por se tratar de um procedimento relativamente simples e com excelentes resultados.

3.5.1 Adsorção

O fenômeno de adsorção é definido como o enriquecimento de um ou mais componentes em uma região interfacial. A origem deste fenômeno se deve ao desequilíbrio de forças intermoleculares na interface quando comparadas às do interior da fase condensada.

As forças de coesão de um sólido, seja ele iônico, covalente ou molecular, produzem um campo de força em torno de cada íon, átomo ou molécula que compõe sua estrutura. Este campo gerado na superfície da fase condensada é responsável pelas interações deste sólido. A análise precisa deste sistema de forças deve levar em consideração a interação entre o campo de forças da superfície do sólido, as moléculas que irão ser atraídas e o meio em que o sólido se encontra. No caso da adsorção de biomoléculas estão presentes forças e interações variadas. A análise do fenômeno tem sua complexidade aumentada uma vez que a biomolécula pode sofrer mudanças conformacionais e interações diversas com o meio e com a superfície.

De forma geral uma isoterma de adsorção apresenta uma relação entre a quantidade (q) de material adsorvido e a concentração de equilíbrio (C_e) em uma dada temperatura. Os dados experimentais geralmente são apresentados em forma de gráfico, representando-se a quantidade adsorvida de um determinado composto, em função da

sua concentração no equilíbrio. No caso de macromoléculas a literatura mostra que a estrutura deste composto interfere no formato da isoterma.

3.5.1-1. Adsorção de Proteínas

NORDE (1986) apresentou um trabalho de revisão da adsorção de proteínas em interface sólido-líquido considerado clássico. Analisando a adsorção de proteínas em vários adsorventes, o mesmo mostra que não somente a carga líquida das proteínas (pI) é responsável pela adsorção, mas também apresenta uma ênfase especial na análise das estruturas das proteínas e nas suas modificações na presença do adsorvente. Avaliando a capacidade de modificações conformacionais das proteínas, sugere que proteínas que podem modificar sua conformação facilmente (proteínas flexíveis) adsorvem em uma grande variedade de adsorventes, enquanto que proteínas que não possuem esta característica (proteínas rígidas) só adsorvem em classes específicas de adsorventes. A Figura 3.3 mostra uma representação de uma proteína flexível em solução e adsorvida em uma superfície.

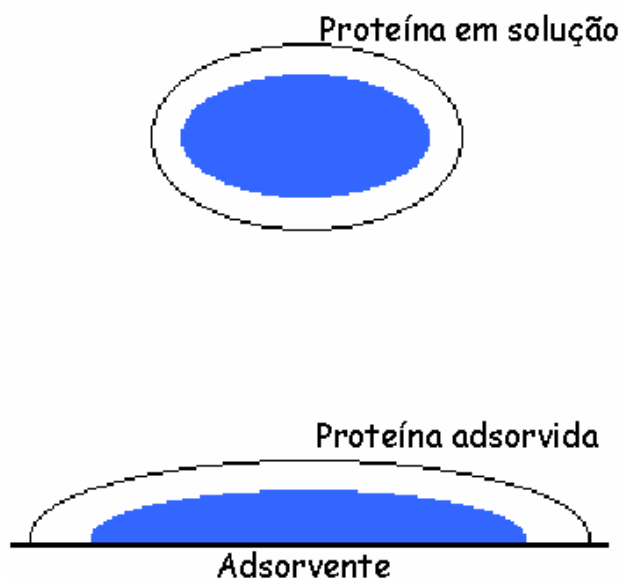


Figura 3.3 – Esquema representando as modificações sofridas na conformação de uma proteína no processo de adsorção.

Uma das principais conclusões apresentadas nesta revisão (NORDE 1986) é que proteínas flexíveis podem mudar sua conformação adsorvendo em condições eletrostáticas adversas.

Uma representação esquemática das cargas superficiais do sistema pode ser ilustrada conforme a Figura 3.4.

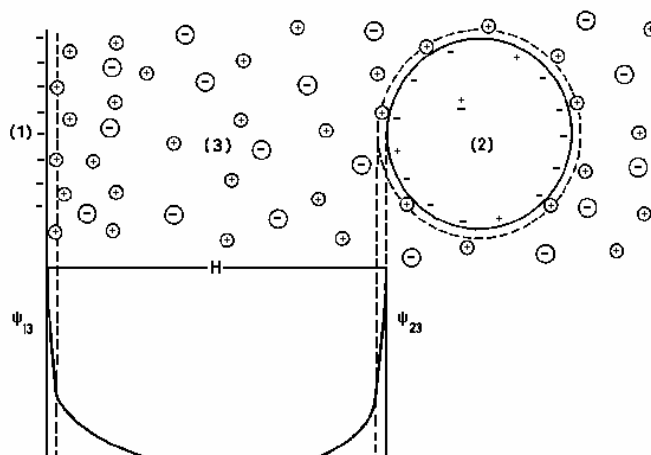


Figura 3.4 - Esquema da distribuição de cargas de uma superfície plana (1) e de uma proteína (2), com seus gradientes correspondentes de potencial eletrostático ψ , onde H é a distância entre a proteína e a superfície através do meio. Adaptada de NORDE (1986).

A transferência de íons envolve simultaneamente, a transferência de massa e o transporte de carga. Desta forma, o trabalho total de transferência de um íon da solução para a superfície envolve contribuições químicas e elétricas. Se ocorrer a transferência de um íon de uma fase para a interface, a contribuição química é significativa. Somente no caso do íon ser transportado com a estrutura inalterada é que a contribuição química será virtualmente zero, o que só ocorre na parte difusa da camada elétrica dupla. Quando dois corpos carregados se aproximam (o que ocorre durante o processo de adsorção de uma proteína em uma superfície carregada) há uma superposição das camadas elétricas duplas originando uma redistribuição de cargas. Interações eletrostáticas exercem um importante papel nos processo de adsorção e essas contribuições podem ser estimadas comparando as propriedades elétricas antes e depois da adsorção. Convém mais uma vez registrar, que na análise do fenômeno de adsorção, não apenas as interações eletrostáticas devem ser consideradas, como também as

contribuições de outras interações, conforme salientado por NORDE (1986), NORDE e GIACOMELLI (2000) e CLAEISSON *et al.* (1995).

De um modo geral, os pontos experimentais em uma isoterma de adsorção são geralmente descritos pelo modelo de Langmuir, representado pela Equação 1, onde q_{\max} é a quantidade máxima adsorvida e k é a constante de adsorção. Este modelo é aplicado para sistemas gás / sólido, mas pode ser utilizado para sistemas líquido / sólido quando se trabalha em baixas concentrações de uma solução não eletrolítica.

$$\frac{q}{q_{\max}} = \frac{kC_e}{1 + kC_e} \quad (1)$$

Embora o modelo de Langmuir apresente limitações (interação bimolecular), é ainda o mais empregado para o cálculo da quantidade máxima adsorvida e da constante de adsorção quando a adsorção apresenta um comportamento hiperbólico com a concentração de equilíbrio (WASSELL *et al.*, 1995; OUIZAT *et al.*, 1999; CONDER e HAYEK, 2000).

A isoterma de Langmuir pode ser obtida a partir da isoterma de Gibbs, uma vez que esta última apresenta uma relação entre a variação da tensão superficial na superfície (γ) devido à adsorção e a concentração do adsorvato em solução:

$$-d\gamma = \Gamma RT \frac{dc}{c} \quad (2)$$

ou entre a pressão de filme e a concentração:

$$d\pi = \Gamma RT \frac{dc}{c} \quad (3)$$

onde π é a pressão de filme [energia/L²] e Γ é a excesso do soluto na superfície [mol/L²]. O comportamento do filme formado pode ser descrito por uma equação de estado, relacionando a pressão de filme com a área ocupada pela molécula. A isoterma de Langmuir pode ser obtida supondo que a equação de estado do filme é:

$$\pi(\sigma - \sigma_0 / 2) = kT \quad (4)$$

onde σ e σ_0 correspondem, à área ocupada pelas moléculas e à área mínima ocupada pela molécula, respectivamente. A combinação das equações acima, considerando que $\sigma_0 \ll \sigma$, conduz a isoterma de Langmuir:

$$q = \frac{q_{\max} kc}{1 + kc} \quad (5)$$

Embora o modelo de Langmuir tenha sido originalmente desenvolvido para a adsorção gás-sólido, o próprio Langmuir descreveu a possibilidade de utilização de sua equação para a adsorção a partir da fase líquida (SCHUKIN *et al.*, 1988).

Isotermas clássicas apresentadas por proteínas flexíveis e rígidas são apresentadas na Figura 3.5a e b.

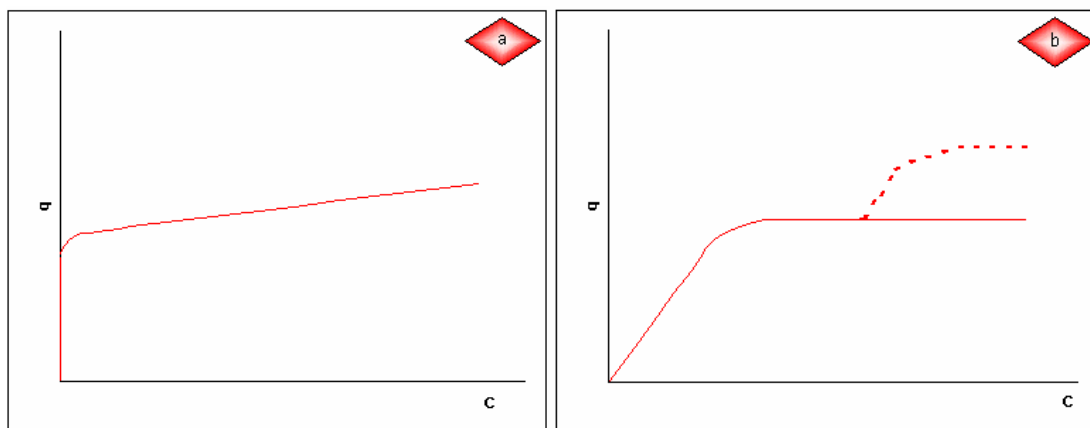


Figura 3.5 – Isotermas típicas do processo de adsorção. **(a)** Isotherma típica de moléculas flexíveis, altamente solvatadas. **(b)** Isotherma típica de moléculas rígidas.

A isoterma do tipo **a** mostra que a curva de adsorção não apresenta um patamar que corresponde à formação da monocamada. A tendência um pouco ascendente pode ser explicada por um rearranjo das moléculas devido à sua flexibilidade na superfície. Já as moléculas rígidas tendem a formar isotermas do tipo **b**. Devido a dificuldade de

rearranjo, as moléculas formam uma monocamada bem definida, podendo ainda formar uma segunda camada devido a adsorção subsequente de proteínas sobre a primeira camada.

GIACOMELLI *et al.* (1997), estudando a adsorção de BSA em óxido de titânio, sugeriram que os fatores que podem governar o processo de adsorção de proteínas são oriundos da:

1 - Interações eletrostáticas proteína-proteína e superfície-proteína, que podem ser atrativas ou repulsivas.

2 – Perda de moléculas de água da superfície e da proteína, durante o processo de adsorção, que promovem a adsorção na interface hidrofóbica (da proteína) e opõem-se à interface hidrofílica.

3 - Mudanças estruturais na proteína, que são uma consequência da mudança na adsorção no equilíbrio entre a repulsão entre as moléculas e a hidrofobicidade intramolecular.

Os autores propõem que os fatores determinantes são o caráter hidrofílico da superfície e a estabilidade da proteína. Proteínas com alta estabilidade conformacional (proteínas flexíveis) adsorvem numa grande variedade de superfícies. Proteínas com baixa estabilidade conformacional (proteínas rígidas) adsorvem preferencialmente em superfícies hidrofóbicas, podendo adsorver em superfícies hidrofílicas somente quando são favorecidas pelas interações eletrostáticas.

3.5.1-2. Adsorção de Proteínas em Hidroxiapatita

GORBUNOFF *et al.*, (1984) tentaram explicar as interações no processo de adsorção de biomoléculas em HAp utilizando 20 proteínas com ponto isoelétrico, variando de 3,8 a 11,0, estudando principalmente o processo de eluição destas proteínas

com cátions divalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) e ânions monovalentes (F^- , Cl^- , ClO_4^- e SCN^-). Com base nos resultados os autores propõem os seguintes mecanismos de interação proteína – hidroxiapatita:

a - Proteínas básicas formam ligações eletrostáticas entre seu grupo amino e as cargas negativas de HAp (PO_4^-).



b - Proteínas ácidas formam preferencialmente complexação de seus grupos carboxílicos ($COOH$) e os sítios cálcio da HAp.



Sugerindo o seguinte esquema do mecanismo de interação proposto Figura 3.6.

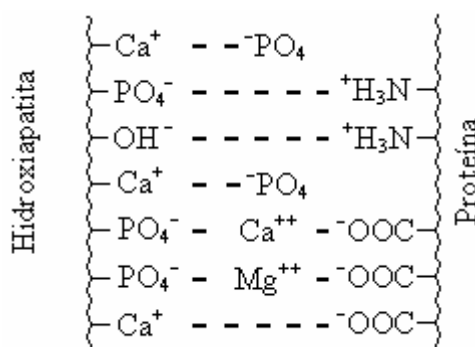


Figura 3.6 – Representação esquemática do mecanismo de interação proposto por GORBUNOFF *et al.* (1984).

Com base no esquema acima, GORBUNOFF *et al.* (1984) sugeriram que proteínas básicas podem adsorver tanto no sítio fosfato como nas hidroxilas da HAp. Proteínas ácidas adsorvem nos sítios cálcio da HAp, adsorvendo somente nos sítios fosfato na presença de cátions em solução. Os autores interpretam os dados obtidos, focalizando somente as propriedades eletrostáticas da proteína, o que é correto apenas quando se trabalha em condições em que o meio favorece estas condições.

Segundo VOET e VOET (1995) as proteínas são adsorvidas em gel de hidroxiapatita. A separação das proteínas acontece em eluição gradual com tampão fosfato. A base físico-química deste procedimento de fracionamento não é completamente entendida, mas aparentemente envolve a adsorção de ânions aos sítios Ca^{++} e cátions aos sítios PO_4^{3-} da hidroxiapatita.

Mais recentemente, FENG *et al.* (2001) procuraram esclarecer as interações entre albumina e titânio recoberto por íons cálcio e fósforo de apatitas. Os resultados mostraram que as proteínas são ligadas quimicamente ao material inorgânico e que o Ca^{++} tem um papel importante nesta interação. A combinação de hidroxiapatita com titânio também vem sendo utilizada na formação de filmes híbridos (TiO_2 -HAp). Estes filmes apresentam propriedades de decomposição fotocatalítica, sendo empregados na degradação de bactérias, vírus, pólen e toxinas. Filmes de TiO_2 -HAp exploram a capacidade de alta afinidade da HAp com as biomoléculas (NAKAJIMA *et al.*, 2006). A combinação hidroxiapatita - titânio é muito estudada, pois o material resultante apresenta propriedades adequadas para utilização em transplantes e outros empregos (CHENG *et al.*, 2004).

Devido a capacidade de afinidade da hidroxiapatita com uma gama enorme de proteínas, o emprego de colunas cromatográficas de hidroxiapatita vem aumentando nos últimos anos, mostrando excelentes resultados no campo da separação e da purificação de biomoléculas (NIU *et al.*, 2006; RENAULT *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2006; OOTSUKA *et al.*, 2006; BOIX *et al.*, 2005; VITORINO *et al.*, 2004; KANDORI *et al.*, 2004; TAKAGI *et al.*, 2004; ROUABI *et al.*, 2004). Estudos da afinidade de adsorção da HAp por proteínas estão sendo realizados, visando obter uma melhor forma de adsorção e de eluição do sistema (GITTENS *et al.*, 2004)

Os trabalhos apresentados na literatura demonstram que a adsorção de biomoléculas em HAp depende das características da biomolécula, do adsorvente e do meio. No entanto, a maioria dos trabalhos apresentados dá maior importância às características da biomolécula. Estudos de caracterização das propriedades físico-químicas do adsorvente são registrados em menor número.

GONÇALVES (2002) estudou a adsorção e dessorção de BSA e lisozima em hidroxiapatita e demonstrou que a BSA adsorve nos sítios cálcio da hidroxiapatita através de interações fortes e em ampla faixa de pH (4,5 a 9,0). O comportamento da adsorção da albumina do soro bovino é regular e na maioria dos casos as isotermas podem ser ajustadas ao modelo de Langmuir, apresentando um máximo de adsorção no ponto isoelétrico da BSA (94 mg/g). A lisozima adsorve de forma irregular e apresenta duas intensidades diferentes de interações, uma interação fraca relativa à adsorção física e uma interação forte que corresponde à adsorção nos sítios fosfato do adsorvente. Observou-se ainda que a lisozima praticamente só adsorve em pHs básicos, quando as condições eletrostáticas são favoráveis, tendo o máximo de adsorção de 29,5 mg/g, que ocorre em pH 9,5 diferente do seu ponto isoelétrico. Embora a proteína ácida (BSA) e a proteína básica (lisozima) tenham adsorvido nos sítios cálcio e fosfato, respectivamente, não foi possível concluir que todas as proteínas ácidas e básicas vão adsorver nos sítios cálcio e fosfato da hidroxiapatita, respectivamente. Outras características, como flexibilidade e grau de hidrofobicidade, devem ser avaliadas antes de qualquer conclusão.

CAPÍTULO IV

Revisão Bibliográfica - Filmes Monomoleculares

4.1 Introdução

Este capítulo apresenta um breve histórico sobre o desenvolvimento de filmes monomoleculares, descrevendo as principais técnicas de preparação, caracterização e aplicações de filmes.

4.2 Filmes Monocamadas

Filmes monomoleculares são sistemas organizados de átomos ou moléculas em uma interface. Estes sistemas apresentam espessura da ordem de nanômetros. Os filmes monomoleculares podem ser formados por átomos, moléculas inorgânicas ou orgânicas, este trabalho se detém a filmes orgânicos. O emprego destes sistemas possibilita um estudo mais detalhado das moléculas, uma vez que as mesmas apresentam-se quase de forma isolada, não sofrendo grande interferência das demais moléculas.

Um filme orgânico pode ser depositado sobre um substrato sólido, com isto uma melhor caracterização deste sistema pode ser realizada. Esta deposição pode ser feita por várias técnicas como evaporação térmica, deposição física por plasma frio (sputtering), eletrodeposição, adsorção de soluções, técnica de Langmuir – Blodgett (LB) (PETTY, 1992). A técnica de LB é a mais promissora no preparo de filmes finos, pois possibilita um controle preciso da espessura e deposição homogênea da monocamada em uma determinada fração de área. Além disso, esta técnica permite o desenvolvimento de filmes com multicamadas e composição variada.

A utilização de filmes no desenvolvimento de sensores e componentes de circuitos elétricos foi sugerida, já há algum tempo, em importantes aplicações comerciais destes sistemas (SWALEN, 1987). Observa-se que nas duas últimas décadas há um aumento significativo na produção de trabalhos que avaliam o emprego da técnica de LB. Além disso, também é observado que esta técnica é empregada na preparação de biossensores (GUO *et al.*, 2007).

4.3 Histórico sobre o Desenvolvimento de Filmes Finos

A literatura reporta que em 1774 Benjamin Franklin já havia observado o espalhamento de óleo sobre a água (ROBERTS, 1990) e realizado cálculos simplificados, nos quais supunha que uma colher de chá cheia de óleo espalhada sobre uma área de aproximadamente dois mil metros quadrados, formaria um filme sobre a superfície da água de mais ou menos 2nm de espessura.

Quase cem anos depois, Lord Rayleigh suspeitou que a extensão máxima de um filme de óleo em água representa uma fina camada molecular. O marco inicial no desenvolvimento de estudos sistemáticos de filmes é o trabalho da alemã Agnes Pockles. Agnes desenvolveu uma balança rudimentar de superfície na sua pia de cozinha, a qual ela usava para determinar contaminações da água, como função da área por superfície, para diferentes óleos. A publicação de Pockels em 1891 na revista *Nature* foi fundamental para o trabalho quantitativo de Langmuir sobre monocamadas de ácidos graxos, ésteres e álcoois em 1917 (POCKELS, 1891).

Irwing Langmuir foi o primeiro a desenvolver estudos sistemáticos de monocamadas flutuantes sobre a água. Nos anos 20 ele reportou a transferência de moléculas de ácidos graxos da superfície da água para um suporte sólido. Porém a primeira descrição detalhada da seqüência da transferência de monocamadas para um suporte sólido foi dada anos mais tarde por Katherine Blodgett (BLODGETT, 1935). A conformação na montagem de monocamadas em um substrato sólido é portanto referida como filmes de Langmuir – Blodgett. O termo “filmes de Langmuir” é normalmente empregado para monocamadas flutuantes.

Após os trabalhos pioneiros de Langmuir e Blodgett, quase cem anos depois, cientistas de todo o mundo começaram a perceber as vantagens desta técnica única. A primeira conferência internacional sobre filmes LB foi realizada em 1979, desde então, o estudo desta técnica vem crescendo em vários campos de pesquisas.

4.4 Propriedades de Filmes

Para uma melhor compreensão das medidas das variáveis de um filme, faz-se necessária uma breve introdução das principais propriedades físico-químicas de moléculas e das propriedades inerentes ao sistema.

4.4.1 – Tensão Superficial

As moléculas no estado líquido têm um certo grau de atração, que depende fundamentalmente das características da substância. As interações das moléculas no seio de um líquido são balanceadas por uma força de igual atração em todas as direções. Por outro lado, as forças de interação entre as moléculas na superfície de um líquido estão desbalanceadas. Por exemplo, na interface ar / água, as moléculas de água que estão na interface apresentam uma atração maior na direção da fase líquida que na direção da fase gás. Portanto, existiria uma resultante de forças espontânea na interface ar / água, que tende a minimizar a área da superfície e o contato.

O efeito desta resultante de forças no sistema é existência de uma energia livre na superfície. Esta energia em excesso é chamada de energia livre de superfície, e pode ser quantificada em unidades de energia / área. Nestas condições, também pode-se descrever a tensão de superfície, que é quantificada em unidades de força / área. A tensão superficial também pode ser vista, como sendo a medida da energia de coesão presente na interface.

Líquidos polares, como a água, apresentam interações intramoleculares fortes e conseqüentemente uma alta tensão superficial. Variáveis como a temperatura alteram estas interações. O aumento da temperatura causa uma diminuição na tensão superficial. A tensão superficial pode ser medida pelo método da placa de Wilhelmy, determinando-se a força devida a tensão de superfície sobre a placa suspensa, parcialmente imersa, na subfase. Esta força é então convertida em tensão de superfície (γ em mN/m ou dina/cm). A tensão de superfície pode ser diretamente medida utilizando-se uma balança de Langmuir, que é constituída de uma placa de Wilhelmy e de barreiras móveis que fazem a compressão e descompressão da monocamada, conforme mostrado na Figura 4.1.

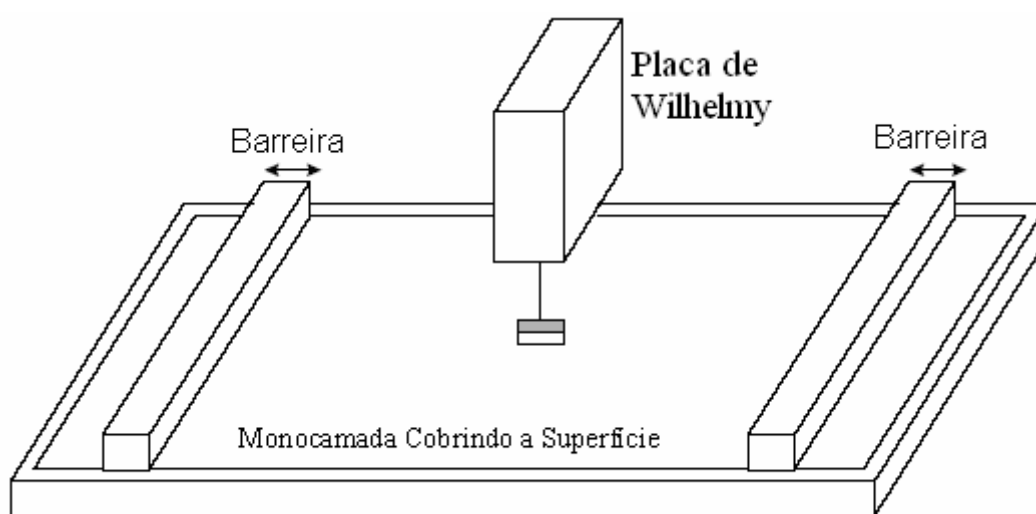


Figura 4.1 – Esquema ilustrativo da balança de Langmuir como a placa de Wilhelmy e as barreiras móveis.

A balança Langmuir utiliza o método da placa de Wilhelmy para o cálculo da tensão superficial, que é baseado na força devida à tensão superficial exercida sobre a placa parcialmente imersa em na subfase (ver Figura 4.1). A tensão superficial pode ser representada da seguinte forma:

$$\lambda = \frac{W}{2(l+t)\text{Cos}\theta} \quad (8)$$

Onde:

λ = Tensão de superfície calculada

W = Força exercida sobre a placa

l = Comprimento da placa

t = Espessura da placa

θ = Ângulo de contato entre o líquido e a placa.

4.4.2 – Pressão de Superfície

A pressão de superfície é definida como sendo a diminuição da tensão superficial (energia livre de superfície) produzida pela monocamada. A pressão de superfície está apresentada na Equação 9.

$$\pi = \gamma_o - \gamma_m \quad (9)$$

Onde:

γ_o Corresponde à tensão superficial na ausência da monocamada.

γ_m Significa à tensão superficial na presença do filme.

A capacidade de penetração de proteínas em monocamadas pode ser quantificada através da correlação entre a concentração na subfase e a variação na pressão de superfície ($\Delta\pi$). Esta capacidade de penetração de proteínas em camadas lipídicas não pode ser diretamente correlacionada com a carga elétrica global ou com o grau de hidrofobicidade da proteína. Por outro lado, $\Delta\gamma$ é proporcional a penetração, admitindo-se que as ligações são reversíveis e a adsorção comporta-se de forma ideal, esta propriedade é importante, pois permite a quantificação do excesso de moléculas na superfície através da equação de Gibbs (Equação 10), que pode ser utilizada para estimar a concentração na superfície e a área molecular aparente do adsorvente na interface (VERGER e PATTUS, 1982).

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \cdot \frac{1}{C} \frac{d\gamma}{d \log C} \quad (10)$$

Onde:

Γ = Excesso do soluto na superfície

R = Constante universal dos gases ideais

T = Temperatura da subfase

C = Concentração

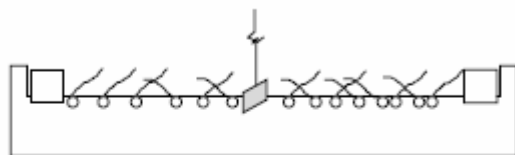
γ = Tensão de superfície

4.5 Filmes de Langmuir

O filme de Langmuir são sistemas formados de moléculas orgânicas anfífilas (como os lipídios, os fosfolipídios e os glicolipídios), na interface gás / líquido (GIRARD-EGROT 2005). O caráter anfílico destas moléculas permite a orientação das mesmas na interface gás / líquido, entre as fases líquida e gasosa para minimizar a energia livre de superfície, formando uma camada insolúvel (filme). O material clássico para a formação de monocamadas insolúveis são as moléculas anfífilas, ou seja, moléculas que apresentam uma parte hidrofóbica, constituída principalmente por hidrocarbonetos, e uma parte hidrofílica que consiste de grupos polares (-OH, -COOH, -NH₃⁺, -PO₄⁻ (CH₂)₂NH₃⁺, etc.). Os surfactantes (agentes ativos na superfície) são classes de moléculas que apresentam esta característica de forma mais acentuada.

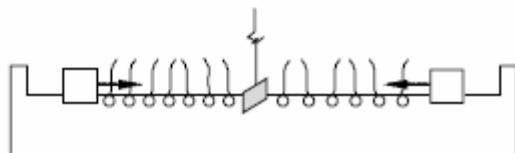
Existe um grande número de surfactantes com natureza anfílica, que diminui drasticamente a tensão superficial da água. Muitas destas substâncias são insolúveis em água, e com a ajuda de solventes podem difundir-se na superfície da mesma, formando uma monocamada na interface ar / água. A Figura 4.2 mostra um esquema da formação de filmes de Langmuir dividida em três partes: **1** – espalhamento das moléculas na interface ar / água, **2** – a etapa de compressão, **3** – a monocamada no estado condensado.

1 – Espalhamento das moléculas na interface ar / água



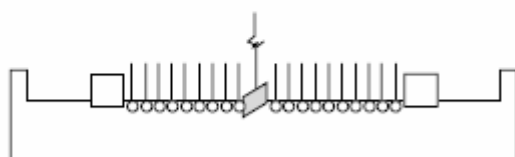
↳ Formação do filme monomolecular no estado gasoso

2 – Compressão da superfície do filme



↳ Organização molecular na interface

3 – Monocamada no estado condensado



↳ Filme monomolecular perfeitamente organizado na interface ar / água

Figura 4.2 – Esquema do princípio da formação de filmes de Langmuir. Figura adaptada de GIRARD-EGROT *et al.* (2005).

A formação do filme ocorre através da deposição de gotas de uma solução diluída de uma substância anfifílica sobre a superfície da camada de água. Esta solução é normalmente preparada em um solvente, por exemplo, o clorofórmio. Após a evaporação do solvente, ocorre a formação de um filme de espessura nanométrica na interface, com a parte hidrofílica imersa na água e a parte hidrofóbica sobre a água. Quando aplicada uma pequena quantidade de moléculas, de modo que a soma da área ocupada por todas as moléculas seja inferior à área da superfície, observa-se neste caso, a formação de um filme no qual as moléculas apresentam-se como em uma fase gasosa (Figura 4.2 - 1).

Utilizando-se a balança de Langmuir, composta por barreiras móveis, pode-se fazer a compressão deste filme. Através da compressão as moléculas vão se organizando de forma diferente, simulando a mudança de um estado gasoso para um estado líquido expandido (Figura 4.2 - 2). A medida que esta compressão vai aumentando o comportamento destas moléculas vai passando pelos seguintes estados, líquido, líquido condensado (Figura 4.2 - 3) até um estágio semelhante ao estado sólido.

Os filmes de Langmuir são caracterizados pelo seu diagrama de fases, que é obtido pela determinação da pressão de superfície como função da área superficial avaliada para cada molécula. Estes experimentos, conhecidos como isotermas (Figura 4.3), devem ser realizados à temperatura constante. A Figura 4.3 mostra um esquema do diagrama de fases, com uma representação simplificada da forma como as moléculas se rearranjam em cada estágio.

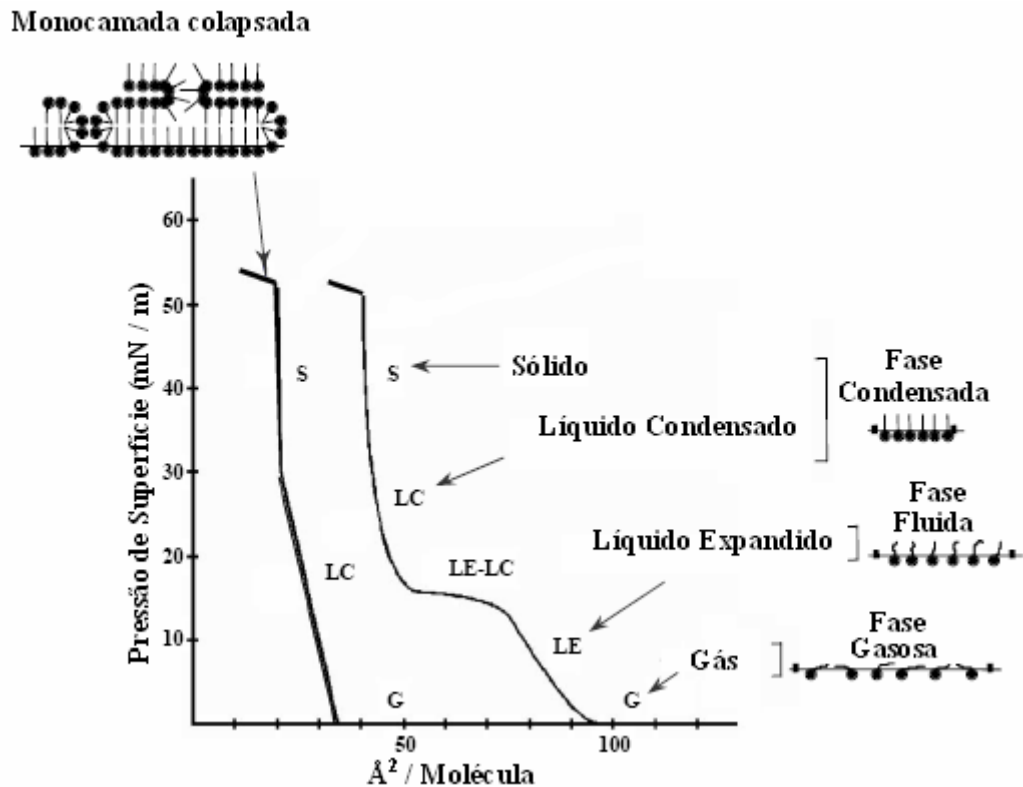


Figura 4.3 – Gráficos típicos da área de superfície em função da pressão de superfície para materiais em diferentes fases. Adaptada de GIRARD-EGROT *et al.* (2005).

Diferentes fases de transição podem ser observadas na Figura 4.3. As duas curvas são isotermas típicas para ácidos graxos e fosfolipídios. Observa-se que a baixas pressões as moléculas se comportam como uma fase gás, praticamente não sofrendo influência das moléculas vizinhas. A medida que a pressão aumenta ou a área por molécula diminui, as moléculas começam a sofrer interferência das suas vizinhas, comportando-se como uma fase de líquido expandido. Com o aumento sequencial da pressão, as moléculas passam a se comportar como um líquido condensado, passando por uma fase de transição entre líquido condensado e líquido expandido. Em pressões mais elevadas as moléculas ficam bastante comprimidas, com comportamento similar a de um sólido. Finalmente quando submetida a uma pressão extremamente elevada

(dependendo de fatores como, o tipo de molécula, da concentração das moléculas no meio, da temperatura, etc.), a monocamada tende a colapsar.

4.6 Filmes de Langmuir- Blodgett

Utilizando a técnica de Langmuir, aprimorada por Blodgett, é possível transferir filmes formados na interface gás / líquido para um suporte sólido. Desta forma, pode-se utilizar a balança de Langmuir para obter multicamadas altamente organizadas. Este tipo de formação de estrutura de multicamadas é comumente chamado de filmes de Langmuir – Blodgett (LB). Esta estrutura é obtida colocando-se um substrato sólido, parcialmente imerso, na subfase. Através de sucessivas imersões parciais deste substrato sólido, as moléculas do filme vão aderindo ao substrato, com isto se obtêm um filme multimolecular organizado sobre uma superfície sólida. O processo de deposição e um esquema simplificado de alguns tipos de filmes que podem ser obtidos através desta técnica estão esquematizados na Figura 4.4.

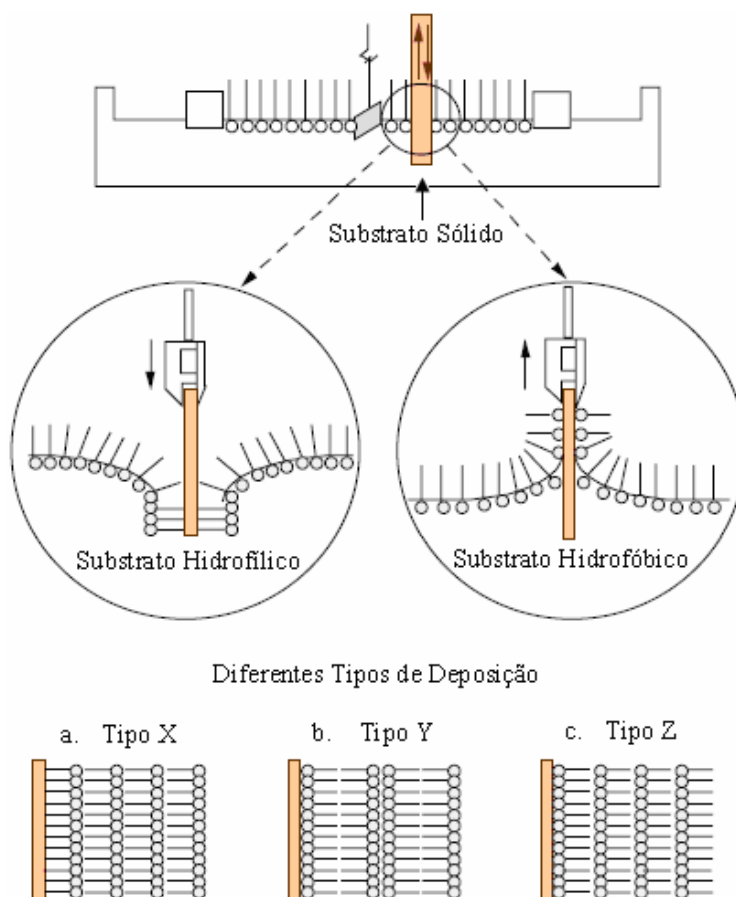


Figura 4.4 – Esquema da deposição de uma monocamada em um substrato sólido. Tipos diferentes de deposição de multicamadas dos filmes de Langmuir – Blodgett. AS figuras foram adaptadas de GIRARD-EGROT *et al.* (2005).

Diferentes tipos de filmes LB de multicamadas podem ser obtidos através de sucessivas deposições de monocamadas em alguns substratos (ver Figura 4.4). A estrutura X é obtida utilizando-se um substrato hidrofílico, ao qual a parte hidrofílica das moléculas é aderida, formando a primeira monocamada. A segunda camada de moléculas se organiza de modo que a parte hidrofílica das moléculas adere à parte hidrofóbica das moléculas da primeira camada. As camadas seguintes seriam formadas com as moléculas na mesma orientação da segunda camada, e ao final, uma estrutura multicamadas é formada, na qual a parte hidrofílica de uma camada de molécula é aderida à parte hidrofóbica das moléculas da última camada que compõem o filme. As estruturas do tipo Z são formadas utilizando-se um substrato hidrofóbico. Neste caso, as moléculas aderem a este substrato através de suas partes hidrofóbicas. A segunda camada é formada com a parte hidrofóbica destas moléculas aderindo à parte hidrofílica das moléculas da primeira camada. As camadas seguintes são formadas com as moléculas segundo a mesma orientação.

A estrutura do tipo Y é a mais comum, ela é obtida utilizando-se um substrato hidrofóbico, ao qual as moléculas são aderidas através de sua parte hidrofóbica. Diferente das demais estruturas, na segunda camada deste sistema as moléculas aderem a primeira camada através de sua parte hidrofílica, resultando em um sistema onde a parte hidrofílica da segunda camada é aderida a parte hidrofílica da primeira camada. A terceira camada é obtida através da adesão da parte hidrofóbica das moléculas a parte hidrofóbica das moléculas da segunda camada, assim obtendo-se uma estrutura onde a parte hidrofílica de uma camada esta aderida à parte hidrofílica da outra, e a parte hidrofóbica de uma camada a parte hidrofóbica das moléculas da camada seguinte. Este tipo é uma amostra representativa de membranas biológicas naturais. Estruturas intermediárias são algumas vezes observadas, sendo a mais freqüente a do tipo XY.

A natureza do espalhamento do filme, composição e temperatura da subfase, a pressão de superfície durante a deposição, a velocidade de deposição, o tipo e a natureza do substrato sólido e o tempo em que o substrato sólido permanece no ar ou na subfase entre os ciclos de deposição afetam as características do filme produzido.

A técnica de LB oferece a possibilidade de se ter um controle praticamente perfeito de cada passo da preparação de filmes LB. A maior vantagem de membranas obtidas por meio desta técnica é que a deposição quase perfeita das moléculas alcançada na superfície da água pode ser mantida durante a transferência sobre o suporte sólido, onde todos os parâmetros são otimizados.

A técnica de LB é conhecida por ser um método eficiente para a preparação de filmes finos bem organizados. Porém, a utilização de métodos altamente sensíveis para analisar as superfícies tem revelado alguns defeitos nos filmes lipídicos formados pela técnica de Langmuir-Blodgett, incluindo a declinação, as áreas cristalinas não homogêneas, os colapsos localizados, as vacâncias, etc. (GIRARD-EGROT *et al.* 2005). A Tabela 4.1 mostra alguns métodos analíticos utilizados para caracterização dos filmes de Langmuir-Blodgett. Os defeitos podem ser prejudiciais para algumas aplicações, como o dos aparelhos eletrônicos moleculares que tenham funções específicas em nível molecular. Além disso, a inserção de um elemento biossensível (enzima) para o desenvolvimento de membranas biomimética e biosensores não ocorre corretamente se o filme LB não for perfeitamente estruturado e homogêneo.

Ainda se observem defeitos em filmes obtidos através da técnica de Langmuir-Blodgett, é importante lembrar que há outro método que podem ser utilizados para a obtenção de filmes monomoleculares contendo proteínas, por exemplo, a simples difusão da proteína na interface. No entanto observa-se que os outros métodos formam estruturas com mais defeitos que os obtidos pela técnica de Langmuir-Blodgett (VERGER e PATTUS, 1982). Muitos dos defeitos encontrados no filmes de Langmuir-Blodgett dá-se pelo fato de que os experimentos são conduzidos na ausência de lipídios ou em baixa pressão superficial, ou no caso em que os experimentos contém lipídios são conduzidos com proteínas solúveis, que não interagem com os lipídios *in vivo* (GIRARD-EGROT *et al.* 2005).

Tabela 4-1 – Visão global das técnicas mais relevantes para a caracterização da estrutura e organização dos filmes de Langmuir-Blodgett. Tabela adaptada de GIRARD-EGROT *et al.* (2005)

Técnicas	Informações obtidas
Elipsometria	Espessura (com precisão de 2 Å) e índice de refração
Difração e reflexão de nêutron Difração de raio-X	Informações estruturais e espessura Espessura, periodicidade interplanar, densidade do perfil eletrônico normal à superfície (determinação do tipo de deposição), estrutura cristalina do filme
GIXD	Estrutura da rede planar e configuração da cadeia carbônica (estendida, curva)
Difração de elétrons	
- Difração de elétrons de transmissão (TED)	-Espaçamento intermolecular, estrutura cristalina e visualização de defeitos
- Difração de elétrons de alta energia de reflexão (RHEED)	-Informações estruturais, ângulo e direção da curvatura da cadeia carbônica
- Difração de elétrons de baixa energia (LEED)	- Determinação de distâncias intermoleculares
Espectroscopia de infravermelho	
- Espectroscopia de luz polarizada, espectroscopia da adsorção e reflexão de infravermelho (IRRAS), reflexão total atenuada-Infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)	- Conformação da cadeia carbônica, grau de ionização dos grupos hidrofílicos, ligação de hidrogênio, mudanças estruturais e químicas - Empacotamento e ângulo de curvatura da cadeia carbônica, orientação molecular
Espectroscopia de Raman aumentada na superfície (SERS)	Conformação da cadeia carbônica e dos grupos hidrofílicos, interações moleculares
Espectroscopia fotoeletrônica de Raio-X (XPS) ou Espectroscopia eletrônica para análise química (ESCA)	Composição química superficial quantitativa
Microscopia ótica	
- Microscopia de contraste de interferência diferencial de Nomarski	- Visualização de defeitos, uniformidade no número de camadas do filme (resolução lateral de 1 µm)
- Microscopia ótica de varredura (FL-NSOM)	- Orientação molecular, morfologia do domínio lipídico, regiões microcolapsadas (resolução lateral de 0,1 µm)
Microscopia eletrônica	
- Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	Morfologia superficial, morfologia domínio lipídico, visualização de padrões e defeitos (resolução de 50 nm)
- Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	
Microscopia de tunelamento de varredura (STM)	Topografia, morfologia do domínio lipídico, visualização de defeitos, empacotamento submolecular (resolução lateral de 0,2 nm)
Microscopia de força atômica (AFM)	

Estudos de filmes de Langmuir de biomoléculas têm interesse especial, pois podem ser estendidos para compreender a organização destas moléculas em sistemas biológicos *in natura* (CONSTANTINO *et al.*, 1998). Utilizando a metodologia de Langmuir - Blodgett, os filmes podem ser caracterizados por técnicas como fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular (CD), técnicas que necessitam a transferência do filme formado. A espectroscopia por fluorescência pode fornecer informações sobre a orientação estrutural da proteína na interface (VERGER e PATTUS, 1982).

4.7 Filmes de Biomoléculas e Algumas Aplicações

Muitos fenômenos biológicos como transporte através de membranas, transdução de sinais, ocorrem em interfaces biológicas. Filme *in vitro* pode ser uma ferramenta importante no estudo destes fenômenos, permitindo o desenvolvimento de produtos que atuem através destes sistemas.

Três tipos principais de estruturas de filmes podem ser utilizados para avaliação das interfaces: lipossomos, membranas planas bi-moleculares e membranas monomoleculares com interface gás-líquido ou interface líquido-líquido. Experiências com monocamadas têm vantagens em relação aos outros dois sistemas (lipossomos e membranas planas bimoleculares), uma vez que o arranjo das moléculas pode ser mais facilmente controlado. Utilizando-se este sistema pode-se obter mais informações sobre as propriedades da proteína de forma mais rápida (VERGER *et al.*, 1984). Uma grande dificuldade encontrada na obtenção de filmes protéicos estáveis na interface gás / líquido decorre da alta solubilidade das moléculas na subfase, possibilitando rápida desnaturação da enzima (ZAITSEV, 1993).

A cristalografia de proteínas tem revolucionado o entendimento dos processos biológicos, o que tem promovido uma compreensão das funções em estruturas básicas com resolução atômica para um número regularmente crescente de biomoléculas. Numerosos e importantes processos biológicos são mediados por proteínas ligadas a

membranas. Infelizmente proteínas membranares são menos receptivas a cristalização em três dimensões (3D), e somente poucas estruturas de proteínas membranares têm sido resolvidas por cristalografia de raio X. Cristalografia eletrônica em duas dimensões (2D) é normalmente aplicada para resolução deste problema. VERCLAS *et al.* (1999) estudaram a cristalografia de proteínas, utilizando a estrutura de filmes de Langmuir – Blodgett, e observaram que os dados obtidos com esta técnica foram qualitativamente equivalentes aos encontrados anteriormente utilizando-se a cristalização em 3D.

Um dos principais problemas encontrados no estudo de filmes monomoleculares de proteínas é a desnaturação destas moléculas, que ocorre freqüentemente quando essas moléculas são colocadas em contato com o ar (GIRARD-EGROT *et al.*, 2005). Vários estudos vêm sendo realizados com a finalidade de evitar a desnaturação das proteínas durante e após a formação das monocamadas.

BERZINA *et al.* (1996) estudaram a composição de monocamadas de moléculas anfífilas e proteínas solúveis utilizando a técnica de Langmuir-Blodgett. Nesse trabalho, os autores desenvolveram uma nova metodologia para a deposição das moléculas de proteína. A adsorção da camada de proteína era conduzida em temperatura e concentração ótima e depositada sobre uma superfície hidrofílica. Em uma configuração especial do filme protéico, no qual a monocamada de proteína fica encapsulada entre duas camadas de surfactantes (ver Figura 4.5), evitando o contato das mesmas com a interface ar / água. A utilização desta configuração evita a desnaturação das proteínas causada pelo contato da mesma com o ar.

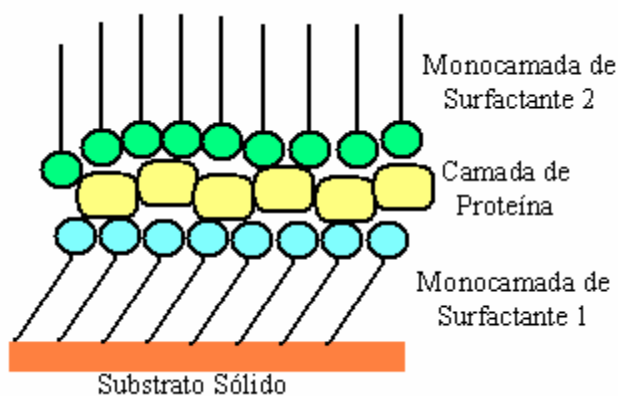


Figura 4.5 - Esquema da estrutura do filme utilizado por BERZINA *et al.* (1996).

PASTORINO *et al.* (2002) estudaram a biocatálise da penicilina G acilase utilizando um sistema de deposição das proteínas sobre o substrato semelhante ao apresentado por BERZINA *et al.* (1996). Os autores afirmam que a utilização da técnica de Langmuir – Blodgett permite a manipulação da monocamada de diferentes componentes com alta atividade e estabilidade. De acordo com BERZINA *et al.* (1996), este novo método de deposição pode abrir caminho para aplicações práticas no desenvolvimento de meios biocatalíticos.

TROITSKY *et al.* (1996) estudaram um método de deposição alternado para filmes de Langmuir – Blodgett. A idéia principal do método consiste em encapsular o substrato com a monocamada depositada, mergulhando uma placa hidrofílica dentro da amostra, situando-a muito perto da superfície do substrato. A Figura 4.6 mostra um esquema simplificado da forma como o experimento deve ser conduzido. Na Figura 4.6-a mostra a monocamada já aderida ao substrato e a placa suspensa, na parte b da Figura 4.6 observa-se a placa imersa muito próxima ao sistema substrato - monocamada, a Figura 4.6-c mostra a o sistema completo (substrato – monocamada – placa - monocamada) removido da subfase. Se o substrato ficar muito próximo da placa e, se o ar do meio for removido, a água é contida na lacuna entre a placa e o substrato pela ação de uma força capilar, o que evitaria o contato das moléculas com o ar.

Utilizando-se esta técnica de deposição, a monocamada protéica é protegida por uma camada de água e a superfície hidrofílica (limite externo do filme). A grande vantagem desta configuração na deposição da monocamada é que o sistema substrato / placa pode ser transferido para outro compartimento de um instrumento sem necessitar da subfase (TROITSKY *et al.*, 1996)

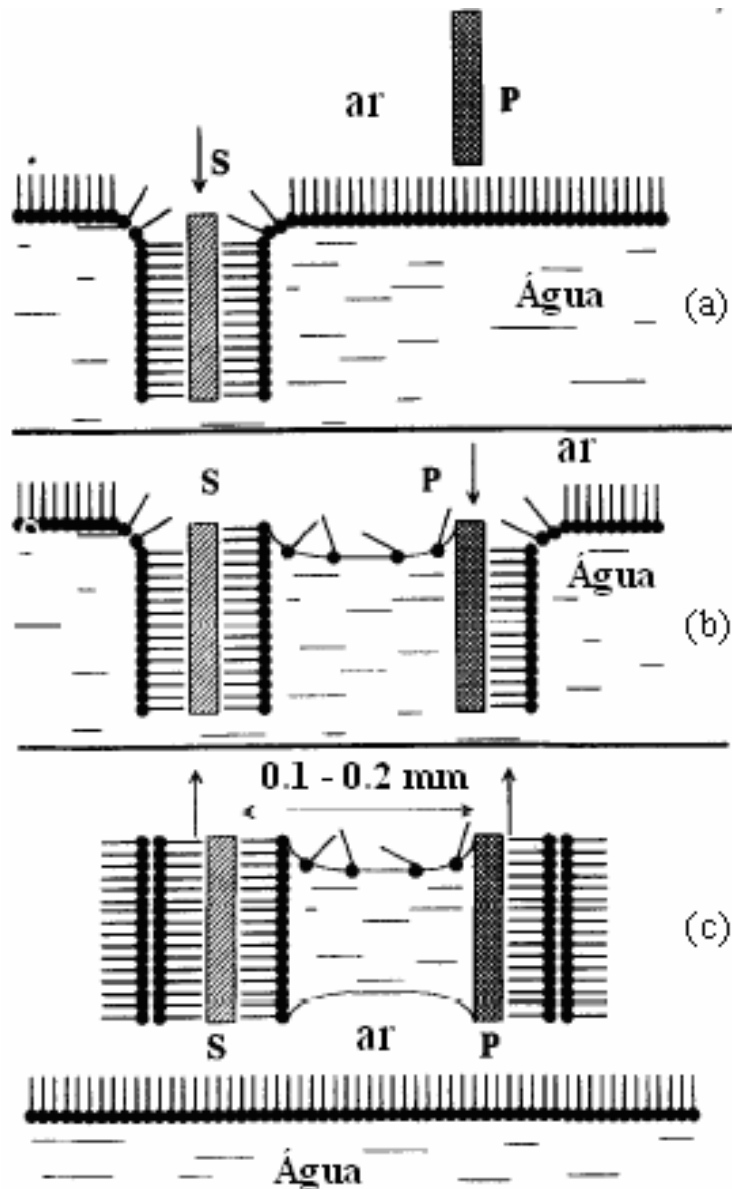


Figura 4.6 - Princípio do método proposto por TROITSKY *et al.* (1996). (a) - deposição da monocamada, (b) - Substrato sendo fechado pela placa e (c) - Sistema substrato-placa removido da subfase aquosa, P - placa e S substrato.

Esforços têm sido direcionados para imobilização de proteínas em superfícies sólidas. É provável que, em alguns casos, sistemas contendo proteínas *in vitro* simulem condições semelhantes ao sistema de imobilização *in vivo*. O rápido desenvolvimento da tecnologia de Langmuir-Blodgett oferece meios quase ideais para imobilização de proteínas de maneira controlada (WILKINSON *et al.*, 1986). Variáveis importantes podem ser precisamente monitoradas durante as reações, como por exemplo, a área por molécula. Variações nos parâmetros fundamentais e na energia livre de superfície

podem ser acompanhadas por uma simples medida da tensão de superfície (MacRITCHIE, 1991).

Observa-se na literatura uma atenção especial em preservar a biomolécula ativa e estável na forma de monocamada. Neste sentido, vários trabalhos vêm sendo publicados, como a finalidade de modificar a configuração da monocamada, manter as proteínas mais estáveis e ativas por mais tempo. Outros trabalhos, têm como focos principais a descoberta de novos materiais e / ou a modificação das ligações proteína – substrato, através da inclusão de novos elementos, com por exemplo, metais (PACK *et al.*, 1997).

Os filmes podem ser utilizados para auxiliar na compreensão e reconstituição de sistemas biológicos complexos como as membranas biológicas. A interação entre componentes diferentes de membranas biológicas é complexa porque as biomembranas são constituídas por diferentes moléculas. O problema inicial no estudo de biomembranas se dá desde a caracterização das interações binárias entre as moléculas de forma isolada. Utilizando-se a técnica de Langmuir-Blodgett, estas interações podem ser estudadas isoladamente. Uma vez que as interações binárias estejam bem estabelecidas, a etapa final seria a reconstituição completa destas estruturas (LAMARCHE *et al.*, 1988).

Os principais e os mais críticos processos celulares resultam de atividades que ocorrem na membrana, como por exemplo, a síntese de trifosfato de adenosina (ATP). Outro processo membranar importante é o transporte de moléculas polares de baixa massa molar, entre elas alguns íons, água, glicose entre outros, realizado pela proteína F (OmpF), que também atua na regulação da pressão osmótica entre as células e o meio (HO *et al.*, 2006).

A influência de variáveis como temperatura, força iônica, íons divalentes e a concentração de proteína no filme, associada a variações na pressão superficial, podem fornecer importantes informações sobre a natureza da interação proteína – lipídio (VERGER e PATTUS, 1982).

A imobilização de proteínas na interface ar / fluido é um processo necessário para a estabilização de espumas, que apresentam uma variedade de aplicações em diversos campos como: na medicina, na bioquímica e no processamento de alimentos. Há uma quantidade limitada de sistemas estabilizantes contendo espumas que podem ser utilizados *in vivo* no tratamento da saúde humana e animal. Quando bolhas de gás são injetadas junto com líquidos, diretamente no sistema sanguíneo, ocorre uma melhora significativa na resposta de ultra-som do coração. Estes produtos consistem de bolhas de 1 a 10µm dispersas em uma solução de sal isotônica, estabilizada por um ou mais surfactantes poliméricos. A albumina do soro humano (HSA) é aplicada como tal estabilizante devido a propriedades como, elevado grau de adsorção, capacidade estabilizante e excelente biocompatibilidade (HANSEN e MYRVOLD 1995).

No caso de proteínas membranares, o sistema de monocamadas na interface gás / líquido é um modelo que imita membranas biológicas. Estes sistemas permitem estudos da influência da temperatura, da força iônica e do pH da subfase, permitindo também a avaliação de propriedades termodinâmicas do sistema. As monocamadas podem ser igualmente transferidas para um suporte sólido, permitindo a preparação de amostras para a microscopia eletrônica, microscopia de tunelamento por varredura e a microscopia de força atômica (HEYN *et al.*, 1991).

A hemoglobina é uma importante proteína para o sistema respiratório dos animais vertebrados, devido a sua capacidade de estocar e carrear oxigênio do sangue. YIN *et al.* (2006) estudaram a formação de filmes de Langmuir – Blodgett da hemoglobina, observando que esta proteína apresenta dois tipos de fase de transição, uma fase instável e outra bem estável proporcionando uma estrutura bem ordenada.

SLOTTE (1992) estudou a ação catalítica da enzima colesterol oxidase de *Streptomyces cinnamomeus-A*, utilizando a estrutura de filmes monomoleculares na interface ar/ água, sendo que o sistema continha na subfase o substrato da enzima. A expansão da área da monocamada em função do tempo, obtendo-se perfis idênticos ao mostrado na Figura 4.7. Foi observado assim uma expansão na área do filme formado, pois a molécula do produto formado através da ação enzimática tem um tamanho maior que o substrato.

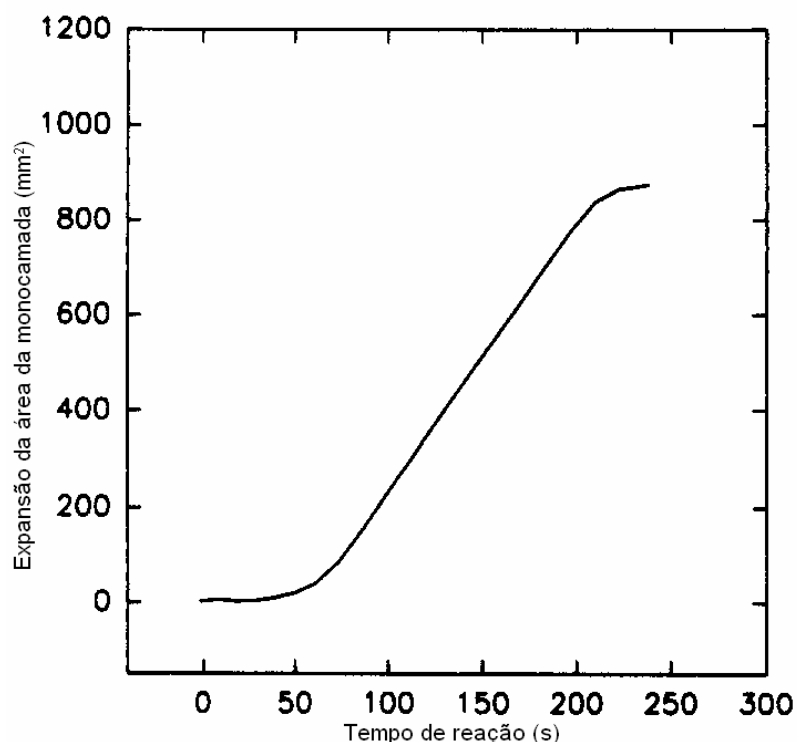


Figura 4.7 – Oxidação da monocamada de colesterol. Curva representativa da ação da oxidase em muitas monocamadas de esterol (SLOTTE, 1992).

Moléculas como glicosilfosfatidilinositol (GPI) apresentam alta afinidade pelas membranas lipídicas e, conseqüentemente, alta afinidade pela interface lipídio / água (PATTUS *et al.*, 1981; EL KIRAT *et al.*, 2002, 2003 e 2004). Há forte evidência que a hialuronidase do testículo bovino possui um grupamento GPI ancorado, pois a mesma apresenta sua atividade catalítica *in vivo* na membrana que envolve o óvulo (LALANCETE *et al.*, 2004). Assim, parece razoável imaginar que a hialuronidase possua uma certa afinidade por membranas. Soma-se a isto, o fato de que na literatura existem vários trabalhos nos quais já foi identificada a presença desta molécula ancorada em outros tipos de hialuronidases (SEATON *et al.*, 2004; MEYERS e ROSENBERGER, 2004).

Muitas proteínas vêm sendo estudadas na forma de filmes monomoleculares. CASELI *et al.* (2002) utilizaram a estrutura de filmes de Langmuir – Blodgett para estudar a atividade enzimática da fosfatase alcalina adsorvida sobre o ácido dimeristoil fosfatídico (DMPA). Os autores observaram que a enzima adsorvida apresenta uma atividade de 12 a 17 % em relação a encontrada em meio homogêneo. Estes resultados mostram que a técnica de Langmuir – Blodgett ainda reduz significativamente a

atividade enzimática, exigindo que novos métodos de deposição, novas configurações sejam desenvolvidas e/ou aprimoradas.

Proteínas como, Citocromo f, imonoglobulina, β - caseína, fosfatase alcalina, albumina do soro bovino (BSA), IgG, rodopsina bovina, luciferase, vêm sendo estudada e caracterizadas utilizando-se a técnica de Langmuir – Blodgett. (TAZI *et al.*, 1999 ; EROKHIN *et al.*, 1998 ; NIÑO *et al.*, 1999; AKEN e MERKS 1996; PETRIGLIANO *et al.*, 1996; DUBROVSKY *et al.*, 1995; TRONIN *et al.*, 1996; PEPE *et al.*, 1996; MARRON-BRIGNONE *et al.*, 1996; LOBANOV *et al.*, 1995). Uma proteína bastante estudada na forma de filmes de Langmuir – Blodgett é a glicose oxidase, devido ao seu potencial na construção de biossensores de transferência (LI *et al.*, 1999; ALEXANDRE *et al.*, 1997; DUBREUIL *et al.*, 1998; ZAITSEV 1995).

Para construção de imuno-sensores seletivos e sensitivos é necessário que um filme de anticorpos seja altamente organizado sobre um suporte sólido. Normalmente o método de Langmuir-Blodgett é utilizado para preparar estes filmes. Aplicações de filmes de Langmuir-Blodgett de proteínas têm sido extensivamente estudadas, principalmente para a aplicação em biossensores e estudo de sistemas de interações de proteína-proteína. Os filmes de Langmuir–Blodgett ainda não são muito estáveis, provavelmente devido a pouca adesão da camada de proteína ao substrato e / ou a instabilidade nativa do filme polimérico (PREININGER *et al.*, 2000).

No sentido de prevenir que os anticorpos do filme desprendam do suporte facilmente e também para manter a atividade das moléculas é necessário um esquema de imobilização irreversível provido de uma elevada carga superficial. A imobilização covalente apresenta uma superfície carregada, o que resulta em um baixo desprendimento das moléculas, muito desejável para uma tecnologia de biossensores. Por outro lado, neste tipo de imobilização, normalmente ocorre uma baixa atividade, que depende tanto da proteína como da química de imobilização e do substrato (PREININGER *et al.*, 2000).

É bem conhecido que os surfactantes são moléculas ideais para a formação dos filmes na interface ar / água. Nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada aos surfactantes pulmonares (PANDA *et al.*, 2004). Os surfactantes pulmonares estabilizam

os pulmões para uma correta respiração, atuando na prevenção e no tratamento da síndrome de angústia respiratória (RDS), que ocorre frequentemente em crianças prematuras (PARK *et al.*, 1999). Dentre eles, o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) merece uma atenção especial por representar cerca de 45 a 50 % dos surfactantes pulmonares (RACHANA e BANERJEE, 2006). O DPPC é o principal responsável pela redução da tensão superficial que ocorre no interior dos alvéolos, que durante a expiração é próximo de 0 mN/m (RACHANA e BANERJEE, 2006). Outros fosfolipídios e lipídios neutros que estão presentes em menores quantidades, também são necessários para a ação efetiva dos surfactantes pulmonares, ajudando a DPPC a ter acesso à superfície durante o ciclo respiratório.

CAPÍTULO V

Materiais e Métodos

5.1 Introdução

Neste capítulo serão descritos os métodos de extração e isolamento da hialuronidase e as configurações do sistema de adsorção empregadas na purificação da enzima. Também serão apresentadas as metodologias de síntese e caracterização da hidroxiapatita. Posteriormente são apresentados os procedimentos experimentais de avaliação da influência dos parâmetros do sistema sobre os fenômenos de adsorção e dessorção das proteínas. Além disto, descreve-se a metodologia e os materiais empregados para o estudo de filmes monomoleculares da hialuronidase bovina. Os trabalhos experimentais foram realizados no Laboratório de Bioprocessos, no Núcleo de Catálise (NUCAT), ambos do PEQ/COPPE/UFRJ e, no Laboratório de Organização e Dinâmica de Membranas Biológicas, da Universidade Claude Bernard de Lyon na França.

5.2 Extração da Hialuronidase

A extração foi conduzida empregando-se diferentes soluções extratoras. Água em pH 5,5 e 9,0 (o ajuste do pH era realizado com solução de hidróxido de sódio 1M) a 4°C. Solução de sacarose 0,25M em pH 6,0 a 4°C. Tampão tris-HCl 0,02M e pH 9,0 a 4°C. Estas soluções foram utilizadas de acordo com trabalhos anteriores disponíveis na literatura (MARGOLIS *et al.*, 1972; JOY *et al.*, 1985; ARONSON e DAVIDSON, 1967; GOLD 1982; YAMADA *et al.*, 1977). Os testículos bovinos foram adquiridos diretamente do matadouro, situado na cidade de Campos dos Goytacazes – RJ. Primeiramente o epidídimo (a membrana que envolve o testículo) foi retirado, os testículos foram homogeneizados por 5 minutos utilizando-se um liquidificador (Walita HL 3252 potência máxima). O material foi centrifugado por 20 minutos a 5000 rpm (Sigma 204), a parte sólida foi descartada, o sobrenadante foi filtrado em membrana de

acetato de celulose (Millipore GSWP047S0, lote B5KM14285) 0,22 μm de poro utilizando-se uma bomba de vácuo (PRIMAR, modelo 141 tipo 2VC). O material filtrado foi analisado quanto ao teor de proteína total e de atividade enzimática da hialuronidase (segundo métodos descritos nas páginas nos itens 5.6 e 5.9 deste capítulo, respectivamente).

Após a extração das proteínas removidas com tampão tris-HCl 0,02M em pH 9,0 a 4°C, realizou-se extrações no material descartado com o detergente Triton X 10%. Extrações adicionais foram realizadas com tampão tris pH 7,4, contendo 50 mM NaCl e 0,2% de sacarose pepstatina e leupeptina (0.25 mM cada). Ao final das etapas de extração, o homogenato foi centrifugado a 150.000 g por 30 min a 4°C.

5.3 Síntese da Hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi sintetizada no Laboratório do Núcleo de Catálise (NUCAT) utilizando o método de precipitação (SHIMODA *et al.*, 1990) em proporções estequiométricas, para obtenção de material com razão molar cálcio:fósforo igual a 1,67, segundo procedimento descrito abaixo.

Prepara-se uma solução 0,50M de nitrato de cálcio (solução A) e uma segunda solução 0,3M de fosfato dibásico de amônio (solução B). Ajusta-se o pH das duas soluções entre 10-11 com adição de NH_4OH . Coloca-se a solução A (750ml) em um balão de três vias, equipado com termômetro, condensador e com entrada para alimentação da solução B. Adiciona-se lentamente a solução B (750ml), com auxílio de uma bomba peristáltica (Master Flex modelo-7519-65), utilizando uma vazão de 100 mL/h sob agitação magnética constante. Nestas condições ocorre a precipitação da HAp. Mantém-se o sistema em um banho de silicone a 80°C (± 5 °C) durante a adição, permanecendo sob agitação nesta temperatura por mais duas horas. Após o envelhecimento, a mistura é filtrada a quente em papel de filtro em um funil de Buckner. O sólido é lavado a quente até que o pH do filtrado esteja em torno de sete e, posteriormente, seco em uma estufa por 24 horas, a temperatura de 100 °C, e

classificado em uma peneira de malha igual a 65 mesh. O material final foi denominado de HAp.

5.4 Caracterização do Adsorvente

5.4.1 Composição Química Mássica

A razão cálcio:fósforo das amostras foi determinada por meio do ensaio de fluorescência realizado em equipamento Rigaku, modelo RIX 3100, usando uma fonte de Rutênio (Rh) nas linhas de $Ca\alpha$, Pa , $O\alpha$ e $C\alpha$.

5.4.2 Composição Química de Superfície

A identificação da composição química de superfície foi determinada por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), utilizando o equipamento Perkin-Elmer 1257 com anôdo de Mg a 200W ($h\nu=1253,6$ eV).

Os espectros foram analisados em termos das intensidades relativas e do deslocamento químico do Ca e do P. O efeito de carga foi corrigido usando o pico do C_{1s} , com energia de ligação (E_L) fixada em 284,6 eV. Para a medida de intensidade, usou-se o pico Ca_{2p} e P_{2p} , visto que estes apresentam valores de energia cinética (E_C) semelhante. O cálculo da razão Ca/P foi realizado através da determinação das áreas dos picos Ca e P após a subtração do fundo inelástico (background) e da correção das intensidades pelos respectivos fatores de sensibilidade, como descrito por SHIRLEY (1972).

5.4.3 Propriedades Texturais

As propriedades texturais foram avaliadas a partir das isotermas de adsorção física de N_2 a -196 °C, pelo método BET, utilizando o equipamento Micromeritics ASAP-2000 A. As amostras foram pré-tratadas a 150 °C, sob vácuo (5×10^{-6} Torr) durante

aproximadamente 8 horas para retirada de umidade. O cálculo da distribuição do tamanho de poros foi obtido baseado no método BJH (BARRETT, 1951).

5.4.4 Análise de Estrutura e Pureza de Fases

A morfologia e a pureza das fases foram caracterizadas através da análise de difração de raios-X, usando o equipamento Rigaku modelo Miniflex TG em fonte $\text{CuK}\alpha$ ($V=30\text{kv}$ e $I=15\text{mA}$), no intervalo de $2^\circ < 2\theta < 100^\circ$ e com passo de $0,05^\circ$ e tempo de contagem de 2 segundos. A identificação das fases foi realizada, utilizando o padrão do banco de dados ICDD-PDF-09-0432 através do método de Hanawalt.

5.4.5 Determinação de Propriedades Elétricas - Potencial Zeta

As propriedades elétricas do material foram determinadas utilizando o aparelho Zeta Probe - Colloidal Dynamics. Os potenciais zeta da HAp em função do pH foram determinados a partir de uma suspensão do material contendo 3,2 % (massa/volume). A variação do pH foi controlada via titulação automática, realizada pelo próprio equipamento, usando soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio (1M). A aquisição dos dados foi obtida através do software ZetaProbe.

5.4.6 Determinação do Tamanho de Partículas

Os ensaios foram realizados utilizando o Malvern - Master sizer Plus baseado na técnica de difração de raio laser, a partir de uma suspensão da amostra contendo aproximadamente 0,2% (massa/volume). Realizaram-se testes na presença e na ausência de ultra-som, buscando-se desta forma avaliar a resistência mecânica das partículas.

5.5 Adsorção em Batelada

As isotermas de adsorção foram obtidas através de medidas da concentração de equilíbrio da proteína em solução aquosa. Utilizaram-se para os testes as proteínas hialuronidase do testículo bovino tipo *I-S* e *IV-S* e a albumina do soro bovino.

Hialuronidases do testículo bovino dos tipos *I-S* e *IV-S* foram da Sigma Chemical Co, cristalizadas e liofilizadas. A albumina de soro bovino (BSA) foi fornecida pela Sigma Chemical Co, (lote 56H0659), cristalizada e liofilizada, com massa molar de $6,9 \times 10^4$ Da, tamanho de 11,6 nm x 2,7 nm x 2,7 nm e ponto isoelétrico na faixa de 4,7-4,9 (PUTMAN *et al.*, 1997).

Os experimentos foram conduzidos em frascos de 30 ml, colocando-se em contato a solução de proteína com o adsorvente. Utilizou-se em cada frasco 30 ml de solução de proteína, com concentração inicial variando de 0,1 g/L a 1,5 g/L, e 0,350g, 0,175 e 0,0875 g de HAp. Nestas condições, o pH do sistema encontra-se em torno de 6,5 para a BSA e 7,10 para Hya. O ajuste do pH para valores diferentes, em experimentos de avaliação da influência do pH na adsorção, foi realizado através da adição de ácido clorídrico 1,0M e de hidróxido de sódio 1,0 M, até o pH desejado. O sistema foi mantido a temperatura constante de 25 °C, sob agitação constante de 150 rpm, em um agitador rotatório (New Brunswick Scientific co. Inc - modelo G24 environmental incubator Shaker) até atingir o equilíbrio, determinado anteriormente através de ensaios de cinética de adsorção para ambas as proteínas (2h para BSA e 1h para Hya). Em seguida o material foi centrifugado (centrífuga modelo Jouan – CR3i) por 10 min a 10.000 rpm. A concentração de proteínas em solução foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A avaliação da influência do pH na adsorção das proteínas foi verificada a partir de uma solução com concentração inicial de 1,0 g/L para BSA e 0,1 g/L para Hya a 25 °C.

A adsorção da mistura binária foi realizada com 30 ml da mistura das proteínas comerciais BSA (0,5 g/L) e hialuronidase (0,5 g/L) nas mesmas condições das adsorções em batelada em separado para cada proteína.

5.6 Dosagem de Proteína

A dosagem do teor de proteína em solução foi realizada com base no método de Bradford (BRADFORD, 1976) em um espectrofotômetro modelo Spectronic 20D+, com o comprimento de onda de 600 nm. A metodologia usada é descrita a seguir:

Preparo da Solução Corante - Para a preparação de 575 mL do reagente deve-se dissolver 50 mg (0,05g) de Azul Brilhante de Coomassie G (Sigma) em 25 mL de etanol (95%), sob agitação constante. Em seguida, mistura-se 50 mL de ácido fosfórico a 85% e dilui-se a solução com 500 mL de H₂O destilada. A solução é filtrada para remoção do corante não dissolvido e estocada a 4 °C.

Determinação da Curva de Calibração - A curva é construída com soluções de BSA na faixa de 0,02 g/L a 0,1 g/L. Os pontos são obtidos com alíquotas de 0,6 mL (600 µL) da solução de BSA em uma cubeta com 6mL da solução corante, mediante agitação. O zero do espectrofotômetro deve ser ajustado com uma amostra contendo 600µL de água em 6 mL da solução corante. As amostras devem ser lidas no intervalo de tempo de 10 min a 30 min no comprimento de onda de 600 nm.

5.7 Determinação dos Parâmetros das Isotermas de Adsorção

No cálculo dos parâmetros das isotermas, é necessária a utilização de um modelo. Os pontos experimentais foram ajustados ao modelo de Langmuir, utilizando-se, primeiramente, a regressão linear (equação de Langmuir linearizada). Posteriormente, usou-se o método de mínimos quadrados, com o auxílio do STATISTICA[®], para estimar os parâmetros da equação de Langmuir em sua forma original (hiperbólica).

5.8 Ensaios Preliminares de Dessorção da Hialuronidase

Após a adsorção em batelada foram realizados ensaios de dessorção tanto da mistura binária como dos extratos. Os testes foram realizados variando-se a concentração molar dos agentes eluentes, tampão fosfato de sódio e solução de cloreto de cálcio, de 0,1M a 0,0001M. Também foram realizados testes de dessorção variando-se o pH da água de 5,3 a 8,3, e o ajuste foi feito utilizando-se hidróxido de sódio.

5.9 Atividade Enzimática da Hialuronidase

O método desenvolvido por TOLKSDORF *et al.* (1949) e KASS e SEASTONE (1944) para a determinação da atividade enzimática baseia-se fundamentalmente na medida de turbidez. De forma bastante simplificada, a metodologia empregada para determinação da atividade da hialuronidase é baseada no fato de o ácido hialurônico reagir com o hidrolisado de BSA formando um precipitado, que em concentrações adequadas torna a amostra turbida. A concentração do ácido hialurônico é diretamente proporcional à turbidez da amostra. A ação catalítica da hialuronidase sobre o ácido hialurônico, impede a interação deste com o hidrolisado de BSA, reduzindo a turbidez da amostra. Desta forma, correlaciona-se a atividade de hialuronidase com a turbidez da amostra. Quanto maior a atividade de hialuronidase, menor será a turbidez da amostra. Os reagentes e a metodologia usada são descritos a seguir:

- Tampão fosfato de sódio 0,1 molar, pH 5,3 com 0,15 molar de cloreto de sódio.
- Tampão acetato de sódio 0,5 molar, pH 4,2.
- **Solução da Albumina** – dissolve-se 2,5 gramas de albumina de soro bovino, em 250 mililitros de tampão acetato de sódio 0,5 M, pH 4,2. Ajusta-se o pH para 3,0 com ácido clorídrico 2M e mantém-se a 93 °C por 30 minutos. Após o resfriamento até 25 °C, ajusta-se o volume final para 1000 mililitros com tampão acetato de sódio, pH 4,2.
- **Solução de Ácido Hialurônico (HA)** – 10 miligramas do ácido hialurônico dissolvido em 25 ml de tampão fosfato de sódio, pH 5,3 com 0,15 M de cloreto de sódio. Caso o material não solubilize imediatamente, a solução deve ser aquecida em um banho de água a 100 °C por aproximadamente 10 a 15 minutos.
- **Teste Enzimático** – Pipeta-se 0,5 mL da solução do ácido hialurônico 0,4 mg/mL em uma série de tubos. Incuba-se a 37 °C por 4 a 5 minutos para atingir a temperatura de equilíbrio. Incuba-se um branco com 1 mL de tampão fosfato de sódio, pH 5,3 com 0,15 M de cloreto de sódio. Incuba-se cada tubo exatamente por 10 minutos em um banho frio (4 °C). Depois, adiciona-se 9,0 mL da solução de albumina em cada tubo e incuba-se por mais 10 minutos. A absorbância de cada tubo deve ser lida no comprimento de onda de 540 nm e

posteriormente comparada com a aquela obtida para o branco. Com estes testes obtém-se a curva de calibração, na qual correlaciona-se a quantidade de ácido hialurônico consumido com a turbidez.

Para a quantificação da atividade, subtraiu-se a quantidade de ácido hialurônico (que reagiu com o hidrolisado de BSA, quantificado através da curva de calibração) da quantidade inicial de ácido hialurônico (utilizou-se 0,2 mg nos testes). Este valor corresponde à quantidade de ácido hialurônico consumido. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que consome 0,75 μg de ácido hialurônico em pH 5,3 a 37 °C no tempo de 10 minutos.

5.10 Formação de Filmes Monomoleculares

Os experimentos foram realizados a temperatura constante de 21.0 ± 0.1 °C. A balança de Langmuir (Riegler & Kirstein, Wiesbaden, Alemanha) foi equipada com um sistema de medição de pressão de superfície do tipo Wilhelmy (EL KIRAT, 2000). Dependendo do tipo de experimento, foi utilizado na subfase um tampão fosfato 100 mM contendo ou não 150 mM NaCl para diferentes valores de pH. Em todos os experimentos de injeção de proteína (ensaios em que a proteína era depositada no seio da subfase), a subfase era agitada continuamente por um agitador magnético com velocidade de agitação de 100 rpm. Para os testes de adsorção da hialuronidase com a área constante, os experimentos foram conduzidos em um pequeno disco de Teflon (3 cm de diâmetro) com um volume da subfase de 7 mL. A preparação enzimática foi injetada na subfase em uma concentração final de 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A adsorção da hialuronidase na interface ar/água foi medida por tensiometria, acompanhada pelo aumento da pressão na superfície. As isotermas π -A da proteína foram medidas após a deposição ou após a injeção de uma quantidade conhecida de hialuronidase (indicada em cada experimento) na balança de Langmuir (dimensão: 165 cm^2 e 120 mL de solução tampão na subfase). Após 15 min, a superfície era comprimida com uma velocidade de 6 cm^2/min . Em tempos de adsorção pré-determinados para compressão–descompressão–compressão, as isotermas da π -A correspondem à adsorção acumulativa

no tempo em relação a pressão de superfície zero. Considerou-se que a proteína é fracamente adsorvida na interface durante a descompressão.

O módulo de elasticidade foi calculado com base nos dados de pressão *versus* área, obtidos da compressão das monocamadas, utilizando-se a seguinte equação:

$$k_s = -A_x \frac{d\pi}{dA} \quad (1)$$

onde A_x é a área molecular para cada pressão π .

Também foram realizados experimentos, nos quais a proteína era depositada diretamente na interface. Para estes experimento utilizava-se uma solução de proteína com concentração inicial de 1 mg /mL. O ciclo de compressão-descompressão era realizado após 20 minutos da deposição das moléculas. Os experimentos eram realizados a temperatura constante de 21 °C.

5.11 Medidas de Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram coletados como descrito por BONNIN *et al.* (1999). Utilizou-se um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier, modelo Nicolet 510M FTIR. Os espectros foram obtidos a 25 °C com uma resolução de 4 cm⁻¹. Para as análises, alíquotas de 20 µl de solução de hialuronidase 10 mg/mL, preparadas em tampão fosfato 100 mM em água deionizada, contendo 150 mM NaCl para diferentes valores de pH, foram depositadas sobre a célula de CaF₂. A concentração de hialuronidase foi determinada à partir de deconvolução dos espectros. Tipicamente, o espectro ou uma região espectral de interesse é representada como uma soma de distribuições lorentzianas. Para caracterização da hialuronidase, a região espectral correspondente a amida foi escolhida devido a presença deste grupo na sua estrutura química. Desta forma, a concentração de hialuronidase é determinada pela razão entre a área tomada na região espectral de interesse (1515 cm⁻¹) e a área referente ao grupamento amida.

5.12 Modelagem Tridimensional da Estrutura da Hialuronidase de Testículo Bovino

A hialuronidase do testículo bovino, com código de seqüência Q7YS45 (CHOWPONGPANG *et al.*, 2004), foi modelada com a versão 4.0 do programa MODELLER (SALI *et al.*, 1993) utilizando-se a estrutura tridimensional da hialuronidase do veneno de abelha (1FCU Protein Data Bank) (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000).

5.13 Microscopia pelo Ângulo de Brewster (BAM)

A morfologia da monocamada de hialuronidase e da monocamada mista de hialuronidase / lipídios na interface ar / água foi observada através do emprego do microscópio a ângulo de Brewster (NFT iElli-2000, Göttingen, Germany), montado sobre a balança de Langmuir (Riegler & Kirstein GmbH, Wiesbaden, Germany). O microscópio era equipado com um laser Nd:YAG de dupla frequência, um polarizador e uma câmera CDD. A resolução espacial do BAM era em torno de 2 μm e o tamanho das imagens de 430 x 320 μm .

CAPÍTULO VI

Resultados e Discussões

6.1 Introdução

Este capítulo apresenta os resultados da preparação e da caracterização da hidroxiapatita, adsorvente utilizado neste trabalho. Simultaneamente, será apresentada uma discussão abordando as principais propriedades físico-químicas que afetam o desempenho no processo de adsorção.

O objetivo central é a avaliação da adsorção e dessorção da hialuronidase de testículo bovino em hidroxiapatita. Estuda-se, portanto a influência do pH, da quantidade do adsorvente, da concentração de proteína e do tempo de adsorção, bem como do material que constituía o frasco utilizado para a adsorção em batelada. Nos testes de dessorção foram utilizados diferentes agentes eluentes em diferentes concentrações. Serão apresentados os resultados da extração da hialuronidase diretamente do testículo bovino, com diferentes agentes extratores e os resultados de adsorção e dessorção de proteínas em HAp dos extratos obtidos, visando a separação da proteína hialuronidase.

Neste capítulo serão também discutidos os resultados de modelagem molecular da hialuronidase de testículo bovino, que tiveram papel fundamental para o esclarecimento das propriedades anfifílicas desta proteína. Serão apresentados os resultados e as discussões sobre o estudo de filmes monomoleculares da hialuronidase, realizados com a finalidade de avaliar a influência na adsorção da proteína na interface de fatores como, as propriedades interfaciais da enzima, o efeito da variação de pH da subfase, a influência da presença de uma camada lipídica na interface. Ainda serão mostradas as imagens obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster, objetivando uma melhor compreensão do comportamento da proteína na interface.

6.2 Síntese e Caracterização da Hidroxiapatita

6.2.1 Síntese da Hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi preparada pelo método de precipitação, conforme descrito no Capítulo V (materiais e métodos). A escolha deste adsorvente foi devida a sua alta seletividade e capacidade de resolução na adsorção de proteínas. Soma-se a estas propriedades o fato de que toda a metodologia para o preparo e caracterização deste adsorvente, bem como o seu emprego na separação de proteínas, foi bem estabelecida em trabalhos anteriores (GONÇALVES, 2002).

6.2.2 Composição Química Mássica e de Superfície

A razão cálcio / fósforo (Ca/P) do adsorvente foi determinada por de ensaios de fluorescência. Já a relação Ca/P na superfície, foi determinada utilizando-se a espectroscopia fotoeletrônica de raio-X. Ambos os valores obtidos para a relação cálcio / fósforo, mássica e de superfície dos adsorventes estão apresentados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Relação cálcio / fósforo, mássica e de superfície da hidroxiapatita.

	Ca/P (mássica)	Ca/P (superfície)
HAp	1,59	1,49

Estes valores mostram que a hidroxiapatita preparada é deficiente em cálcio, apresentando uma relação menor que a estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{HO})_2$ e $\text{Ca/P} = 1,67$). Estes resultados podem ser atribuídos a diversos fatores, como por exemplo, o uso de reagentes com o teor nominal superior ao teor real, a diluição do cálcio na etapa de lavagem e/ou a possível formação de carbohidroxiapatita superficiais mais solúveis que HAp em água a 80 °C.

6.2.3 Propriedades Texturais

As propriedades texturais foram determinadas pela avaliação dos resultados obtidos a partir das isotermas de fisissorção de N_2 a -196 °C, usando o método BET e o BJH, como mostra a Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Propriedades texturais e composições químicas

	$S (m^2/g)$	$V (cm^3/g)$	$\bar{D}_p (\text{Å})$
HAp	43,5	0,134	174

Os resultados mostram que o adsorvente é tipicamente mesoporoso ($20 < \bar{D} < 250$). Este resultado é promissor, no que concerne a viabilização do emprego deste material na adsorção de proteínas, uma vez que o diâmetro de poros é maior que o diâmetro médio da maioria das proteínas. Desta forma, toda a área superficial do adsorvente vai estar disponível no processo de adsorção.

6.2.4 Análise da Estrutura e Pureza das Fases dos Adsorventes

A Figura 6.1 mostra o difratograma obtido para a HAp, comparado ao banco de dados ICDD-PDF-09-0432. A análise dos dados permite observar que a HAp preparada no laboratório, apresenta estrutura hexagonal, característica da hidroxiapatita, comprovado pela presença dos planos característicos deste material: $2\theta = 31,773$ (2 1 1), $2\theta = 32,196$ (1 1 2), $2\theta = 32,902$ (3 0 0), $2\theta = 25,879$ (0 0 2), $2\theta = 49,468$ (2 1 3), $2\theta = 46,711$ (2 2 2), $2\theta = 34,048$ (2 0 2), $2\theta = 39,818$ (3 1 0), $2\theta = 50,493$ (3 2 1), $2\theta = 53,143$ (0 0 4).

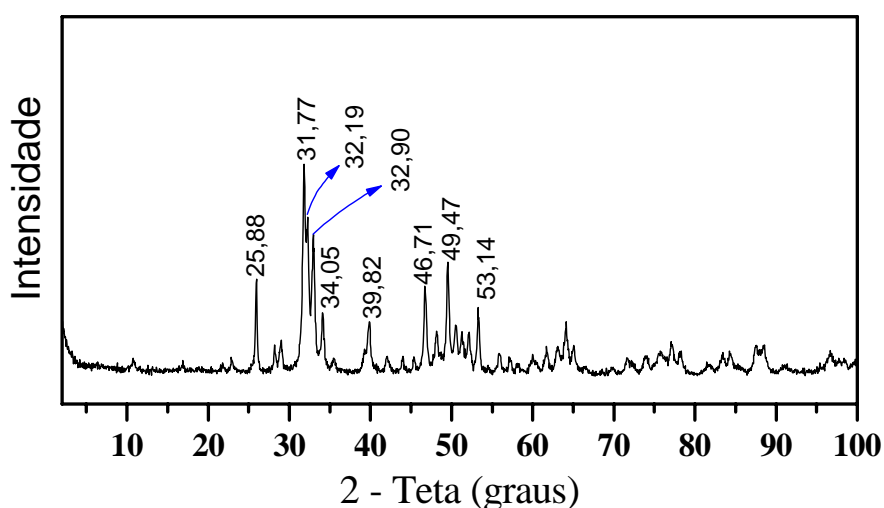


Figura 6.1 – Difratograma da HAp.

Com base no difratograma apresentado na Figura 6.1, pode-se concluir que a hidroxiapatita é um material cristalino e apresenta-se como uma fase pura.

6.2.5 Potencial Zeta

O perfil do potencial zeta da hidroxiapatita em função do pH, mostrado na Figura 6.2, permite concluir que o ponto isoelétrico da HAp ocorre aproximadamente em pH 6,6.

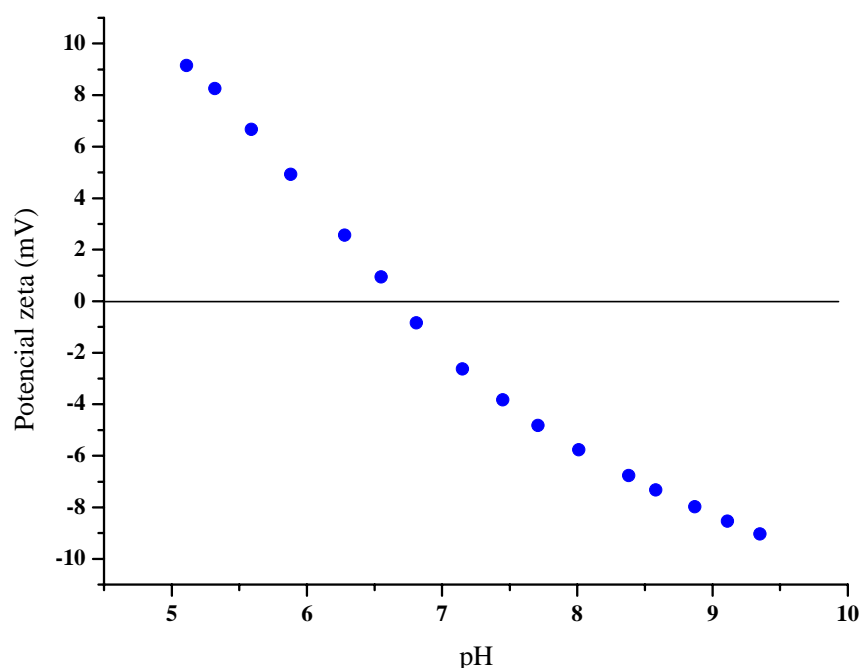


Figura 6.2 - Potencial Zeta da hidroxiapatita em função do pH.

A variação do potencial zeta de 10mV a -10mV na faixa de pH estudada (5,0 <pH<9,5) indica que o adsorvente possui cargas positivas e negativas na superfície.

6.2.6 Tamanho de Partícula

O tamanho da partícula é uma característica muito importante no processo de adsorção, principalmente quando se deseja trabalhar com colunas de cromatografia. Nos processos em batelada esta característica também é importante, pois quanto menor a partícula maior a área superficial acessível para a adsorção. Na determinação do tamanho da partícula foram utilizados dois procedimentos, como já descrito no Capítulo V (Materiais e Métodos). Na presença de ultra-som, para quebra de aglomerados, e sem ultra-som. A Figura 6.3 foi construída com os dados referentes aos ensaios com ultra-som da HAp.

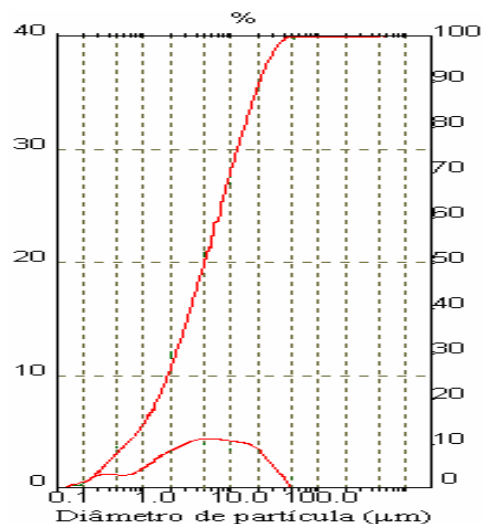


Figura 6.3 - Diâmetro de partícula da HAp com o uso de ondas de ultra-som.

Pode-se observar que há uma fração dos materiais com tamanho maior que 80 μm . O material foi reclassificado em peneiras na faixa de 15 a 212 mesh, separando-se o material retido na peneira de 212 mesh e sendo novamente analisado.

A Figura 6.4 mostra a curva de distribuição do diâmetro de partícula para HAp não submetida a ondas de ultra-som, indicando que há uma maior quantidade de material na região de maior diâmetro de partícula, o que já era esperado, pois a ausência de vibrações contribui para a aglomeração das partículas.

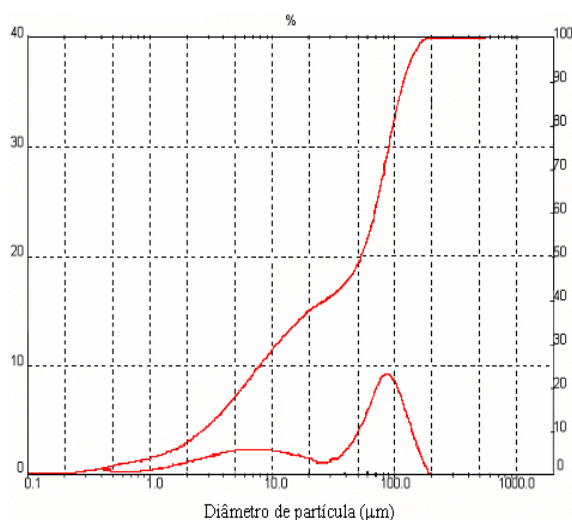


Figura 6.4 - Diâmetro de partícula da HAp não submetido a ondas de ultra-som.

Os valores do diâmetro médio de partícula nos ensaios realizados sem ultra-som para a HAp é de 53 μm . Comparando ao valor de diâmetro médio de partículas obtidos nas Figuras 6.3, nota-se que há um grande aumento do diâmetro quando não se utiliza os ensaios com ultra-som. Nos processos em batelada, o diâmetro que deve ser levado em consideração é o correspondente ao encontrado nos ensaios sem ultra-som, uma vez que este processo não ocorre em altas pressões.

Estes tamanhos de partícula não são apropriados para a utilização em colunas de cromatografia, modificações por envelhecimento do cristal e / ou tratamentos térmicos podem ser utilizados para obtenção de partículas de tamanho apropriado (LAZIÈ *et al*, 1996; GONÇALVES, 2002).

Os resultados apresentados mostram que foram obtidos adsorventes com propriedades físico-químicas bem definidas o que é um fator determinante para as possíveis correlações entre desempenho e natureza do adsorvente.

6.3 Adsorção da Hialuronidase em Hidroxiapatita

6.3.1 Influência do Tempo de Adsorção da Hialuronidase em Hidroxiapatita em Função do pH

Com o objetivo de avaliar simultaneamente o tempo de adsorção e a influência do pH foram realizados testes em batelada utilizando 0,350 g de hidroxiapatita e concentração inicial de preparo enzimático de 0,1 g/L. Utilizou-se tempos de uma hora e vinte quatro horas, variando-se o pH de cinco a onze. Os resultados estão apresentados na Figura 6.5.

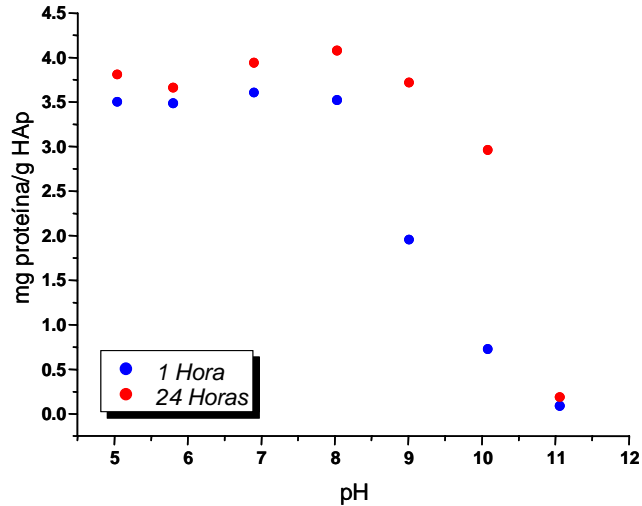


Figura 6.5 – Influência do tempo de contato na adsorção da hialuronidase em HAp (0,350 g), $C_0=0,1$ g/L, $V=15$ ml a 25 °C.

A análise da Figura 6.5 mostra que para os valores de pH de cinco até oito e para o pH onze não há variação significativa na adsorção com relação ao tempo de uma e vinte quatro horas, porém para os valores de pH nove e dez observa-se um aumento de aproximadamente 85% e 400% respectivamente, para a adsorção em vinte quatro horas em relação à adsorção em uma hora. Com base nestes resultados os experimentos posteriores foram executados com o tempo de contato de uma hora, intervalo de tempo necessário para atingir o equilíbrio em valores de pH na faixa de 5,0 a 8,0.

Com base nos resultados apresentados na Figura 6.5, podemos concluir que o tempo é uma variável que influencia fortemente a adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita, em valores de pH na faixa de nove a dez. Observa-se que o tempo altera a adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita, principalmente em valores de pH onde as interações eletrostáticas não são favorecidas (valores de pH acima de 7), uma vez que nesta faixa de pH, tanto o adsorvente como a proteína apresentam carga líquida de superfície negativa.

Observa-se também que para o pH 11 não há diferença na adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita em função do tempo. Contudo, é importante ressaltar que para este valor de pH, a adsorção é basicamente nula, tanto para o tempo de uma hora como para o tempo de vinte quatro horas.

Contudo observou-se que o máximo de adsorção ocorre entre os pHs de cinco a oito. Porém, a relação da concentração de proteína inicial em solução por massa de adsorvente utilizada nestes testes apresenta-se muito baixa, não sendo possível identificar o pH ótimo de adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita nestas condições. Em função disso, se fez necessário à realização de novos testes para avaliação do pH ótimo de adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita, os quais estão apresentados na seção seguinte.

6.3.2 Avaliação do pH Ótimo

Os testes para a avaliação do pH na adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita foram realizados variando-se a relação concentração de proteína inicial em solução por massa de adsorvente. Os testes foram realizados com soluções iniciais de hialuronidase de 0,2 g/L e volume de 15 mL, variando-se a massa de hidroxiapatita de 0,350, 0,175 e 0,085 g. Os resultados estão apresentados na Figura 6.6.

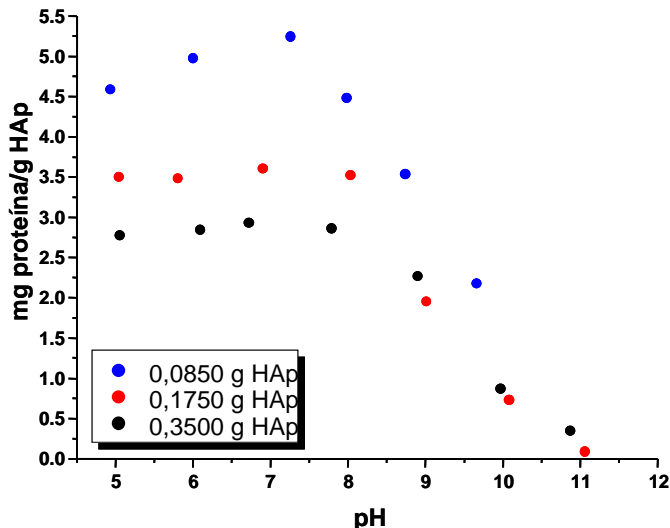


Figura 6.6 – Influência do pH nos testes de adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita, concentração inicial = 0,2 g/L, V= 15 mL e T = 25°C, Tempo = 1h

A Figura 6.6 mostra que em excesso de adsorvente para pH abaixo de oito ocorre uma adsorção total da proteína em solução (massas de 0,350 e 0,175). Em função disso, não foi possível identificar o melhor pH de adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita para os testes realizados com essas massas de adsorvente. Pode-se

observar ainda na Figura 6.6 que para os ensaios realizados com a massa de 0,085 g de adsorvente o pH ótimo de adsorção é de 7,2.

Em valores de pH abaixo de 7,0 sabe-se que a hidroxiapatita apresenta-se carregada positivamente, conforme apresentado na Figura 6.2 (potencial zeta da hidroxiapatita), ou seja, com seus sítios cálcio favoráveis à adsorção, através de forças eletrostáticas. Por outro lado, observa-se que a hialuronidase adsorve em maiores quantidades nesta mesma faixa de pH (Figura 6.6), o que indica que a hialuronidase não adsorve preferencialmente nos sítios fosfato da hidroxiapatita.

A literatura reporta que a hialuronidase sofre interação com o vidro. Por isso, recomenda-se que os estudos realizados com esta proteína devam ser conduzidos em recipientes a base de polímeros como, por exemplo, o poliestireno ou em recipientes de sílica temperada para evitar esta interação. Uma vez que nos laboratórios a maior parte dos materiais utilizados é de vidro, decidiu-se avaliar esta interação. Neste sentido foram realizados testes de adsorção simultânea da hialuronidase em hidroxiapatita utilizando recipientes de vidro e de poliestireno. Os resultados estão apresentados na Figura 6.7.

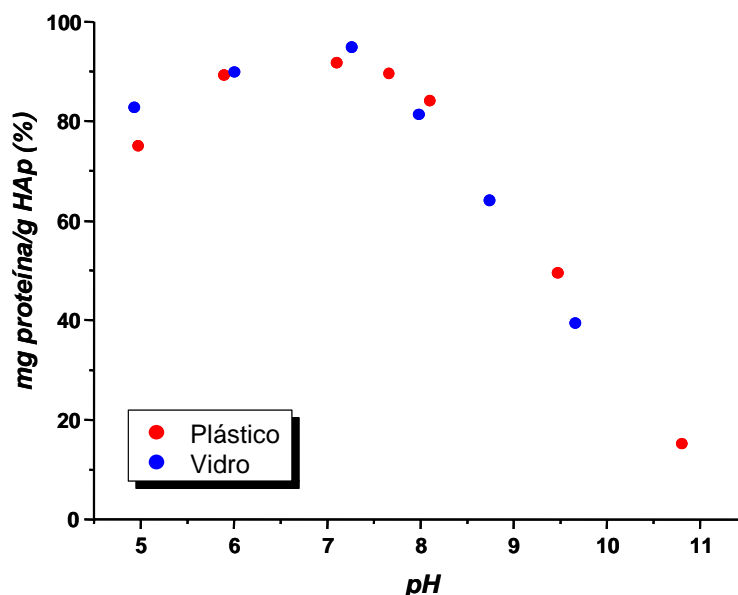


Figura 6.7 – Avaliação da interação do material que compõe o frasco de adsorção da hialuronidase, concentração inicial = 0,2 g/L, V= 15 mL e T = 25°C, Tempo = 1h.

Os resultados da adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita tanto em recipientes de vidro como em recipientes de poliestireno mostram-se idênticos para uma ampla faixa de pH. Nestas condições não podemos afirmar, com estes resultados, que a hialuronidase não interage com o vidro. Porém podemos concluir que se a hialuronidase interage com o vidro, esta interação também ocorre com o poliestireno.

6.3.3 Isotermas de Adsorção

Para a construção das isotermas foram utilizadas as proteínas BSA, lisozima e hialuronidase separadamente. Os testes foram realizados nos valores de pH 4,9 para a BSA e 7,2 para a hialuronidase, que correspondem aos valores de pH ótimos de adsorção de cada proteína. Os pontos experimentais foram ajustados ao modelo de Langmuir (Equação 5), e os parâmetros foram obtidos utilizando-se o programa STATISTICA, empregando o método de mínimos quadrados, com 95% de confiança. Os resultados estão apresentados na Figura 6.8.

$$q = \frac{q_{\max} kc}{1 + kc} \quad (5)$$

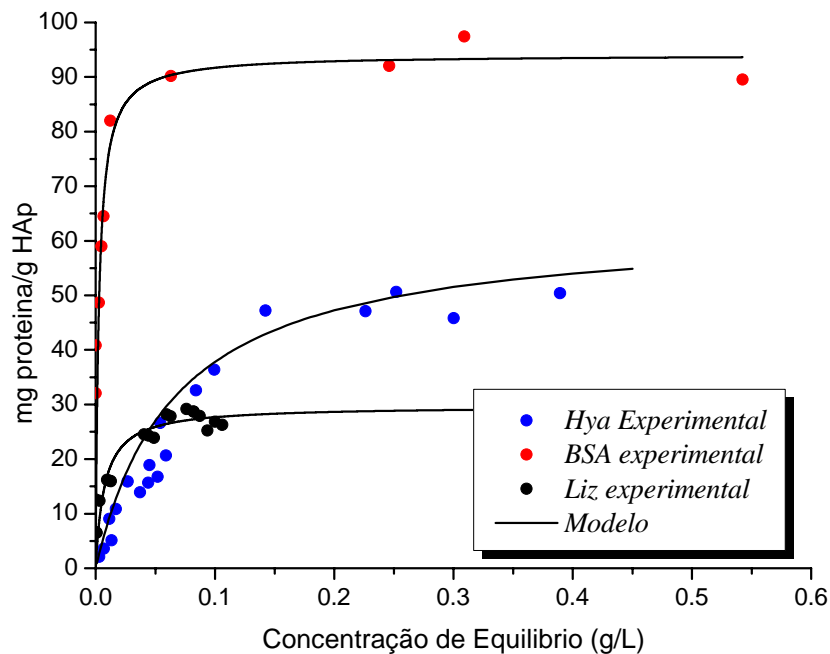


Figura 6.8 – Isoterma de adsorção da hialuronidase, BSA e lisozima em HAp, dados experimentais (pontos) e ajuste ao modelo de Langmuir (linha), T = 25 °C.

Observa-se que os pontos experimentais ajustam-se muito bem ao modelo de Langmuir. Com isso pode-se calcular a quantidade máxima de proteína adsorvida por grama de hidroxiapatita, que para as três proteínas foi $q_{\max} = 50$ mg Hya/ g HAp, 94 mg BSA/ g HAp e 29,5 mg Liz/ g HAp, e a constante de afinidade foi, respectivamente, $k = 9,5$ L/g, 382,7 L/g e 136,7 L/g para hialuronidase, BSA e lisozima, respectivamente. Com base na Figura 6.8 e nos valores de quantidade máxima adsorvida e da constante de afinidade pode-se afirmar que a hialuronidase apresenta baixa afinidade pela hidroxiapatita, apesar de adsorver uma quantidade maior do que a lisozima.

6.3.4 Adsorção da Mistura Binária

Sabe-se que a BSA está presente no extrato do testículo, e que durante o processo de extração são retirados vários tipos de proteínas. Com base nestes resultados não se pode afirmar que a BSA será adsorvida preferencialmente em relação à hialuronidase. Contudo, pode-se imaginar que durante o processo de adsorção isso venha a ocorrer. Neste sentido foram realizados testes de adsorção de uma mistura binária formada pelas proteínas BSA e hialuronidase.

Os testes de adsorção da mistura binária foram realizados utilizando 50% de hialuronidase e 50% de BSA em base mássica com concentração inicial de proteína total de 0,1 g/L e massa de adsorvente de 0,075 g, variando-se o pH de cinco a onze conforme mostra a Figura 6.9.

A adsorção da mistura binária das proteínas BSA e hialuronidase apresenta uma maior quantidade adsorvida entre os valores de pH 6,0 e 7,0. Este valor é coerente com os resultados de adsorção das proteínas em separado, uma vez que a BSA tem um ótimo de adsorção em pH = 4,9, sabe-se também que a BSA adsorve em grandes quantidades em valores de pH abaixo de 7,0 (GONÇALVES, 2002). Como mostra a Figura 6.5 a hialuronidase apresenta comportamento semelhante ao encontrado para a BSA, sendo que o ótimo de adsorção é em pH = 7,2.

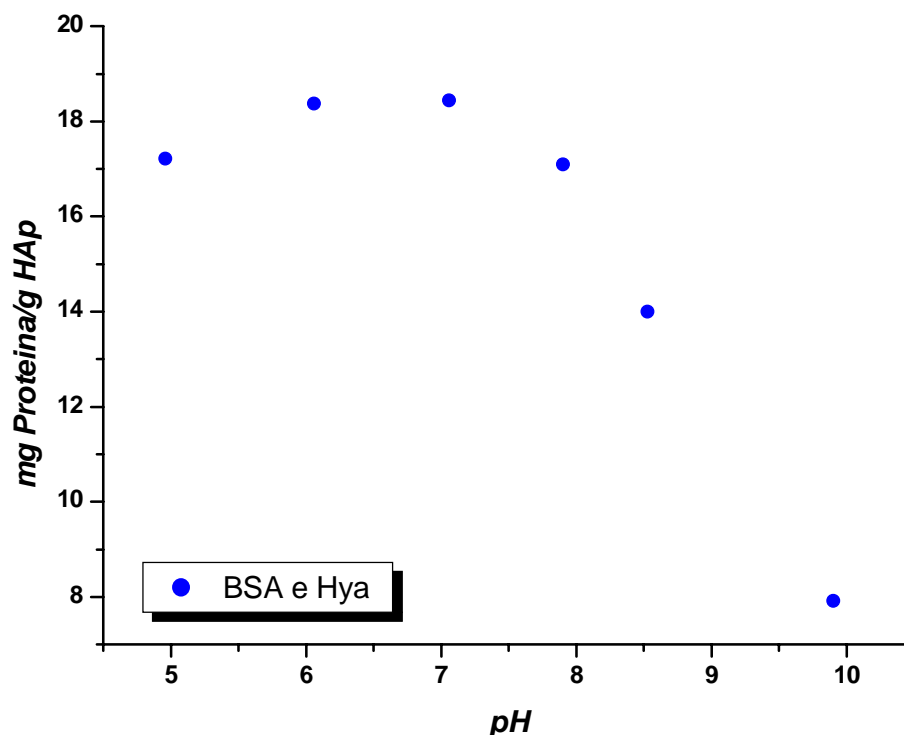


Figura 6.9 – Avaliação da adsorção da mistura binária de Hya e BSA em HAp, $C_0 = 0,1 \text{ g/L}$, $V_0 = 15 \text{ mL}$, massa de HAp = $0,075 \text{ g}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, Tempo = 1h.

Este resultado demonstra que nestas condições não há adsorção preferencial de nenhuma das proteínas. Isto é comprovado pela concentração de proteínas no equilíbrio, a qual nos valores de pH seis e sete é praticamente zero, indicando que toda a proteína inicial foi adsorvida. Com isto, pode-se afirmar que nestas condições ambas as proteínas foram adsorvidas. É importante salientar que para os testes de adsorção da mistura binária, os experimentos foram conduzidos de forma a favorecer a adsorção de toda proteína do meio, tendo uma razão massa do adsorvente por massa de proteína de 20, assim observa-se somente a influência do pH.

Os resultados da Figura 6.9 são coerentes com os resultados da influência do pH na adsorção para as duas proteínas em separado, uma vez que para ambas as proteínas o máximo de adsorção ocorre em pH 4,9 para BSA e em pH 7,2 para a hialuronidase. É importante observar que a capacidade de adsorção da HAp para as duas proteínas é superior a 18 mg / g HAp , como observado nas isotermas de adsorção das duas proteínas (Figura 6.8), porém é importante lembrar que nos testes de adsorção da mistura binária, foi priorizada a adsorção de toda proteína do meio, havendo um excesso de adsorvente.

6.3.5 Dessorção da Mistura Binária

6.3.5.1 – Teor Total de Proteína

Nos resultados de adsorção da mistura binária não foi possível concluir se há uma competição entre as duas proteínas pelos sítios cálcio da hidroxiapatita. Assim, os testes de dessorção foram realizados utilizando dois agentes eluentes não indiferentes, que foram o tampão fosfato de potássio em diferentes concentrações e soluções de cloreto de cálcio também em diferentes concentrações. Os resultados podem ser visualizados na Figura 6.10 e 6.11, nos quais a quantidade de proteína adsorvida está representada pela primeira barra, o que corresponde a etapa de adsorção, que ocorreu em pH 7,0. Após esta etapa foi realizada uma etapa de lavagem com água em pH 7,0 para remover as proteínas que não foram adsorvidas ou que adsorveram fracamente. Após a etapa de lavagem, as amostras foram colocadas em contato com o agente eluente em ordem crescente de concentração molar. A Figura 6.10 mostra a remoção com tampão fosfato em concentrações crescentes de 0,0001 a 0,01 molar. A Figura 6.11 mostra a remoção com soluções de cloreto de cálcio em concentrações crescentes de 0,0001 a 0,01 molar.

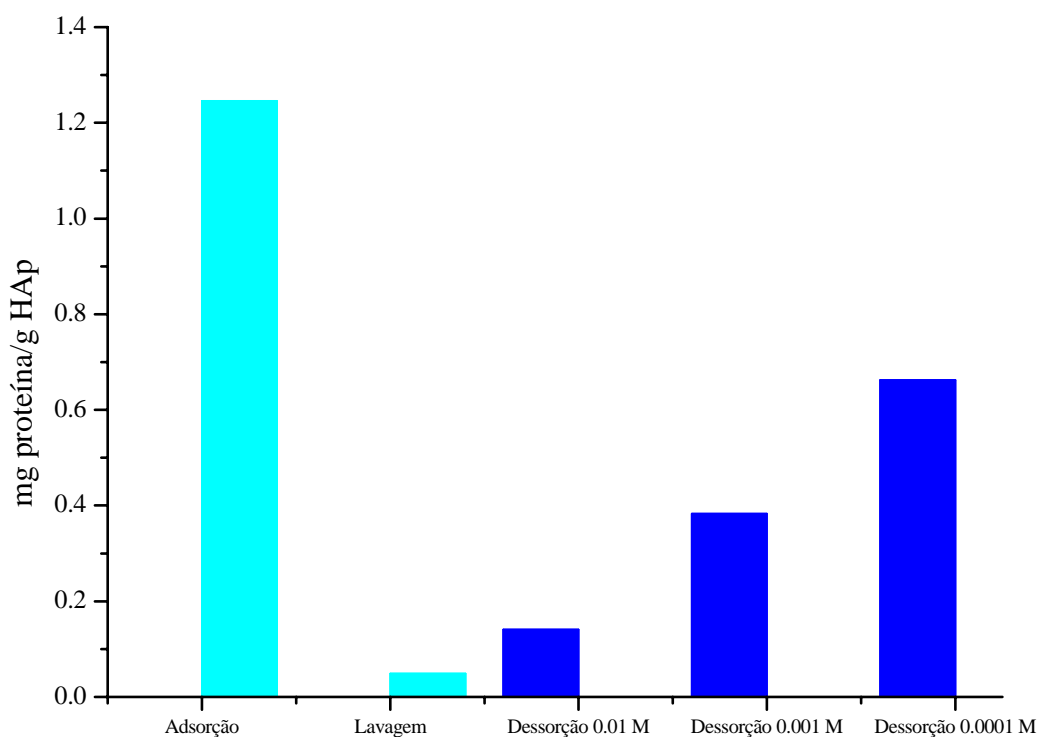


Figura 6.10 – Adsorção da BSA e da hialuronidase em HAp em pH 7,0 a 25°C e dessorção dessas proteínas em tampão fosfato de potássio.

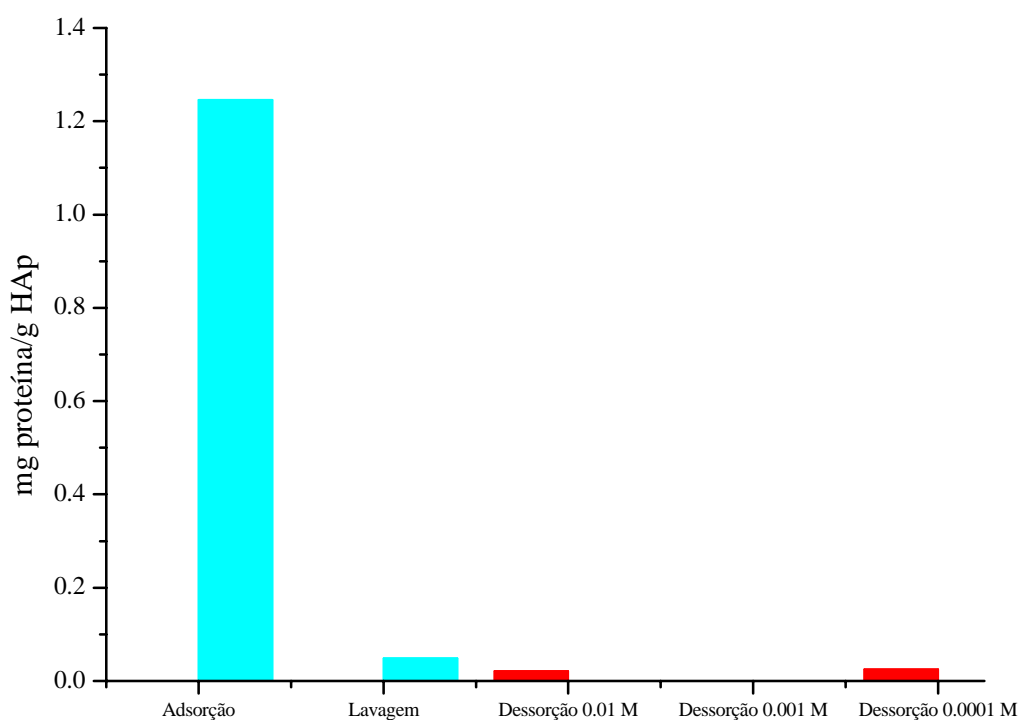


Figura 6.11 – Adsorção da BSA e da hialuronidase em HAp em pH 7,0 a 25°C e dessorção dessas proteínas com soluções de cloreto de cálcio.

Os resultados apresentados nas Figuras 6.10 e 6.11 indicam que as proteínas em solução foram adsorvidas e que na etapa de lavagem uma pequena quantidade foi removida (3,9%). O emprego do tampão fosfato foi eficiente na dessorção das proteínas e a soma das quantidades de proteínas removida com o emprego das diferentes soluções de tampão fosfato foi cerca de 95% das proteínas adsorvidas. Observa-se ainda que quanto maior a concentração do tampão fosfato maior a quantidade de proteína removida.

Por outro lado, observa-se que as soluções de cloreto de cálcio (Figura 6.11) não conseguiram remover praticamente nenhuma das proteínas (cerca de 3,7%). Pode-se concluir que ambas as proteínas estão adsorvidas nos sítios cálcio da hidroxiapatita. A competição entre a BSA e a hialuronidase pelos sítios cálcio não foi observada nos ensaios de adsorção por que foi utilizado adsorvente em excesso.

6.3.5.2 – Curva Padrão de Calibração da Atividade da Hialuronidase pelo Método de Turbidez

Em todos os testes de adsorção e dessorção anteriores, a quantidade de proteína foi analisada pelo método de Bradford. Este método analisa proteína total em solução, desta maneira, para a análise em separado da hialuronidase é necessário o emprego de um método específico para esta proteína. Neste sentido foram realizados ensaios de atividade enzimática da hialuronidase, utilizando o ácido hialurônico como substrato. Para isto curvas de calibração conforme apresentadas na Figura 6.12 foram construídas para avaliar a relação entre a concentração de hialuronidase e a quantidade de ácido hialurônico consumido. Foram realizados testes seguindo o método típico descrito por TOLKSDORF *et al.* (1949) e KASS e SEASTONE (1944). Este método utiliza 0,2 mg de ácido hialurônico para cada amostra, no intuito de minimizar o consumo dos reagentes também foram realizados ensaios utilizando metade das quantidades dos reagentes conforme mostrado na Figura 6.12 (0,1 mg de ácido hialurônico).

A Figura 6.12 apresenta curvas de calibração típicas, cujos pontos experimentais foram ajustados a uma equação linear. Observa-se que os pontos se ajustaram a uma reta, apresentado um coeficiente de correlação de 0,99. Tanto para os testes utilizando as quantidades padrões de reagentes, como para os testes em que se utilizou apenas a metade das quantidades de todos os reagentes (mantém-se a relação das concentrações), não houve perda de sensibilidade.

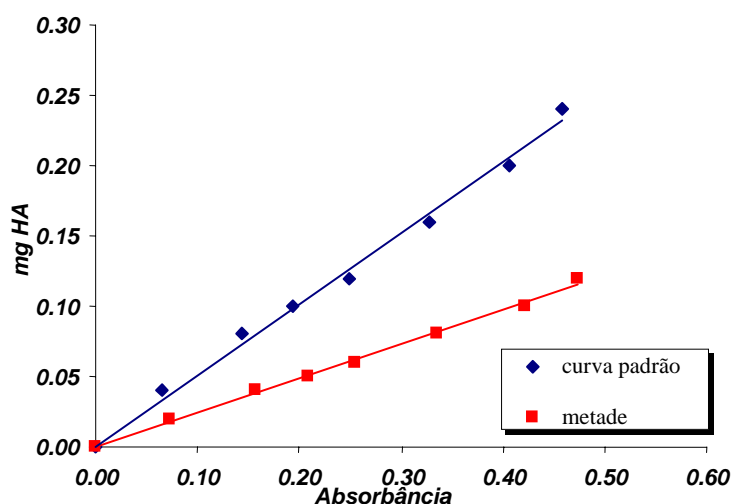


Figura 6.12 – Curva de calibração da atividade da hialuronidase, utilizando o método de turbidez.

Observou-se ainda que mantendo-se a relação entre os reagentes, do método de atividade enzimática, foi possível a correlação da concentração da hialuronidase em solução com a quantidade de ácido hialurônico consumido. Assim os testes de atividade enzimática da hialuronidase foram realizados com apenas metade das quantidades dos reagentes.

6.3.5.3 – Atividade da Hialuronidase pelo Método de Turbidez nas Etapas de Dessorção da Mistura Binária

De acordo com a Figura 6.10 pode-se concluir que a hialuronidase adsorvida em hidroxiapatita foi removida com emprego do tampão fosfato, porém não se pode afirmar que a proteína removida permanece ativa após os processos de adsorção e dessorção. Para avaliar a quantidade e a atividade da hialuronidase após a dessorção foram realizados testes de atividade enzimática da hialuronidase e os resultados estão apresentados na Figura 6.13.

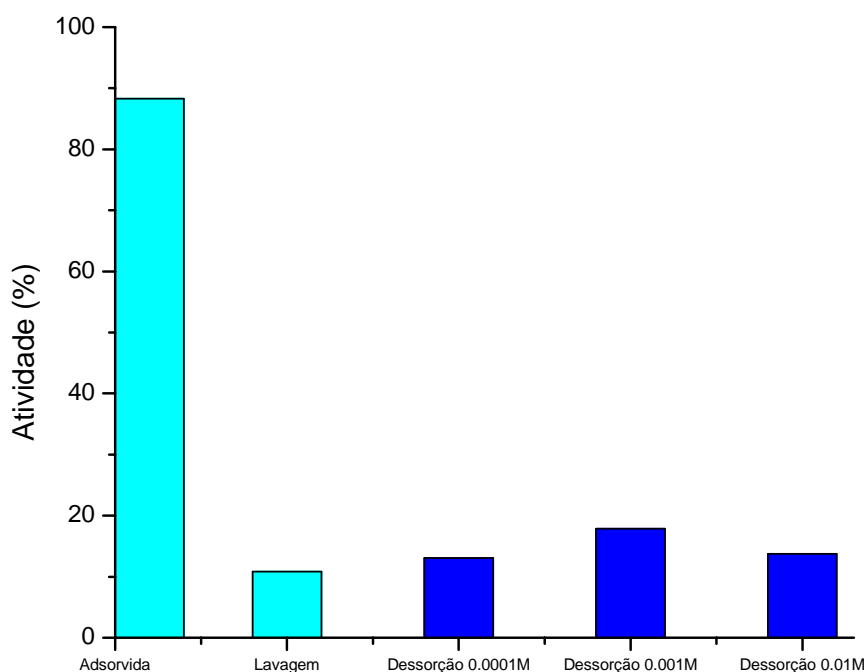


Figura 6.13 – Dessorção com tampão fosfato da hialuronidase em HAp adsorvida na mistura binária e atividade enzimática da proteína medida pelo método de turbidez

Os resultados da Figura 6.13 mostram que a hialuronidase permanece ativa mesmo após as etapas de adsorção, lavagem e dessorção com tampão fosfato. Também pode-se observar que nem toda a hialuronidase foi adsorvida (apenas 88%). Da parcela

de hialuronidase adsorvida, 78% foi recuperada, com isso, pode-se concluir que a competição entre a hialuronidase e a BSA pelos sítios de adsorção da hidroxiapatita não favorece a adsorção da hialuronidase.

A afinidade da hialuronidase pela hidroxiapatita embora baixa quando comparada com a da BSA e da lisozima apresenta-se em uma ampla faixa de pH (5,0 a 8,0). É importante salientar que a diferença de afinidade entre as proteínas de um extrato e o adsorvente é benéfica no processo de separação. Os resultados apresentados neste capítulo mostram que a hidroxiapatita é um adsorvente apropriado para a separação da hialuronidase.

6.4 Extração da Hialuronidase do Testículo Bovino

Os testículos (Figura 6.14 a) foram primeiramente limpos. Nesta etapa foi retirado o epidídimo. Após a limpeza, o material foi cortado e pesado (Figura 6.14 b e c), obtendo-se 1620g de massa de testículo. Para o preparo dos extratos foram triturados dez gramas de massa de testículo em 100 mL de solução extratora. Foram empregadas três diferentes soluções, tampão tris – HCl 0,2 M e pH 8,5 a 4°C, solução de sacarose 0,25 molar e pH 6,2 a 4°C e água em valores de pH 5,5 e 9,0 a 4°C, obtendo-se 32 g/L, 25,7 g/L e 21,8 g/L de proteínas para cada extrato, respectivamente.



Figura 6.14 – Fotos dos testículos bovinos com o epidídimo (a) e do testículo sem o epidídimo (b e c).

Utilizando o método de turbidez foi analisada a atividade da hialuronidase em cada extrato. Os resultados estão apresentados em forma de tabela. Apesar de terem sido realizados ensaios com a água em pH 5,5, estes resultados não serão apresentados por serem semelhantes ao obtidos para o extrato com água em pH 9,0 (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Atividade da hialuronidase nos extratos obtidos.

Extrato	Atividade específica (U/g de testículo)	Atividade específica (U/g de proteína)
Tris –HCl pH 8,5	37,5	151,5
Solução de sacarose pH 6,2	26,2	147,0
Água pH 9,0	23,0	105,4

Os resultados obtidos mostram que todos os extratos brutos contêm a hialuronidase e os valores de atividade foram comparados com o valor da atividade da hialuronidase comercial (608 U / mg de sólido). Porém testes realizados pelo método de turbidez no laboratório de bioprocessos demonstraram que a proteína comercial apresentava 265 U / mg de sólido. Contudo pode-se observar que este valor é muito superior ao encontrado no extrato bruto (cerca de 1800 vezes).

6.5 Adsorção e Dessorção dos Extratos Contendo a Hialuronidase

A adsorção foi realizada com os extratos obtidos com o tampão Tris –HCl e a água em pH 9,0. Para os ensaios foram utilizados 0,075 g de hidroxiapatita e 30 mL dos extratos diluídos 100 vezes. Os resultados estão apresentados em forma de gráfico na Figura 6.15.

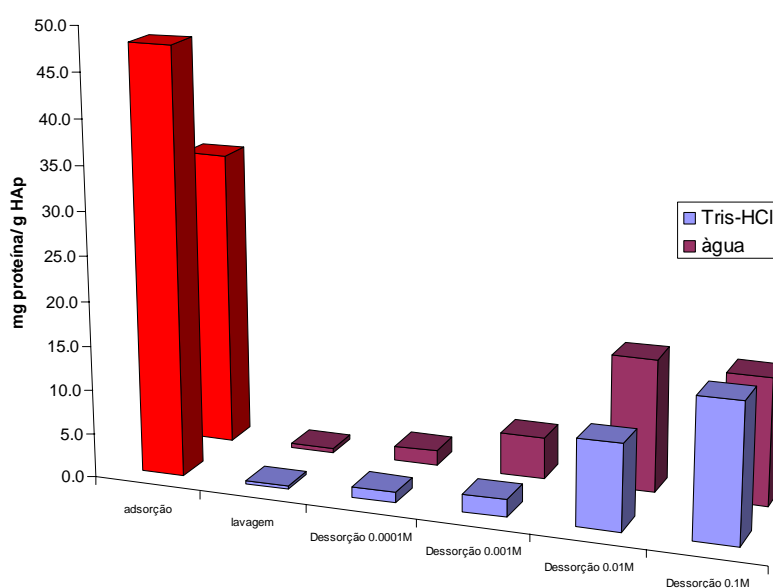


Figura 6.15 – Adsorção de proteínas do testículo bovino obtidos com tampão Tris – HCl e água em hidroxiapatita e dessorção dessas proteínas com tampão fosfato em concentração molar crescente.

A Figura 6.15 mostra que cerca de 50 mg de proteínas / g de hidroxiapatita foram adsorvidas e que a dessorção com o tampão fosfato apresenta o mesmo comportamento obtido para a dessorção da mistura binária (Figura 6.10), ou seja, a remoção aumenta à medida que a concentração molar do tampão fosfato aumenta. Por outro lado, na etapa de lavagem a remoção de proteínas é praticamente nula, diferente da encontrada nos experimentos com a mistura binária. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que no extrato existe uma variedade de proteínas. Desta forma, pode-se imaginar que as proteínas que estão adsorvidas na hidroxiapatita possuem grande afinidade pelo adsorvente, não se desprendendo facilmente.

Pela análise de proteína total realizada, utilizando-se o método de Bradford, foram recuperadas cerca de 53% e 82 % das proteínas adsorvidas para os extratos feitos com tampão tris -HCl e água, respectivamente. Este resultado mostra que a extração com água facilita a remoção das proteínas adsorvidas em hidroxiapatita.

Para analisar a quantidade de hialuronidase foram realizados ensaios de atividade enzimática nas frações provenientes da etapa de lavagem e da eluição com tampão fosfato. Os resultados podem ser visualizados na Figura 6.16.

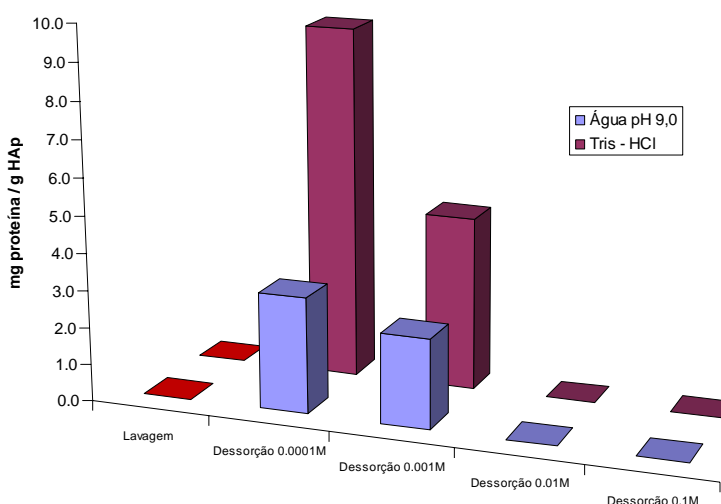


Figura 6.16 – Atividade da hialuronidase pelo método de turbidez. Amostras na etapa de lavagem com água em pH 7,2 (igual ao pH de adsorção). Eluição com tampão fosfato para as proteínas extraídas com tampão Tris – HCl e água em pH 9,0.

De acordo com a Figura 6.16 observa-se que na etapa lavagem, como era de se esperar, a amostra não apresentou atividade enzimática, uma vez que pelo método de Bradford não foi possível identificar a presença de proteínas. Ainda analisando a Figura 6.16, observa-se que em baixas concentrações molares (0,0001 M e 0,001 M) do tampão fosfato foi possível uma recuperação razoável da hialuronidase, porém este resultado é diferente do obtido para a dessorção da mistura binária, para a qual a remoção da hialuronidase aumentava com o aumento da concentração molar do agente eluente (Figura 6.13).

Contudo os resultados de dessorção com o tampão fosfato foram bastante promissores, uma vez que ocorreu uma maior concentração da hialuronidase por proteína total em soluções, em relação ao extrato bruto, obtendo-se desta forma que o tampão fosfato 0,0001M e 0,001M 9458 U / g proteína e 4652 U / g, respectivamente. Estes resultados de atividade obtidos para a remoção com o tampão fosfato nas concentrações de 0,0001 M e 0,001 M são cerca de 62 e 30 vezes maiores que os encontrados no extrato bruto, respectivamente. Estes resultados mostram que apesar da quantidade de hialuronidase adsorvida em hidroxiapatita ser pouca quando comparada com a quantidade presente no extrato, observa-se que a pouca quantidade adsorvida pode ser recuperada com uma concentração muito elevada, mostrando assim que a hidroxiapatita pode ser utilizada na separação da hialuronidase por adsorção em uma etapa posterior do processo de separação.

As diferenças encontradas nos ensaios de adsorção e dessorção entre a mistura binária e o extrato bruto podem ser explicadas devido às condições que foram realizados ambos os ensaios. Estas condições foram diferentes, uma vez que na mistura havia somente duas proteínas, enquanto que no extrato existia uma grande variedade de proteínas. Outra diferença está na relação da concentração de proteínas em solução por massa de adsorvente, pois na mistura binária era bem menor que a trabalhada para o extrato bruto.

Foram realizados ensaios de adsorção com o extrato bruto sem ser diluído, visando observar o máximo de proteína adsorvida pela hidroxiapatita. Os resultados estão aprestados em forma de gráfico na Figura 6.17.

Estes resultados indicam que a capacidade de adsorção de proteínas em hidroxiapatita é muito grande. Apesar da existência de diferentes proteínas com concentração elevada no meio, a hidroxiapatita apresentou a capacidade de adsorver cerca de 300 mg de proteína por grama de hidroxiapatita.

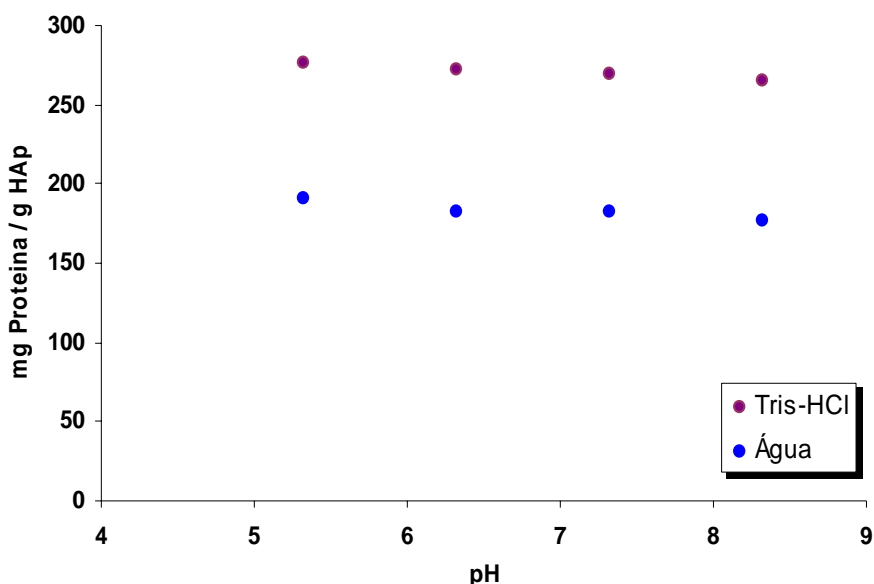


Figura 6.17 – Adsorção do extrato do testículo bovino em hidroxiapatita, variando-se o pH de 5 a 8,3, $C_0 = 25$ g /L a 25°C.

Também foram realizados testes de dessorção do extrato do testículo bovino, adsorvido em hidroxiapatita no qual a adsorção foi realizada com o extrato sem diluição. Utilizou-se a água como agente extrator, em diferentes valores de pH. Contudo, esta metodologia não mostrou-se apropriada para a remoção de proteína. Este resultado comprova que realmente as proteínas presentes no extrato adsorvem fortemente na hidroxiapatita.

6.6 Novos Testes de Adsorção do Extrato do Testículo Bovino em Hidroxiapatita

A extração foi realizada novamente conforme o procedimento experimental mostrado na seção 6.3 deste capítulo. Novos testes de proteína total e de atividade

enzimática da hialuronidase foram realizados. Os resultados foram semelhantes aos obtidos anteriormente (seção 6.3). A Figura 6.18 mostra um fluxograma simplificado das etapas empregadas para o processo de extração e separação da hialuronidase.

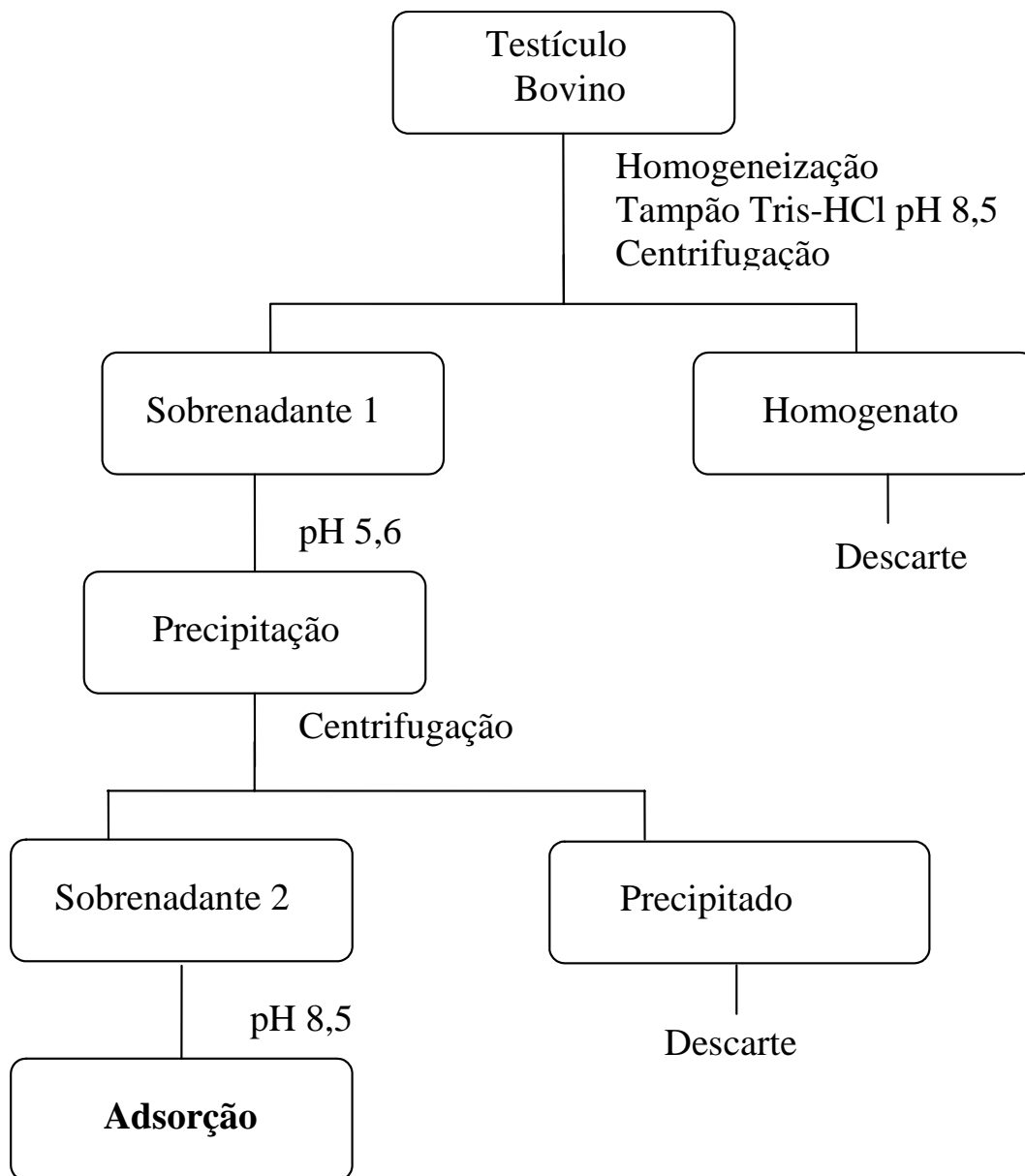


Figura 6.18. Fluxograma dos processos de extração e separação da hialuronidase.

O pH do sobrenadante 1 (pH inicial igual a 8,5) foi ajustado com uma solução de HCl 1M para os valores de 7,5, 6,5 e 5,6. Nesta etapa, é importante registrar que durante o ajuste do sobrenadante 1 para o pH 5,6 foi observado a formação de um precipitado. Esta solução foi então centrifugada por 5 minutos com rotação de 5.000 rpm. As

solução sobrenadante 1 em valores de pH 8,5, 7,5, 6,5 e a solução sobrenadante 2 em pH 5,6 foram então colocadas em contato com a hidroxiapatita por 2 horas sobre agitação constante de 150rpm. Os resultados desta etapa de adsorção estão mostrados na Figura 6.19.

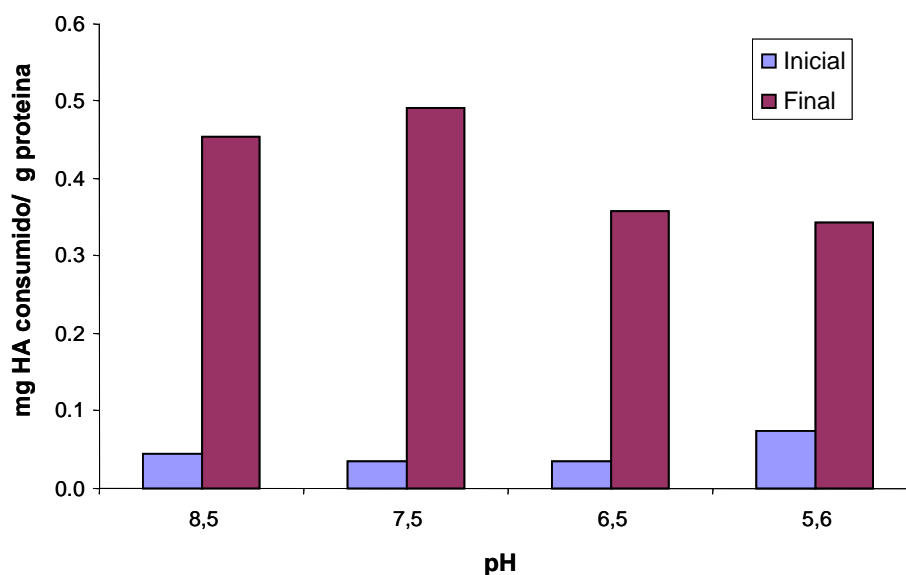


Figura 6.19 Gráfico do consumo de ácido hialurônico por proteína total, para o sobrenadante do extrato do testículo bovino em diferentes valores de pH. Onde Inicial corresponde ao sobrenadante antes da adsorção e final após a adsorção.

De acordo com a Figura 6.19 pode-se afirmar que a precipitação ocorrida no sobrenadante 1 em pH 5,6 propicia um pequeno aumento da quantidade de hialuronidase em relação à proteína total, demonstrado pelo aumento do consumo de ácido hialurônico antes mesmo de ocorrer a adsorção. Para a quantificação do consumo de ácido hialurônico após a adsorção, foi realizada centrifugação para separação da hidroxiapatita com as proteínas adsorvidas. A quantificação do consumo de ácido hialurônico foi realizada com o sobrenadante 2 desta centrifugação. É importante lembrar que, quanto maior o consumo do ácido hialurônico, maior a quantidade de hialuronidase no meio. A Figura 6.19 também mostra que a adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita é maior para os valores de pH 5,6 e 6,5, valores de pH onde há um menor consumo de ácido hialurônico. Este resultado já era esperado, uma vez que a

Figura 6.5 deste capítulo mostra a adsorção da hialuronidase comercial em diferentes valores de pH. Uma análise na Figura 6.5 revela que para esta faixa de pH a adsorção é praticamente igual, com exceção do pH 8,5 que já era menor.

Os resultados de adsorção da proteína comercial mostram que a hialuronidase não apresenta uma forte interação com a hidroxiapatita, observado pelo valor da constante de afinidade que foi de 9,5 (ver Figura 6.8). Além disso, com base nos resultados obtidos do estudo de filmes monomoleculares da hialuronidase, que serão apresentados posteriormente neste capítulo (seção 6.6), a hialuronidase é uma molécula que possui atração pela interface ar / água. Também foi observado pelos resultados de adsorção preliminares que a maior fração da hialuronidase (93%) presente no extrato não adsorvia na hidroxiapatita.

Em função disso, uma nova estratégia de purificação foi adotada, consistindo em purificar a hialuronidase bovina utilizando a hidroxiapatita, priorizando a não-adsorção desta proteína neste adsorvente. Com isto, novos testes de adsorção foram realizados, sendo que desta vez partiu-se do sobrenadante 2, que foi ajustado a um pH igual a 5,6, pois neste pH a hialuronidase apresentava uma atividade específica maior.

Porém, para a realização da adsorção, o pH do sobrenadante 2 que era de 5,6 foi reajustado para o valor 8,5 (pH onde há uma baixa adsorção da proteína), e por fim realizou-se a adsorção sem agitação, de forma a induzir a migração da hialuronidase para interface, ao invés de priorizar a adsorção da enzima na hidroxiapatita. Os resultados foram acompanhados pela dosagem de proteína e pelo consumo de ácido hialurônico nas amostras antes e depois da adsorção, e confirmados pela eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida. As Figuras 6.20 e a Tabela 6.4 mostram um gel obtido com as amostras deste processo e uma tabela comparando os resultados do consumo de ácido hialurônico.

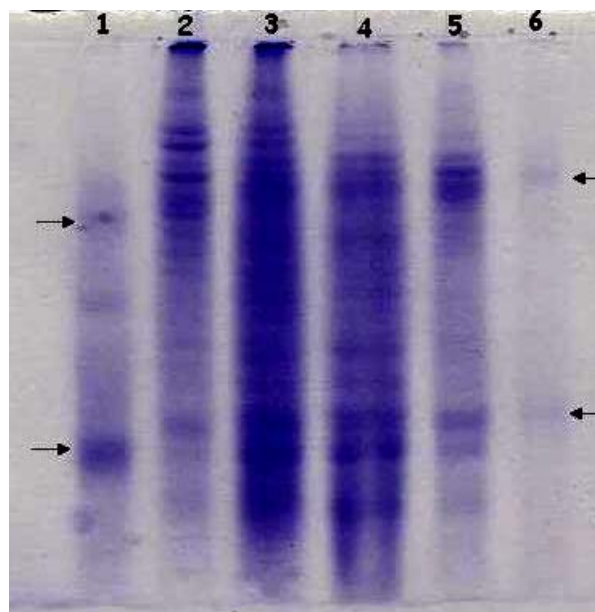


Figura 6.20. Eletroforese: hialuronidase comercial (1), sobrenadante 1 em pH 8,5 (2), sobrenadante 1 em pH 5,6 (3), sobrenadante 2 em pH 5,6 (4), sobrenadante 2 em pH 5,6 diluído 5 vezes (5) e sobrenadante 4 (6).

Tabela 6.4 - Atividade da hialuronidase após as etapas de purificação.

Etapa	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação
Tecido homogeneizado	132	1
Precipitação	222	1,6
Adsorção contaminantes	20,580	156

Com base nos resultados do gel, observa-se que a hialuronidase comercial apresenta duas bandas, uma mais abaixo (em torno de 29 kDa) que corresponde a hialuronidase, pois durante a desnaturação a hialuronidase se divide em duas subunidades idênticas, e a outra que corresponde provavelmente a um contaminante. A nova estratégia adotada resulta numa separação mais eficiente da hialuronidase bovina. Os resultados de atividade da hialuronidase em cada etapa de purificação mostrados na Tabela 6.4 confirmam que há um aumento significativo na concentração da hialuronidase após cada passo de purificação. Comparando-se o valor da atividade da hialuronidase após a adsorção dos contaminantes ao valor da hialuronidase comercial (Sigma), observa-se que as etapas de purificação empregadas produzem um purificado somente dez vezes menor que o preparo comercial.

6.7 Caracterização da Hialuronidase

6.7.1 - Localização da Hialuronidase no Testículo Bovino

A hialuronidase presente no esperma bovino pode ser classificada como proteína membranar, apresentando um grupamento GPI ligado a sua estrutura ou solúvel (MARTIN-DELEON, 2006). Os estudos foram realizados para avaliar se a hialuronidase presente no testículo bovino apresentava-se como uma proteína membranar. Os ensaios foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa, um homogenato foi utilizado para facilitar a solubilização das proteínas solúveis. Em seguida, realizou-se uma separação clássica por centrifugação a 150.000 g, obtendo-se as proteínas solúveis no sobrenadante e as proteínas membranares no precipitado. Os testes de eficiência da preparação membranar foram realizados utilizando-se como marcador a fosfatase alcalina (enzima membranar, já conhecida por sua ligação ao grupamento GPI), que eram dosadas em paralelo com a hialuronidase.

Cerca de 50% da atividade da hialuronidase e 80% da atividade da fosfatase alcalina estava associada à membrana. A atividade específica das duas enzimas aumenta significativamente em relação à proteína membranar total, comparada com o homogenato, como mostra a Tabela 6.5. Para eliminação completa das proteínas solúveis, foram realizadas três lavagens sucessivas do precipitado (lócus das proteínas membranares) com tampão fosfato. Os resultados mostraram que após estas lavagens, a hialuronidase apresentava uma atividade específica menor. Isto demonstra que a hialuronidase do testículo bovino não apresenta modificações lipídicas (MEYER *et al.*, 1997), o que significa que a hialuronidase não está ancorada a membrana. Entretanto, a associação da hialuronidase com a membrana pode ser atribuída as suas propriedades anfifílicas.

Tabela 6.5 – Quantificação da Atividade da Hialuronidase e da Fosfatase Alcalina em Diferentes Frações.

	Fosfatase Alcalina		Hialuronidase	
	Atividade (U/mg proteína)	Fator de Purificação	Atividade (U/mg proteína)	Fator de Purificação
Homogenato	0,0108	1	91	1
Sobrenadante	0,0047	0,4	94	1,02
Precipitado	0,0218	2	125	1,37
Precipitado após Lavagens	0,0547	2,5	12,2	1,85

A hialuronidase do testículo bovino e do esperma tem seqüências de aminoácidos iguais, mas diferem em suas modificações pós tradução (MEYER *et al.*, 1997). De fato, a hialuronidase do esperma está ligada a um grupamento GPI, enquanto que a hialuronidase testicular não apresenta este grupamento. Os resultados apresentados na Tabela 6.5 mostram que o precipitado obtido pelo método clássico de centrifugação a 150.000g do homogenato do testículo bovino, contém hialuronidase e, que após três lavagens sucessivas com tampão, a hialuronidase é liberada. Esta associação inesperada pode ser explicada se a hialuronidase do testículo bovino possuir propriedades anfifílicas. No sentido de testar esta hipótese (presença de áreas hidrofóbicas na superfície da molécula de hialuronidase do testículo bovino), foi realizada a modelagem da estrutura da hialuronidase por homologia, utilizando como modelo a estrutura cristalina da hialuronidase do veneno de abelha, por apresentar 36% de homologia com a hialuronidase testicular (PH-20) (CHERR *et al.*, 1996).

6.7.2 - Modelagem da Estrutura da Hialuronidase do Testículo Bovino

Utilizou-se a modelagem estrutural de proteínas, para avaliar a presença de regiões superficiais hidrofóbicas na molécula da hialuronidase de testículo bovino. O modelo tridimensional da hialuronidase de testículo bovino foi construído com base no estrutura cristalina, já conhecida, da hialuronidase de veneno de abelha (MARKOVIC-HOUSLEY *et al.*, 2000). O alinhamento da seqüência de aminoácidos utilizado está apresentado na Figura 6.21, mostrando a região N-terminal (correspondente a 12

aminoácidos) e a região C-terminal (correspondente a 100 aminoácidos). É preciso enfatizar que pelo fato da proteína utilizada como modelo apresentar um número de aminoácidos menor (apenas 350 aminoácidos) do que a proteína de interesse (hialuronidase de testículo bovino), a modelagem nas regiões N- e C-terminal não foi realizada com êxito.

```

HYA_BOVINE  LDFRAPPLISNTSFLWAWNAPVERCVNRRFQLPPDLRLFSVKGSPQKSAT 50
HYA_BEE     ---TPDNMKTVREFNVYUNVPTFMCHKYGLRFEEVSEKYGILQNWMDKFR 47

HYA_BOVINE  GQFITLFYADRLGYYPHIDEKTGKTVFG---GIPQLGNLKSHLEKAKNDI 97
HYA_BEE     GEEIAILYDP--GMFPALLKDPNGNVVARNGGVPQLGNLTKHLQVFRDHL 95

HYA_BOVINE  AYYIPNDSVG-LAVI...NWRPTWARNWPKDVYRDESVELVLQKNPQLS 146
HYA_BEE     INQIPDKSFPGVGV...FSWRPIFRONWASLQPYKKLSVEVVRREHPFWD 145

HYA_BOVINE  FPEASKIAKVDFFETAGKSFMQETLKLKLLRPNHLWGYLFPDCYNHMHN 196
HYA_BEE     DQRVEQEAQRREFEKYQQLFMEETLKAARKMRPAAANWGYAYPYCYNLTPN 195

HYA_BOVINE  QPTYNGNCPDVEKRRNDLEWLWKESTALFPSVYLNIRLKSTQNAALYVR 246
HYA_BEE     QP--SAQCEATTMQENDKMSULFESEDVLLPSVYLRWNLTSGERVGLVG- 242

HYA_BOVINE  NRVQEAIRLSKIASVESPLPVFVYARPVFTDGSSTYLSQGLVNSVGEIV 296
HYA_BEE     GRVKEALRIARQMTTSRKK-VLPYYWYKYQDRRD TDLSRADLEATLRKIT 291

HYA_BOVINE  SLGASGIIMWGSNLNLSLVQSCMNLGTYLNTTLNPHYIINVTLAAKMCSQV 346
HYA_BEE     DLGADGFIIWGSSDDINTRAKCLQFREYLNNELGPAVKRIALNNNANDRL 341

HYA_BOVINE  LCHDGGVCTRKHWNSSDYHLNPMNFAIQTGEGGKYTVPGTLTLEDLQKF 396
HYA_BEE     TVDVSVDQV----- 350

HYA_BOVINE  SDTFYCSCYSNLSCKKRVDIKNVHSVDVCM AEDVCIDAF LKPP 439
HYA_BEE     -----

```

Figura 6.21 – Alinhamento da seqüência de aminoácidos da hialuronidase de testículo bovino com a hialuronidase de veneno abelha.

Utilizando como base o alinhamento apresentado na Figura 6.21 e a estrutura da hialuronidase do veneno abelha, foram construídas estruturas em 3D da hialuronidase de testículo bovino, como mostra a Figura 6.22. Uma visão superior das duas moléculas de hialuronidase (Figura 6.22 A e B) mostra que na região de N- e C-terminal, a enzima testicular (Figura 6.22B) contém uma grande parte hidrofóbica quando comparada com a proteína do veneno de abelha (Figura 6.22A). Uma visão lateral das duas moléculas mostra que a região hidrofóbica em torno do N- e C-peptídeos terminal está quase oposta ao sítio catalítico das duas enzimas (Figura 6.22 C e D). Esta região hidrofóbica pode ser a responsável pela propriedade anfifílica da proteína, no entanto, é bom lembrar que este modelo não envolve todos os aminoácidos da proteína.

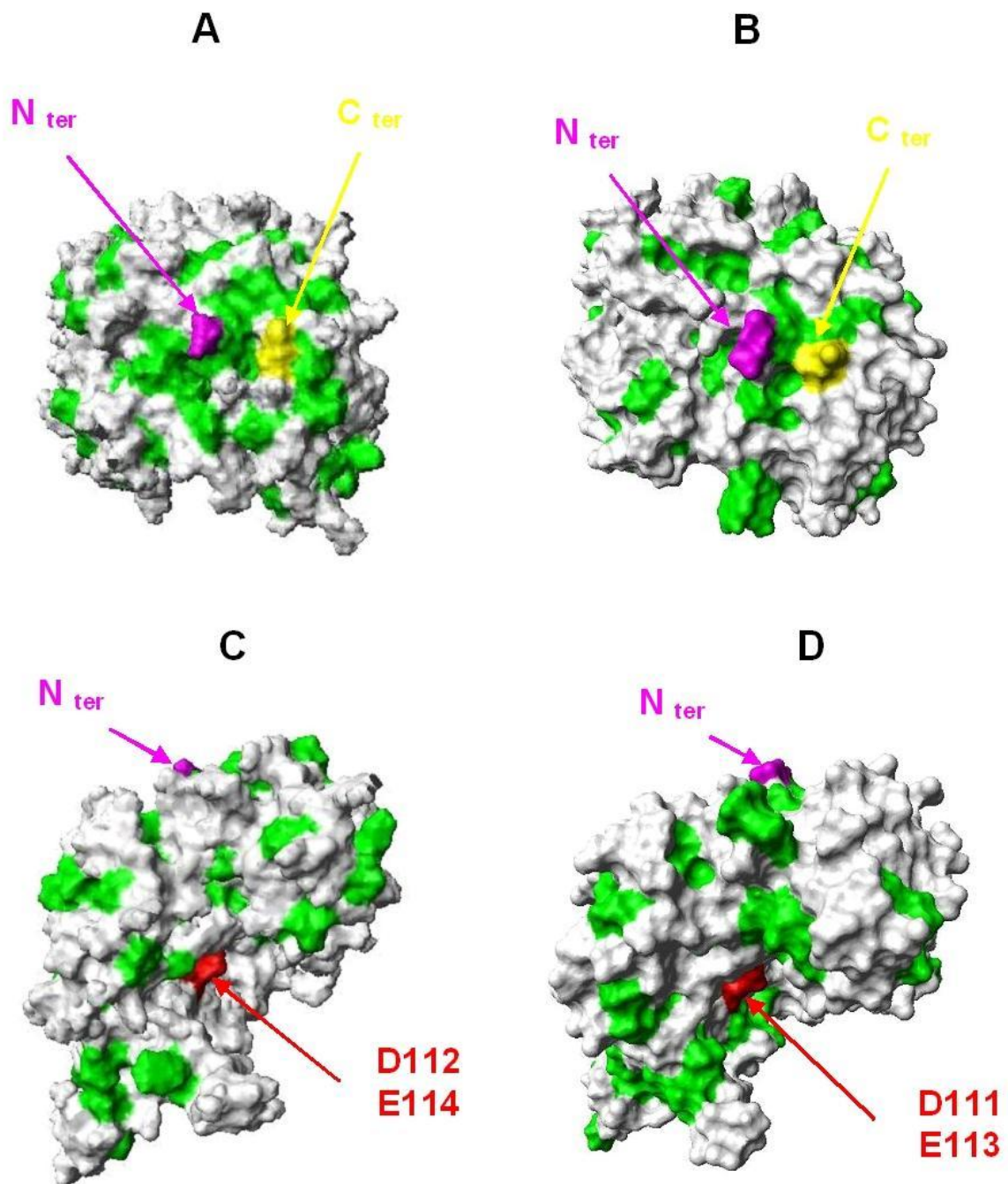


Figura 6.22 – Comparação da estrutura tridimensional da hialuronidase de testículo bovino com a hialuronidase do veneno de abelha. As cores verde e cinza correspondem às regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente e a região em vermelho o sítio ativo. Imagens A e C correspondem às visões superior e lateral da hialuronidase do veneno de abelha e as imagens B e D correspondem às visões superior e lateral da hialuronidase bovina.

Um dos fatores que contribui para a afinidade da proteína com a interface ar / água é a presença de áreas hidrofóbicas na superfície da proteína (Wierenga *et al.*,

2003). A técnica de monocamada foi então aplicada para a hialuronidase do testículo bovino, por ser um método importante para determinação da atividade de proteínas na superfície (GRAHAM e PHILLIPS, 1979). Uma vantagem importante na utilização deste método é que ele requer pequenas quantidades de proteína, da ordem de microgramas.

6.7.3 – Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) para Avaliação da Estrutura Secundária da Hialuronidase

A Figura 6.23 mostra o espectro da hialuronidase obtido em análises realizadas em pH 5,3 (p²H 5.5), e deconvoluído em distribuições lorentzianas. A região espectral de 1700-1610 cm⁻¹ correspondente à amida I é formada por combinações de bandas de frequências fundamentais dos grupos funcionais C=O, N-H e C-H. Já a região espectral na faixa de comprimento de onda de 1575-1480 cm⁻¹ corresponde à amida II. Esta faixa de comprimento de onda encerra principalmente as combinações de bandas de frequências fundamentais dos grupos funcionais N-H e CN. A banda de comprimento de onda de 1545 cm⁻¹ referente à amida II corresponde a troca incompleta de NH/N²H. Esta reação de deuteração incompleta ocorre devido aos resíduos de N-H localizados na região hidrofóbica da proteína, já que o aumento no tempo de incubação em solução preparada em tampão não modifica a intensidade da banda espectral referente à amida II. A deconvolução da região espectral correspondente à amida I indica quatro componentes de bandas espectrais importantes: 1634, 1650, 1657 e 1675 cm⁻¹.

A associação das bandas espectrais 1634 e 1675 cm⁻¹ corresponde a estrutura intramolecular do tipo folhas- β , apesar de que sobreposições da estrutura intramolecular do tipo β -turn podem contribuir para formação desta banda espectral. A banda de comprimento de onda 1657 cm⁻¹, em água deionizada, usualmente ocorre devido à estrutura do tipo α -helice, entretanto, não pode ser excluída a possibilidade da contribuição de estruturas do tipo 3_{10} -hélices. O comprimento de 1650 cm⁻¹ em água ²H₂O é associado à estruturas desordenadas. Além disso, alguns grupos de aminoácidos também absorvem luz nas regiões espectrais correspondentes às amidas I e II (BARTH

(2000). A banda de comprimento de onda 1515 correspondente a resíduos de tirosina yr, foi facilmente identificada, enquanto que as bandas de comprimento de onda 1585 e 1565 cm^{-1} correspondem a resíduos de asparagina e glutamina COO^- . As quatro bandas de comprimento de onda de 1675, 1657, 1650 e 1634 cm^{-1} corresponde ao amida I, representado 6, 20, 33 e 41% do banda original, respectivamente.

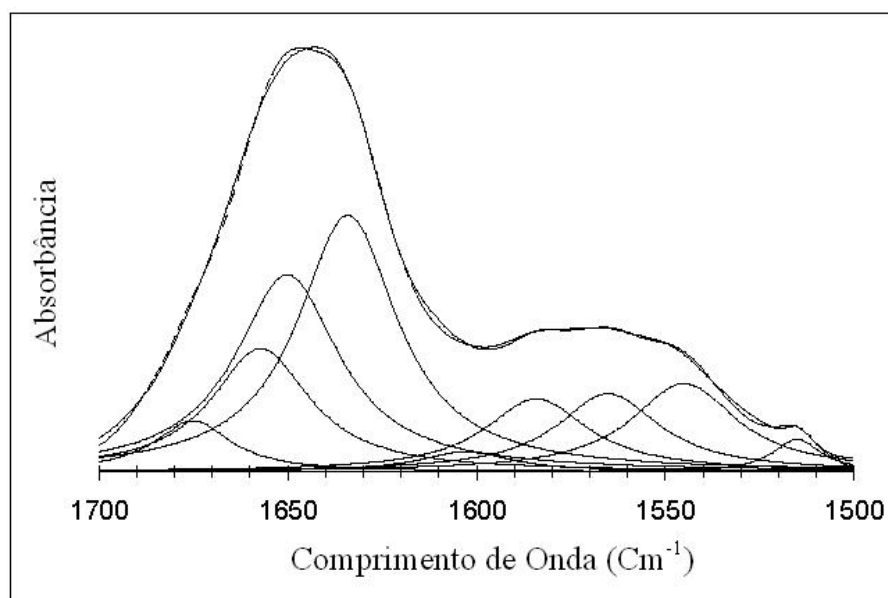


Figura 6.23. Espectro de FTIR da hialuronidase em pH 5,3. Concentração da hialuronidase 10 mg/mL.

Com a finalidade de explicar a sensibilidade da hialuronidase à variação de pH, procurou-se avaliar as mudanças conformacionais desta proteína, induzida pela variação de pH, através de análises de FTIR. Espectros da hialuronidase com o aumento do pH mostram uma leve diminuição da absorbância no comprimento de onda 1643 cm^{-1} para pH 5.3, para 1642 cm^{-1} para pH 6.2, 1641 cm^{-1} para pH 7.2 e 1640 cm^{-1} para pH 8, referente a banda da amida I (1643 cm^{-1} em pH 5.3, 1642 cm^{-1} em pH 6.2, 1641 cm^{-1} em pH 7.2 e 1640 cm^{-1} em pH 8), e uma diminuição da intensidade da banda correspondente a amida II, indicando um aumento no mecanismo de troca $\text{NH}/\text{N}^2\text{H}$, como mostra a Figura 6.24A. Mudanças conformacionais induzidas pelas variações de pH podem ser observadas com mais clareza por diferenças no espectro do infravermelho, determinada pela subtração dos espectros da hialuronidase obtidos em valores de pH diferentes, como ilustrado na Figura 6.24B.

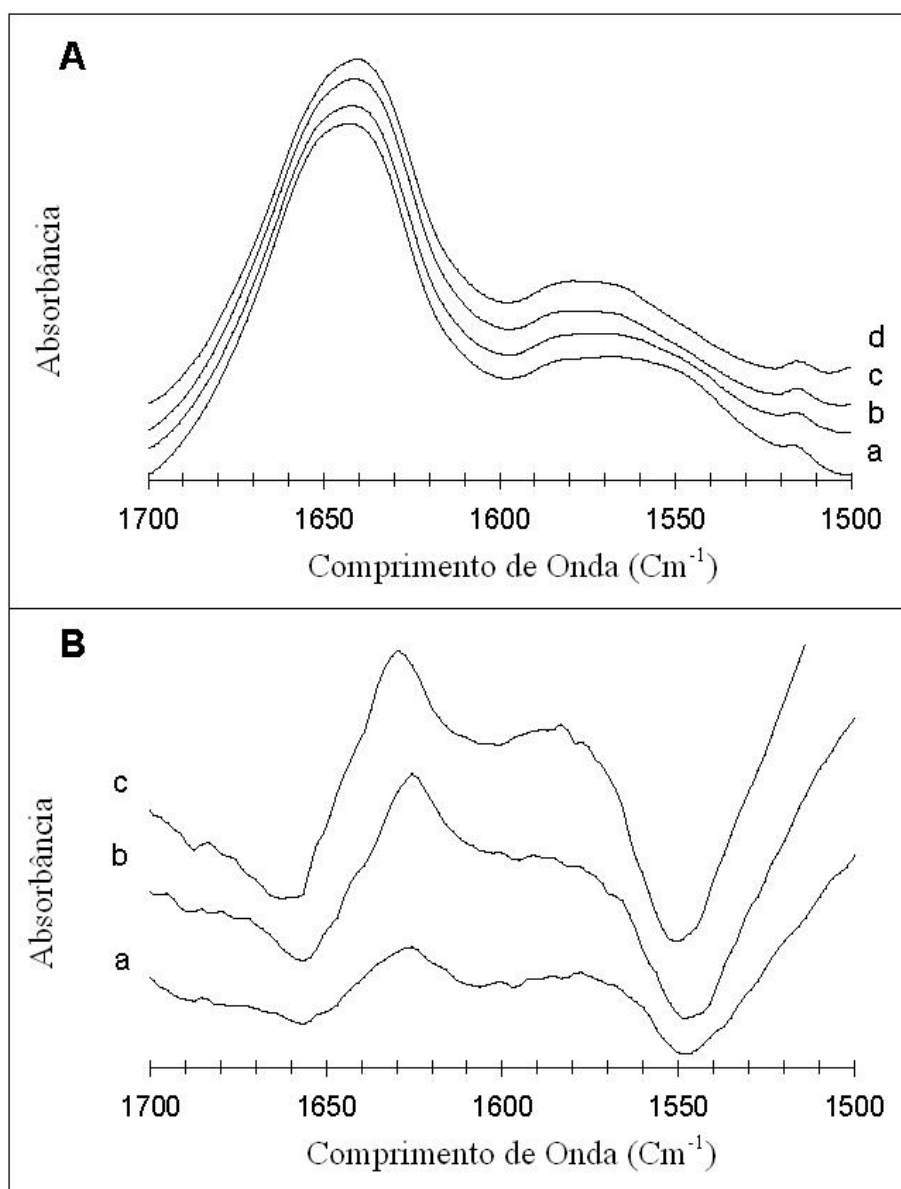


Figura 6.24. Influência do pH nos espectros de FTIR da Hialuronidase. A- Espectros de FTRI da hialuronidase em pH 5,3 (a), 6,2 (b), 7,2 (c) e 8,0 (d). B- Diferença dos espectros de infravermelho da hialuronidase, obtidos por subtração do espectro do pH 5,3 para os espectros dos valores de pH 6,2 (a), 7,2 (b) e 8,0 (c).

Diferenças espectrais tomando-se como referência a banda de comprimento de onda 1657 cm^{-1} , em análises realizadas nos valores de pH 6,2 e 8,0 conduzem a valores negativos, podendo ser associadas à estruturas do tipo α -hélice. Já diferenças espectrais positivas, tomadas no comprimento de onda 1625 cm^{-1} , correspondem às estruturas intermoleculares do tipo folha- β . Isto é uma indicação de que o aumento de estruturas do tipo folha- β ocorre em detrimento da diminuição de estruturas do tipo α -hélice. Em

pH 8,0, as diferenças positivas no espectro do infravermelho no comprimento de onda 1625 cm^{-1} envolvem 2-3 % dos aminoácidos presentes na proteína, o que significa que em torno de 11 aminoácidos estão presentes na formação de estruturas do tipo folha.

6.8 Formação de Filmes Monomoleculares da Hialuronidase

6.8.1 - Propriedades Interfaciais da Hialuronidase do Testículo Bovino

As propriedades anfifílicas da hialuronidase sugeridas tanto pela associação com a membrana quanto pela modelagem da proteína, foram diretamente observadas através das propriedades interfaciais da proteína. Os primeiros estudos para determinar a adsorção da proteína na interface ar / água foram realizados com a hialuronidase comercial (Hyaluronidase IV-S). Estes testes consistiram na injeção de $12\text{ }\mu\text{g}$ da proteína na subfase, composta de tampão fosfato em pH 5,3. A adsorção foi monitorada por medidas de pressão em função do tempo, mantendo-se a área constante.

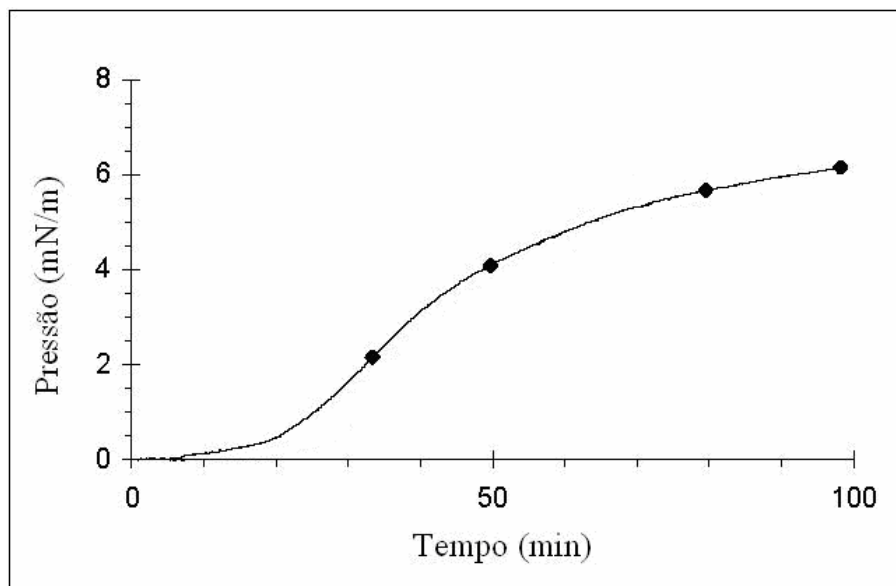


Figura 6.25 – Cinética da pressão de superfície devido a adsorção da hialuronidase na interface ar / água a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi injetada $12\text{ }\mu\text{g}$ da proteína solubilizada em tampão fosfato 100 mM contendo 150 mM NaCl em pH 5, 3 e área $\approx 7\text{ cm}^2$.

A Figura 6.25 mostra os perfis de pressão em função do tempo obtidos nos experimentos. O efeito da presença da proteína na interface só foi observado após 20 min da injeção da mesma na subfase. Após este tempo a pressão aumentou gradativamente, obtendo-se pressões constantes no tempo em torno de 70 min, indicando que a monocamada formada era estável. LAHDO *et al.* (2002) estudaram as propriedades interfaciais da proteína precursora amilóide (APP) na interface ar / água e obtiveram resultados semelhantes aos encontrados para a hialuronidase. Os autores descreveram que a APP apresenta propriedades interfaciais, indicando que a hialuronidase exhibe efetivamente propriedades interfaciais.

Os resultados apresentados na Figura 6.25, evidenciam que a hialuronidase é uma molécula com propriedades anfifílicas, o que possibilita a formação de monocamada da proteína, permitindo a determinação da sua área molecular, e ainda, estudos da afinidade desta molécula por outras moléculas anfifílicas ou não, na interface ar / água.

6.8.2 - Isotermas da Hialuronidase na Interface Ar / Água

A adsorção de proteínas na interface ar / água foi acompanhada pela formação de isotermas sucessivas, através de medidas da pressão em função da área (π -A), após a injeção de 12 μ g de hialuronidase na subfase, composta de tampão fosfato 100 mM, contendo 150 mM de NaCl e pH 5,3. A concentração final da proteína na subfase foi de 0,1 μ g / mL. A superfície foi comprimida após diferentes intervalos de tempo, obtendo-se as isotermas π -A apresentadas na Figura 6.26. A área molecular para cada pressão de superfície foi aumentada no decorrer do tempo, indicando que a proteína foi adsorvida na interface ar / água. A Figura 6.26 mostra ciclos de compressão e descompressão da hialuronidase nos tempos de 35, 75 e 135 minutos.

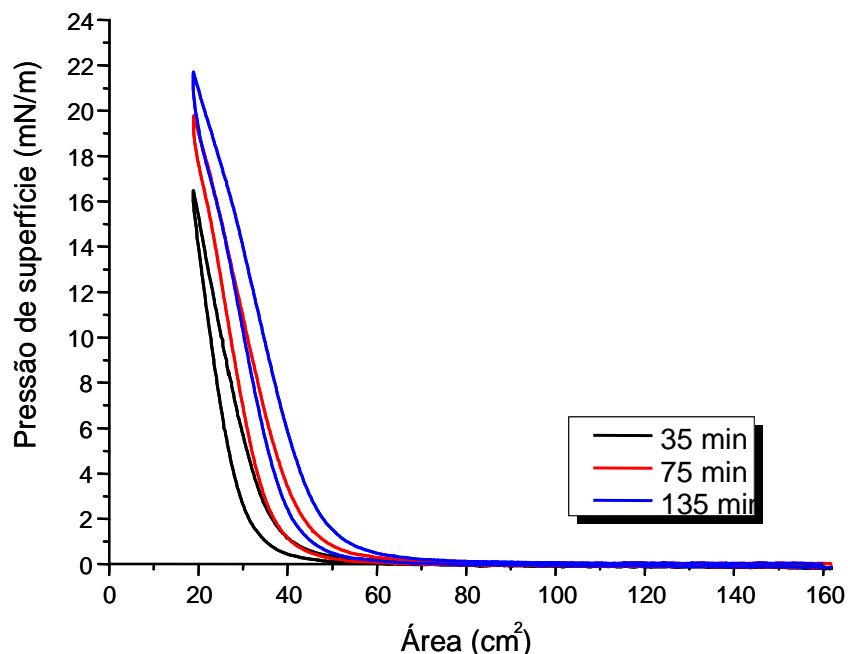


Figura 6.26 - Sucessivas isotermas de adsorção da hialuronidase na interface ar / água a 21 °C. Após a injeção de 12µg de hialuronidase na subfase composta de tampão fosfato pH 5,3, velocidade de agitação de 100 rpm.

As isotermas da hialuronidase na interface ar / água mostram um perfil típico de isotermas de moléculas anfifílicas. Observa-se que no início da compressão, quando há uma área disponível extensa, as moléculas se comportam como uma fase gás, não se observando aumento de pressão. Para áreas menores que 80 cm² observa-se aumento da pressão. A partir deste ponto as moléculas começam a sofrer interferência uma das outras. Para a isoterma obtida no tempo de 135 min, observa-se que na área entre 80 cm² e 45 cm², as moléculas de hialuronidase se comportam como uma fase líquida expandido. Para áreas menores as moléculas se comportam como se estivessem em uma fase líquida condensada. As isotermas da hialuronidase não apresentam colapsos, indicando que a altas pressões as moléculas se organizem como em uma fase sólida formando multicamadas.

Medidas sucessivas de isotermas, após a injeção da proteína, são apropriadas para determinação da dependência com o tempo, da adsorção da enzima na interface ar / água. Nos experimentos, as medidas sucessivas de isotermas mostraram que a hialuronidase continua migrando para a interface mesmo após 135 minutos, e que a mesma permanece na interface, o que é observado pela pressão de superfície

desenvolvida pela proteína após a injeção, como consequência de sua adsorção na interface. Valores de pressão similares são obtidos por difusão direta da proteína na superfície. Resultados semelhantes foram obtidos para outras proteínas, em estudos desenvolvidos por GRAHAM *et al.* (1979), VERNOUX *et al.* (2006), ANGELETTI *et al.* (2004) e CARRIZO *et al.* (2001).

6.8.3 - Quantificação da Área Molecular da Hialuronidase

A área ocupada por uma molécula anfifílica pode ser calculada traçando-se uma tangente ao ponto de curvatura da isoterma, que corresponde ao ponto onde as moléculas passam da fase líquida expandido para a fase líquido condensado, obtida desta molécula em função da área por molécula, o ponto onde a tangente toca o eixo dos X corresponde à área ocupada por molécula. Para o cálculo da área ocupada por uma molécula de hialuronidase, foi utilizada a Figura 6.27, onde observa-se que a proteína ocupa uma área média de 37 nm².

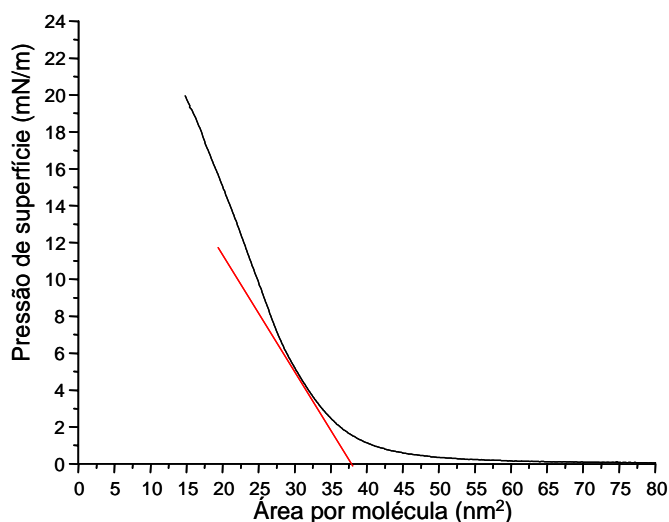


Figura 6. 27 - Isotherma da hialuronidase, 20 µg da proteína, velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.

A hialuronidase do veneno de abelha apresentando 36% de homologia com a hialuronidase do testículo bovino possui uma área molecular de 21,5 nm² (MARKOVIC-HOUSLEY). O resultado da Figura 6.27 é coerente com resultados encontrados na literatura, considerando-se que a hialuronidase do veneno de abelha

possui 350 aminoácidos, enquanto que a hialuronidase do testículo bovino possui 439 resíduos de aminoácido. Além disso, utilizou-se hialuronidase do veneno de abelha 100% cristalina para a determinação da área molecular, enquanto que para a determinação da área molecular da hialuronidase do testículo bovino, utilizou-se a técnica de monocamadas, na qual a molécula fica em contato com o meio líquido, conduzindo a um acréscimo do seu grau de hidratação, contribuindo para o acréscimo de sua área molecular.

6.8.4 - Avaliação da Influência do pH e da Presença de NaCl na Subfase na Isotherma de Adsorção de Hialuronidase na interface ar / água

Para a avaliação do efeito de diferentes valores de pH na subfase, foram realizados testes utilizando-se o tampão fosfato 0,1M contendo 0,15 M de NaCl em valores de pH na faixa de 5,3 a 8,0. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se quantidades variadas da proteína, na faixa de 3 μ g a 20 μ g. Observou-se para a hialuronidase que, a melhor quantidade de proteína para a deposição é de 12 μ g, o que corresponde a uma melhor visualização da variação da pressão. Os resultados estão apresentados na Figura 6.28.

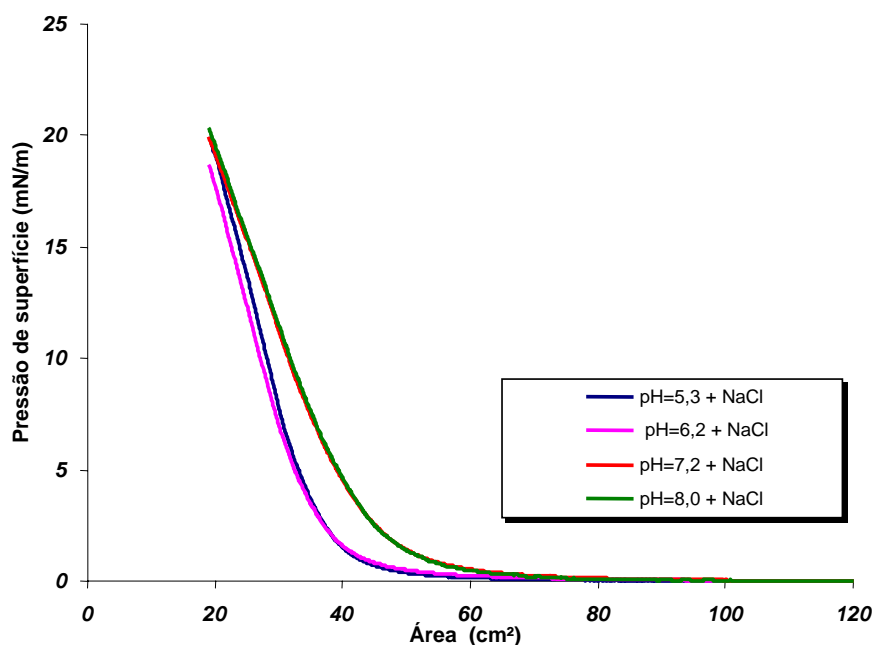


Figura 6. 28 - Isotermas da deposição de 12 μ g da hialuronidase, subfase composta de tampão fosfato 0,1M mais 0,15 M NaCl em valores de pH variando de 5,3 a 8,0, a temperatura de 21°C, sem agitação.

Observa-se que nos valores de pH 5,3 e 6,2 a molécula se comporta de forma semelhante, ocupando a mesma área. Para os valores de pH 7,2 e 8,0 observa-se um aumento da área, quando comparada com a do pH 5,3. Este aumento pode ser atribuído a um princípio de desnaturação da molécula, pois nestes valores de pH a atividade enzimática não é muito elevada, quando comparada com a obtida no pH ótimo de atividade.

Foram realizados testes para avaliar a cinética de adsorção da hialuronidase na interface ar / água com a variação do pH. Os ensaios foram realizados utilizando-se tampão fosfato 0,1 M, contendo 0,15 M de NaCl em diferentes pH. Nestas subfases foram injetados 12 µg de hialuronidase, submetidos à compressão em diferentes tempos, com medidas da pressão final (Figura 6.29).

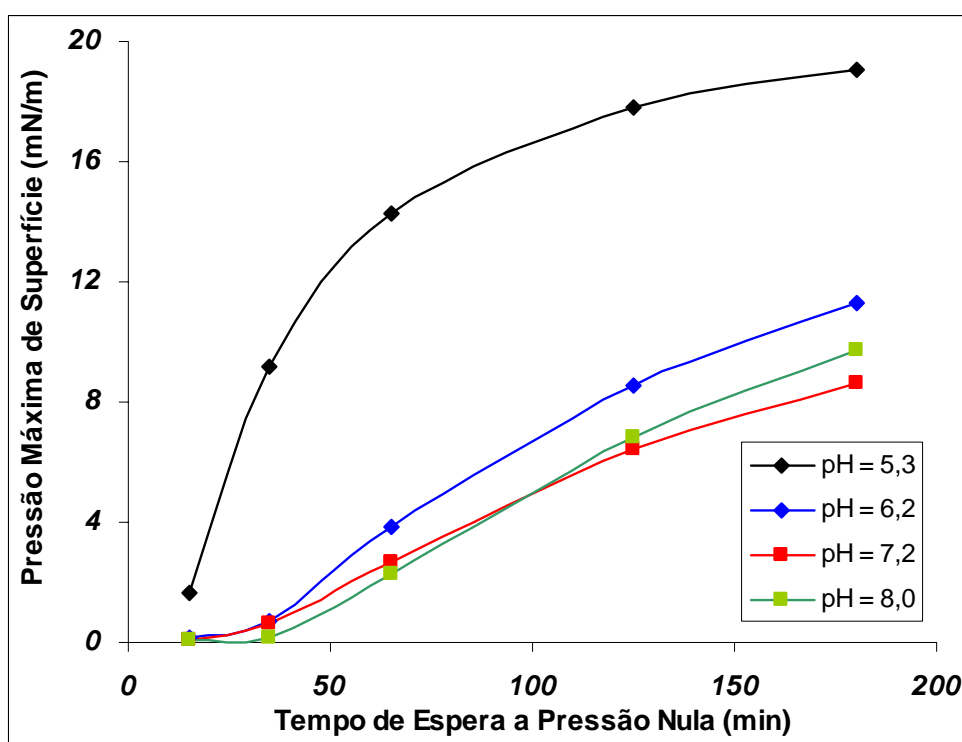


Figura 6. 29 – Avaliação da cinética de adsorção da hialuronidase na interface ar / água em função do pH da subfase, a temperatura de 21°C, na presença de 0,15 M de NaCl.

A Figura 6.29 mostra a cinética de adsorção da hialuronidase na interface ar / água em diferentes valores de pH. Com base na Figura 6.29 pode-se concluir que as curvas tendem assintoticamente ao máximo de pressão, quando a subfase e composta

por tampão fosfato 0,1 M e 0,15 M de NaCl em pH 5,3, pH ótimo de atividade. Porém, observa-se que para os demais valores de pH o tempo de 180 min não foi suficiente para que a proteína atingisse seu estado estacionário de migração. Este resultado permite afirmar que pH ótimo de atividade da hialuronidase é também o pH onde a proteína se apresenta mais “desconfortável”. Talvez por isso a atividade seja maior neste pH, pois neste pH a proteína procura ligar-se a outras moléculas, tentando minimizar a sua energia livre de superfície.

Para a avaliação do efeito do sal (NaCl) na subfase foram realizados experimentos semelhantes aos apresentados na Figura 6.28, sendo que a subfase era composta de tampão fosfato 0,1M sem adição do NaCl. Os resultados estão apresentados nas Figuras 6.30 e 6.31.

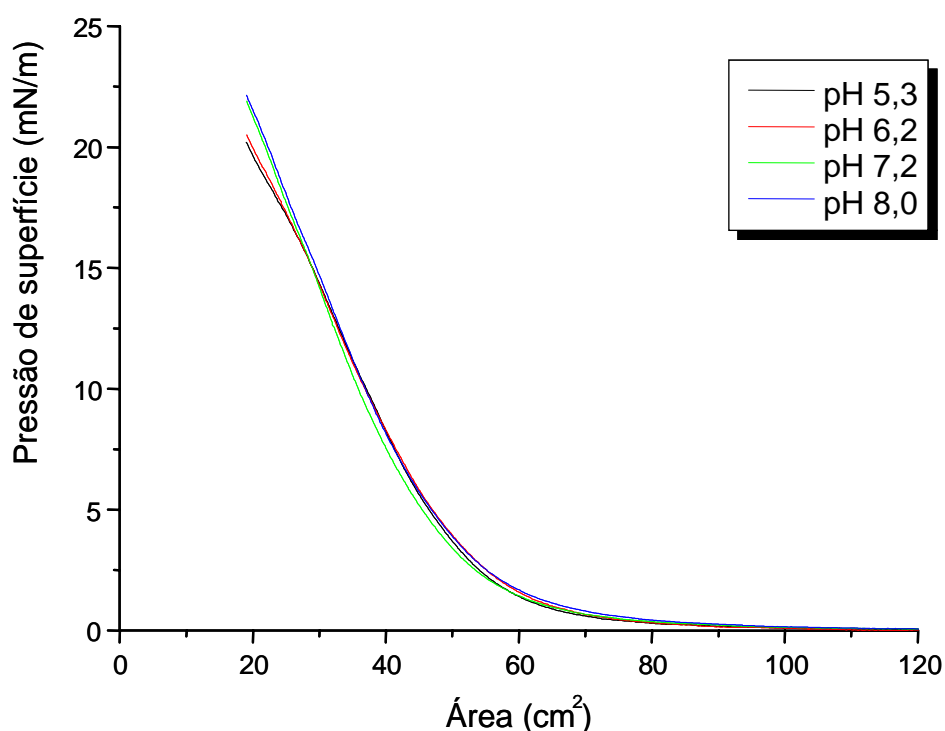


Figura 6. 30 - Isotermas da deposição de 12 μ g da hialuronidase, subfase composta de tampão fosfato 0,1M em valores de pH variando de 5,3 a 8,0, a temperatura de 21°C.

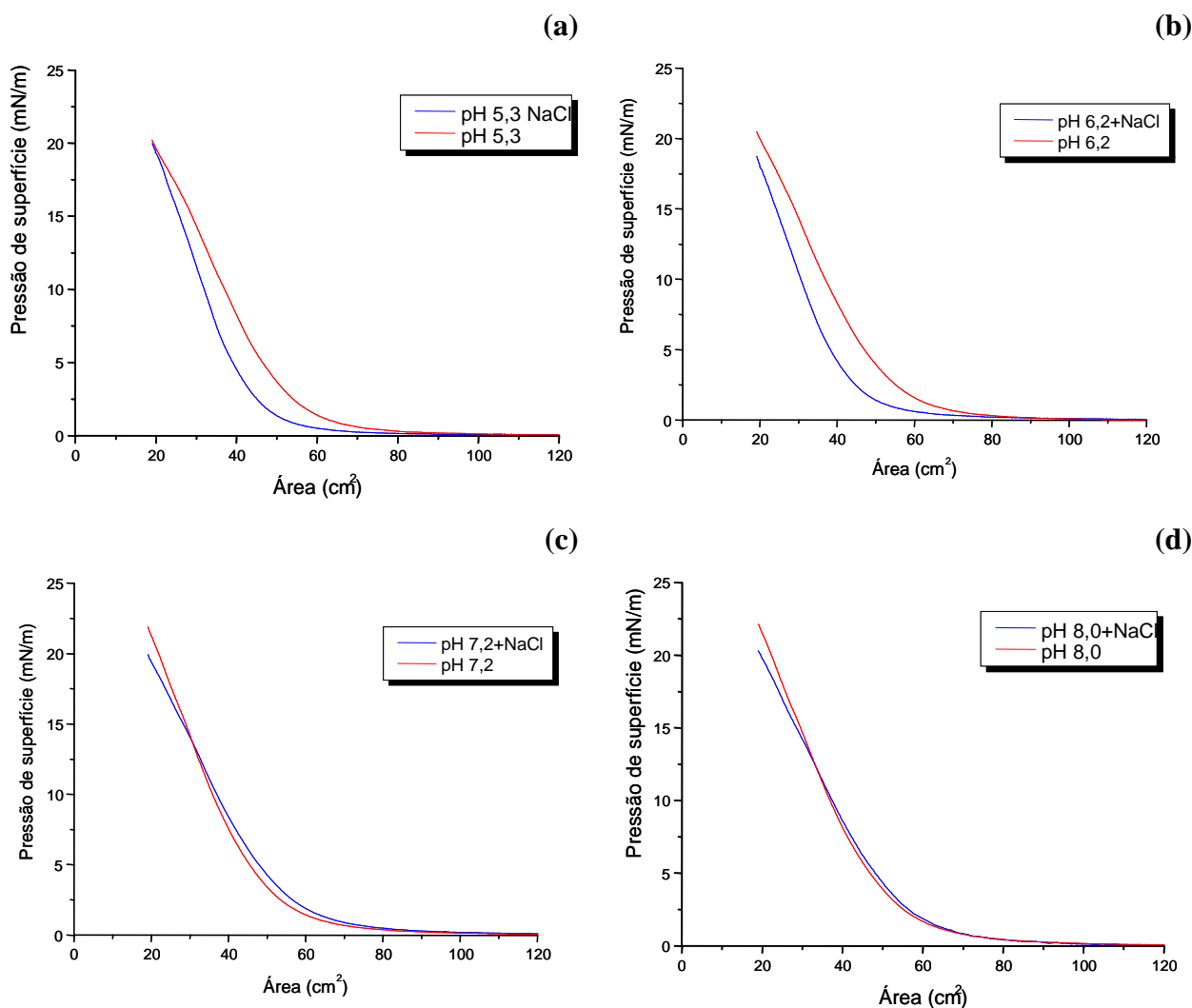


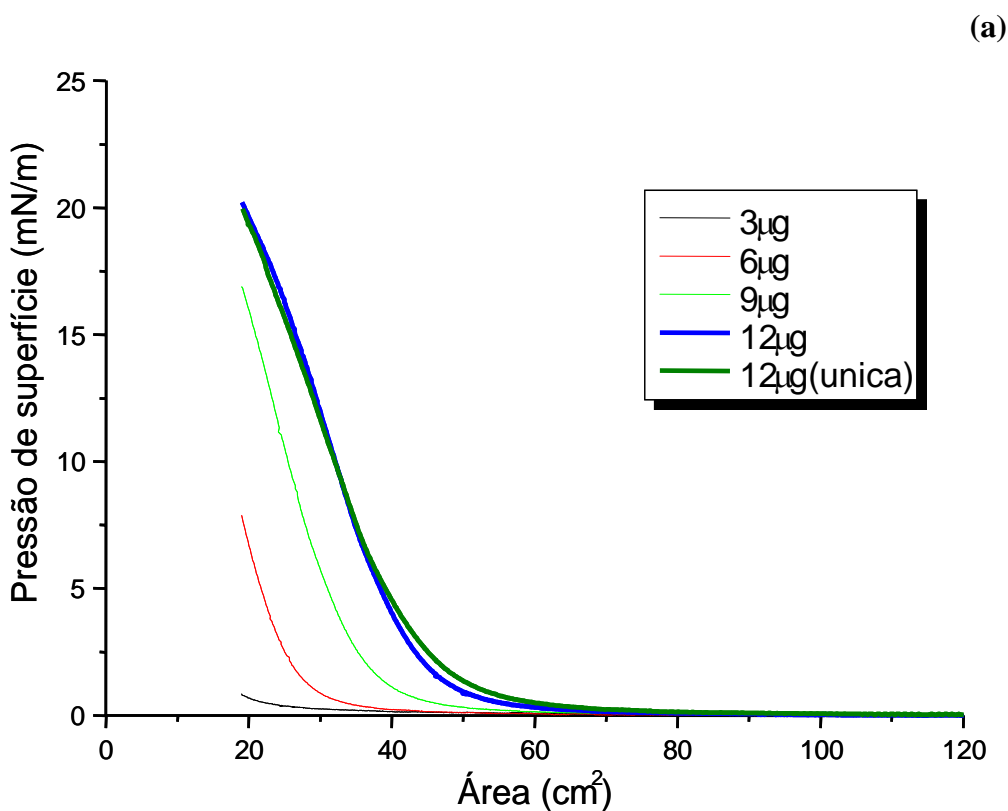
Figura 6. 31 - Comparação das isotermas da deposição de 12 μg da hialuronidase, subfase composta de tampão fosfato 0,1M em valores de pH variando de 5,3 a 8,0 e o mesmo tampão sem adição de sal, a temperatura de 21°C. (a) – pH = 5,3, (b) – pH = 6,2, (c) – pH = 7,2 e (d) – pH = 8,0.

As isotermas apresentadas na Figura 6.30 mostram a variação de pressão observada em relação aos valores de pH quando a subfase era composta de tampão fosfato 0,1 molar nos valores de pH 5,3, 6,2, 7,2 e 8, estes experimentos foram conduzidos na ausência de NaCl. Os resultados da Figura 6.30 mostram que a variação de pH não ocasiona uma variação de pressão. Porém, os resultados apresentados na Figura 6.28 mostram que para valores de pH diferentes ocorre uma variação na pressão.

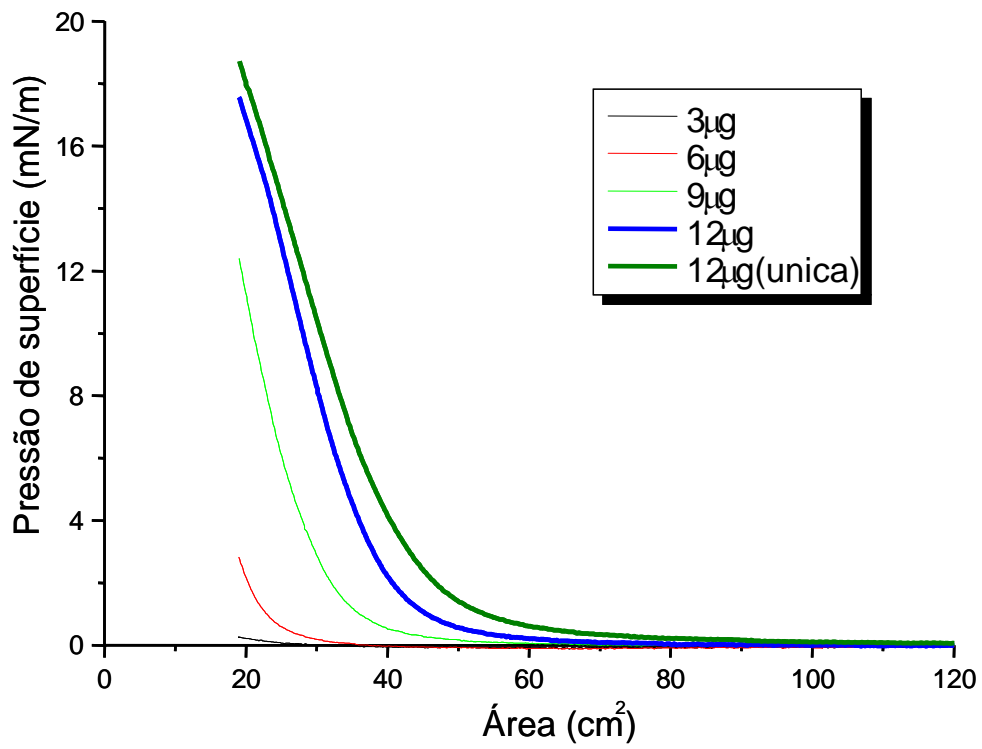
Os resultados da Figura 6.31 nos permitem concluir que esta diferença de pressão (Figura 6.28) é ocasionada pela presença do sal (NaCl) na subfase.

6.8.5 - Influência na Forma de Deposição da Proteína

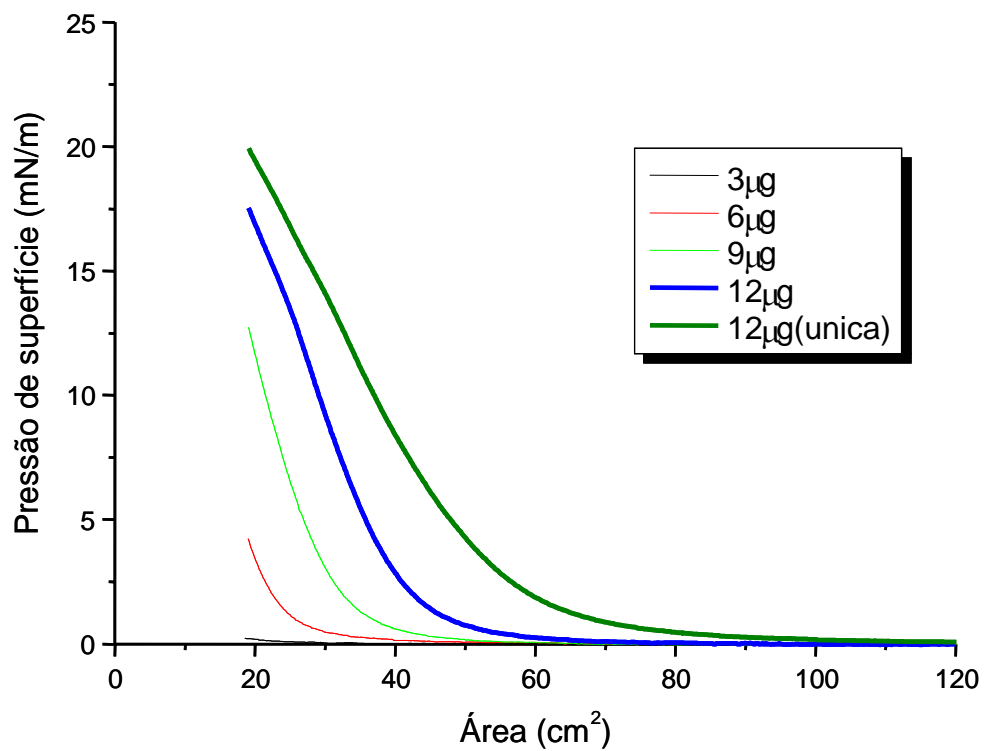
Os ensaios foram conduzidos em função da quantidade de proteína depositada. Após a primeira deposição de $3\mu\text{g}$ da proteína, esperou-se 15 minutos para realização da primeira compressão. Em seguida, acrescentou-se mais $3\mu\text{g}$ e esperou-se 15 minutos para realização da segunda compressão. Este procedimento foi repetido até a obtenção de $12\mu\text{g}$ da proteína. Avaliou-se também o efeito da adição de $12\mu\text{g}$ da proteína de uma única vez. A Figura 6.32 mostra a comparação entre os resultados de isothermas obtidas através de deposições sucessivas e da deposição em uma única etapa.



(b)



(c)



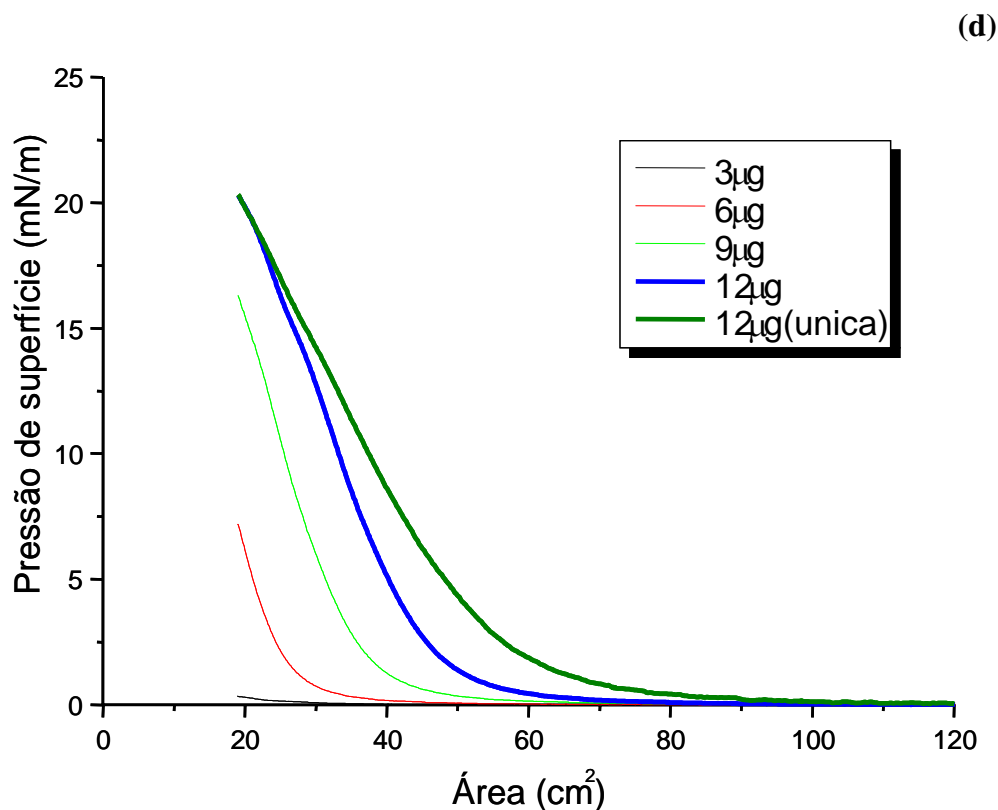


Figura 6.32 - Avaliação da forma de deposição. Isotermas da deposição sucessivas a cada 3µg da hialuronidase até a quantidade de 12 µg e a isoterma da deposição de 12 µg de uma só vez [12µg (única)], subfase composta de tampão fosfato 0,1M em valores de pH variando de 5,3 a 8,0, a temperatura de 21°C. (a) pH = 5,3, (b) pH = 6,2, (c) pH = 7,2 e (d) pH = 8,0.

Observa-se que há uma diferença nas isotermas apresentada na Figura 6.32, em relação à forma que a proteína é colocada na subfase (deposição ou injeção), de forma que esta variação é dependente do pH. De acordo com os resultados, nos pH 6,2, 7,2 e 8,0 parte da proteína depositada na interface não apresenta-se muito estável o que é observado pelo fato de que uma pequena quantidade da proteína não permanece na interface após sucessivas compressões e descompressões. Apesar disso, os resultados obtidos em pH 5,3 (pH ótimo de atividade) mostram que a proteína, mesmo na interface ar / água, é muito estável, favorecendo a sua aplicação para o estudo de filmes de Langmuir, pois a mesma não necessita de configurações especiais (TROITSKY *et al.*, 1996; BERZINA *et al.*, 1996; PASTORINO *et al.*, 2002) na formação de monocamadas para manter-se estável.

6.8.6 - Estudo da Afinidade da Hialuronidase pelo N-Acetil Glucosamina

N-acetil glucosamina (NAC) é um composto que faz parte da molécula do ácido hialurônico, que é o principal substrato da hialuronidase. Testes realizados na balança de Langmuir mostraram que esta molécula não apresenta características anfifílicas. Portanto, para a avaliação da afinidade da hialuronidase por NAC, primeiramente foram realizadas isotermas de injeção da hialuronidase, seguidas por uma injeção do NAC, e observado o efeito da presença do NAC na subfase. Os resultados estão mostrados na Figura 6.33.

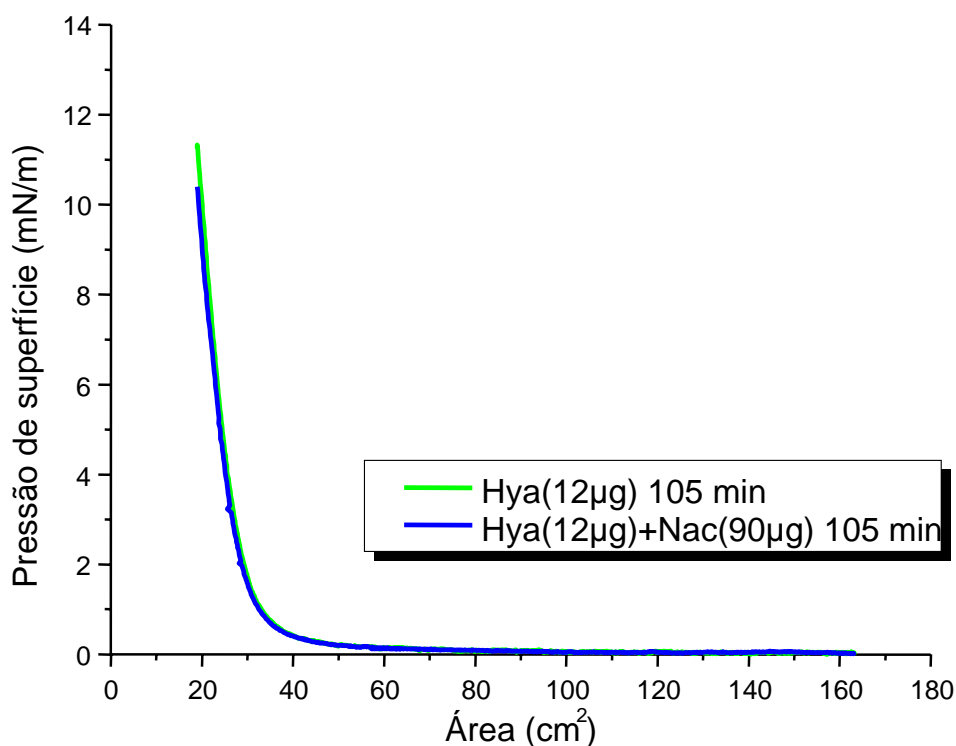


Figura 6. 33 - Isotermas da hialuronidase e da hialuronidase mais o NAC em função do tempo. Foram injetados 12 µg da proteína e 90µg de NAC , velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.

De acordo com a Figura 6.33, observa-se que a hialuronidase não apresenta afinidade significativa (forte) pelo NAC, pois a presença do NAC na subfase foi incapaz de arrastar a molécula da proteína da interface ar / água. Novos ensaios foram

conduzidos, em condições diferentes, injetando-se uma mistura da proteína com o NAC, mostrando que a proteína forma um filme idêntico ao obtido na ausência do NAC. Com isto, pode-se afirmar que a hialuronidase não apresenta afinidade suficiente com o NAC capaz de neutralizar a energia livre de superfície das moléculas de proteína quando a mesma se encontra na subfase. Por outro lado, podem ocorrer interações fracas na interface (menor que a força ocasionada pelas áreas hidrofóbicas da molécula de hialuronidase, área esta que é a responsável pela afinidade da hialuronidase pela interface ar / água), ocasionando o arraste das moléculas de NAC para a interface sem gerar o aumento de pressão.

6.8.7 - Adsorção do Ácido Hialurônico em Monocamada da Hialuronidase

Primeiramente foram realizados ensaios com ácido hialurônico para observar se o mesmo apresentava propriedades interfaciais. Nestes experimentos utilizou-se 3,3 µg/L de ácido hialurônico, injetado na subfase composta por tampão fosfato 0,1 M e 0,15 M NaCl. Os resultados mostraram que o ácido hialurônico não migra para a superfície. Contudo, foram realizados experimentos adicionais, fazendo-se a deposição do ácido hialurônico na interface ar / água. Os resultados mostraram mais uma vez que o ácido não permanece na interface. Com base nesta informação, pode-se afirmar que o ácido hialurônico não apresenta propriedades interfaciais.

Os experimentos para avaliação da afinidade da hialuronidase pelo seu substrato, em um sistema monomolecular, utilizando-se água na subfase, foram conduzidos da seguinte forma: deposição de 12 µg da proteína, com repouso de 20 minutos, seguido de compressão e descompressão; injeção de 1mg de ácido hialurônico sob agitação de 100 rpm. Após intervalo de 10 minutos, a segunda isoterma foi levantada. Os resultados estão apresentados na Figura 6.34.

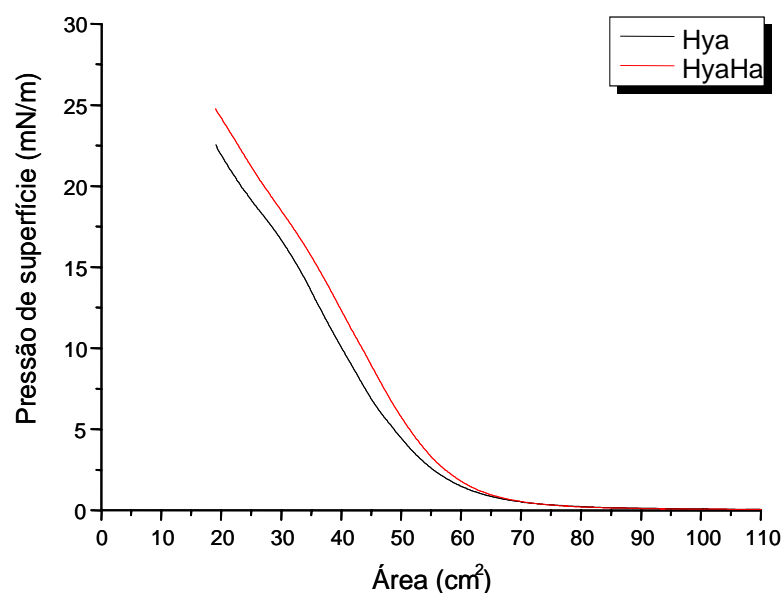


Figura 6.34 - Isotermas da hialuronidase e da hialuronidase mais o ácido hialurônico. Foram injetados 12 μg da proteína e 1mg de ácido hialurônico, velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.

De acordo com a Figura 6.34, há um aumento da pressão após a injeção do ácido hialurônico, devido ao efeito da atração entre a enzima e o seu substrato. O aumento da pressão observado pode ser devido a pedaços da cadeia do ácido hialurônico, que durante o processo são atraídos pela proteína para a interface penetrando no filme de hialuronidase, ou devido a uma mudança na estrutura da proteína durante a migração do ácido para interface ar / água, interação enzima-substrato, sofrendo um aumento da área ocupada por molécula.

6.8.8 - Estudo do Comportamento da Hialuronidase na Presença de uma Monocamada Lipídica

Foi estudada a interação da hialuronidase na presença de monocamadas do glicolípido colesterol- E3 – N-acetil-glucosamina (GL) (Figura 6.35) e DPPC (Figura 6.36). Os estudos da interação da hialuronidase com o GL foram conduzidos utilizando-se o tampão fosfato na subfase e variando-se o pH. Nos ensaios foram utilizados 40 μL de uma solução 0,545 mM do GL solubilizado em uma mistura de solvente (hexano / etanol 9:1). O GL foi primeiramente depositado na superfície. A primeira compressão, seguida pela descompressão foi realizada 15 minutos após a deposição. Ao fim da etapa

de decompressão, injetou-se na subfase 12 μL da solução de hialuronidase 1 mg/mL na subfase. Novos ciclos de compressão e decompressão foram realizados em tempos pré-determinados, em experimentos realizados em $\text{pH} = 5,3$, como indicado na Figura 6.37.

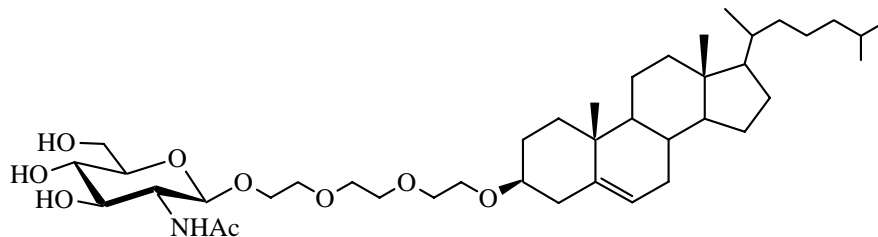


Figura 6.35 – Estrutura do glicolípido colesterol- E3 – N-acetil-glucosamina (GL).

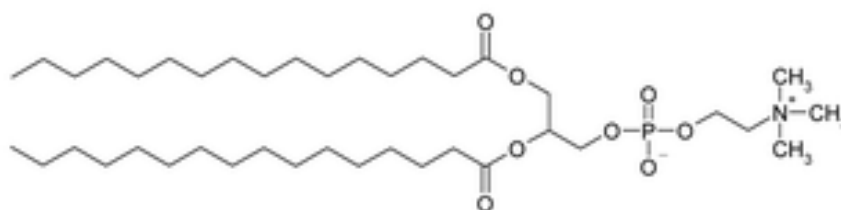


Figura 6.36 – Estrutura da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

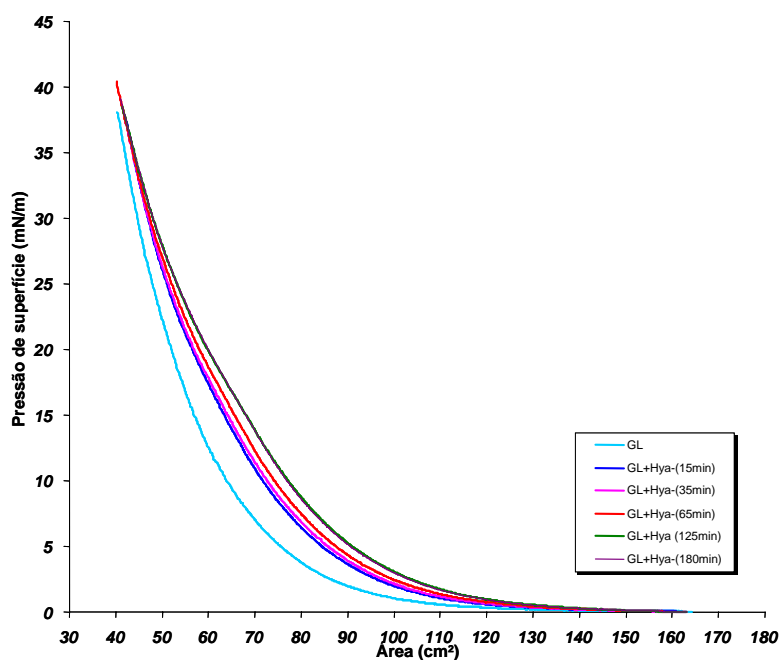
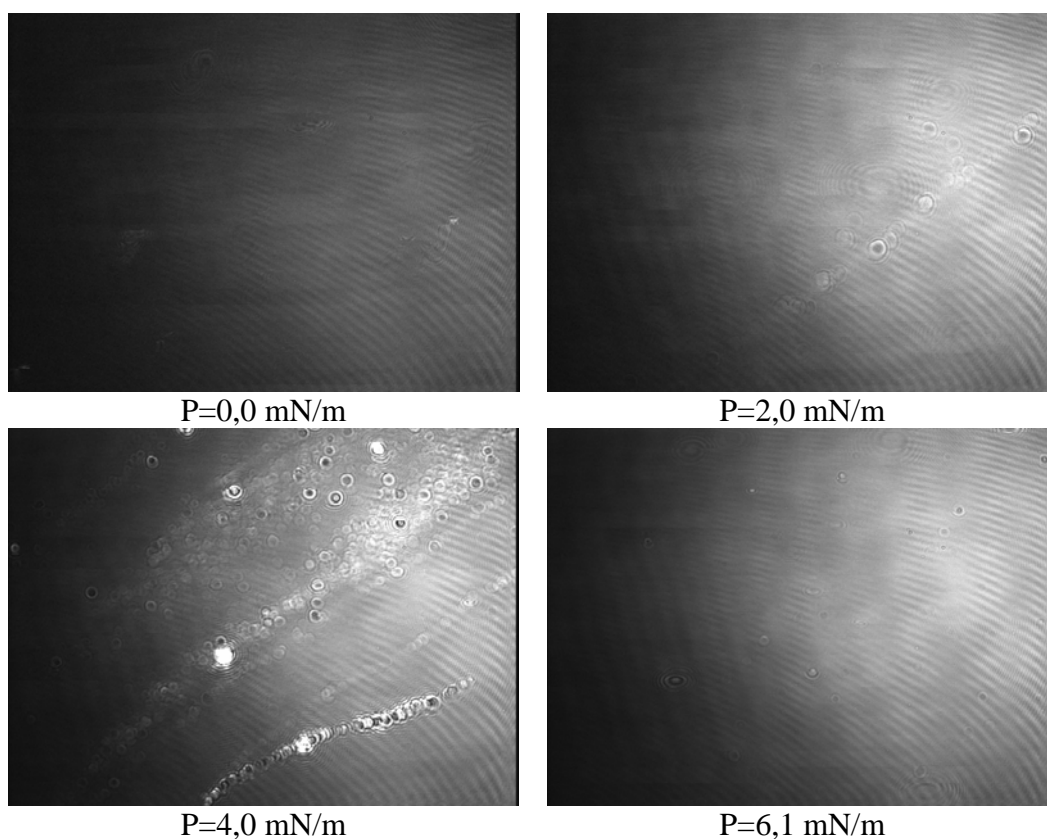


Figura 6.37 - Isotherma do glicolípido e do glicolípido mais hialuronidase em função do tempo. Foram depositadas 40 μL da solução do GL 0,545 $\mu\text{g/L}$ e injetadas 12 μg da proteína, velocidade de agitação de 100 rpm, a temperatura de 21°C.

Observa-se que há um aumento da pressão de superfície devido à presença da hialuronidase, o que mostra que a proteína possui uma afinidade relativamente grande pela interface ar / água, uma vez que a molécula de proteína consegue manter-se na superfície mesmo na presença de uma molécula fortemente anfifílica (devido a cadeia do colesterol presente no GL).

6.8.9 – Microscopia pelo Ângulo de Brewster (BAM)

A microscopia foi utilizada em várias etapas do trabalho, por se tratar de ensaio visual que possibilita um melhor entendimento dos fenômenos que ocorrem durante a formação da monocamada. Os primeiros ensaios foram realizados com a monocamada da hialuronidase pura, e seus resultados estão mostrados na (Figura 6.38).



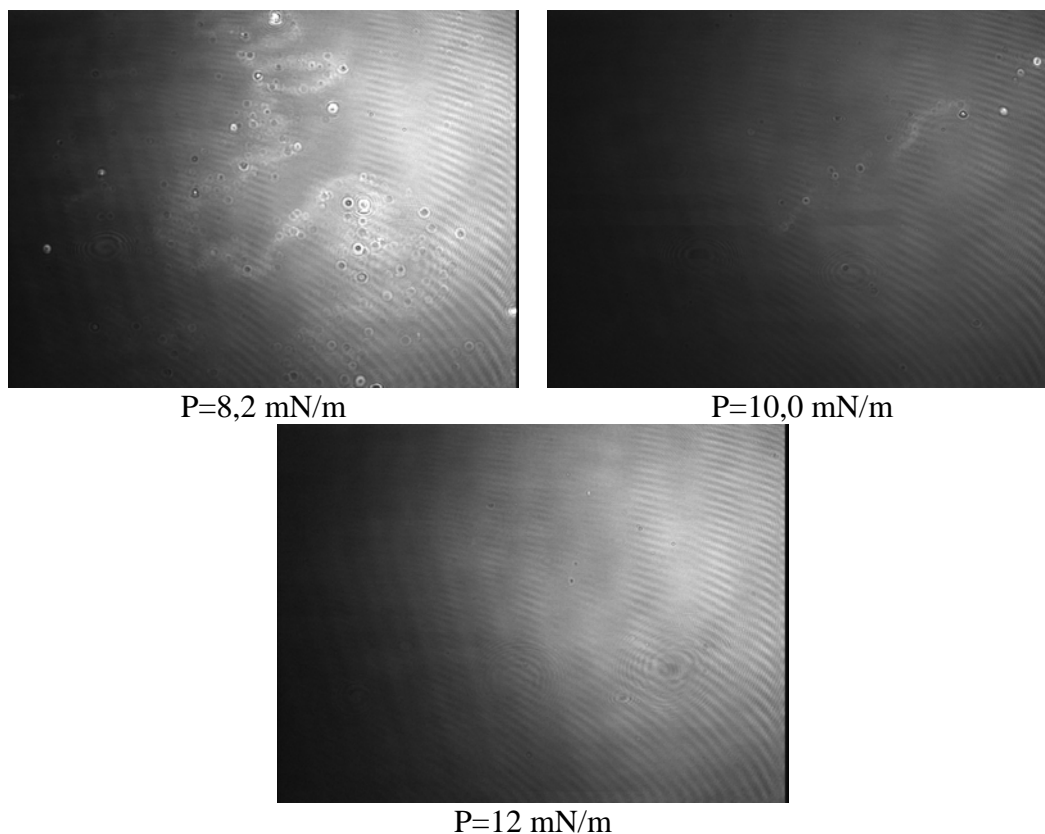


Figura 6.38 - Fotos obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster da monocamada de hialuronidase nas pressões de 0 a 12 mN/m.

As imagens obtidas através da BAM mostram que a formação da monocamada da proteína pura apresenta diferentes etapas. Conforme mostrado na Figura 6.38, na pressão de 0 até 2 mN/m, as imagens mostram que não há nenhuma configuração especial, pois nesses valores de pressão a molécula se comporta como se estivesse no estado gasoso. Na imagem que corresponde a pressão de 4 mN/m visualiza-se uma conformação especial. Observando-se a isoterma da hialuronidase Figura 6.39, a pressão de 4 mN/m corresponde ao início da fase onde as moléculas se comportam como se estivessem no estado de líquido condensado, cuja conformação pode ser observada até a pressão 10 mN/m, porém, passando por conformações diferentes. Ao fim da compressão, pressão de 12 mN/m, não possível visualizar a conformação do estado sólido, devido a elevada intensidade da reflexão da luz.

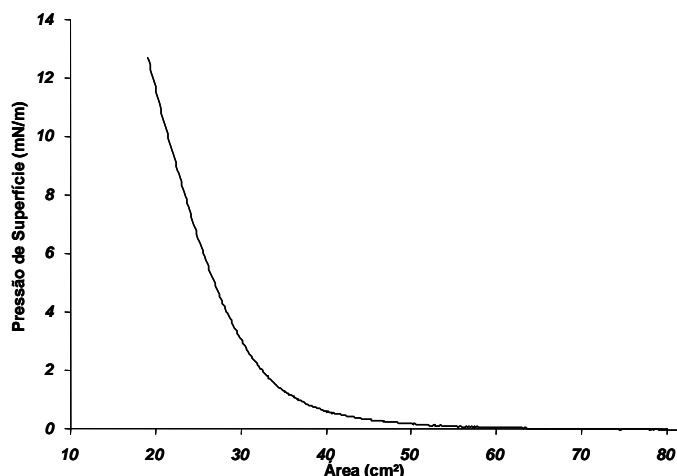
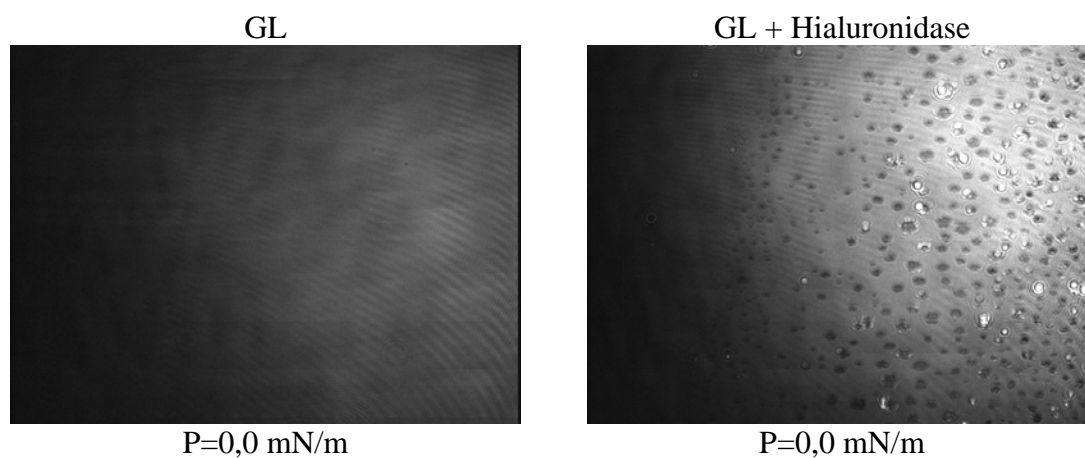
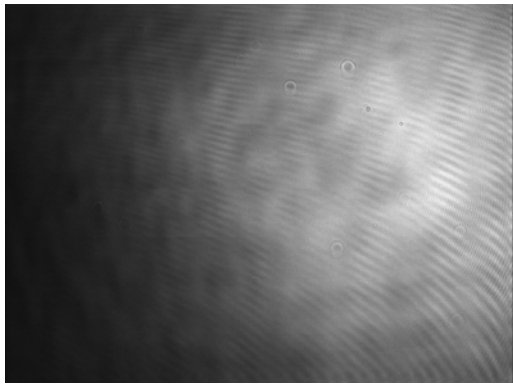


Figura 6.39 - Isoterma da hialuronidase. Foram depositados 40 μg da proteína, sem agitação, a temperatura de 21°C.

Observou-se também que a hialuronidase modificava as isotermas do glicolípido e da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Apesar disso, apenas os resultados das isotermas não são conclusivos no que diz respeito a estas interações. Em função disso, foram realizados novos testes, utilizando a microscopia pelo ângulo de Brewster com diferentes isotermas: do GL, da hialuronidase na presença do GL, da DPPC e da hialuronidase na presença do DPPC. A Figura 6.40 mostra as imagens obtidas durante a formação das isotermas (Figura 6.41) contendo glicolípido e da hialuronidase na presença do glicolípido. A Figura 6.42 mostra as imagens obtidas para a DPPC e para hialuronidase na presença da DPPC.

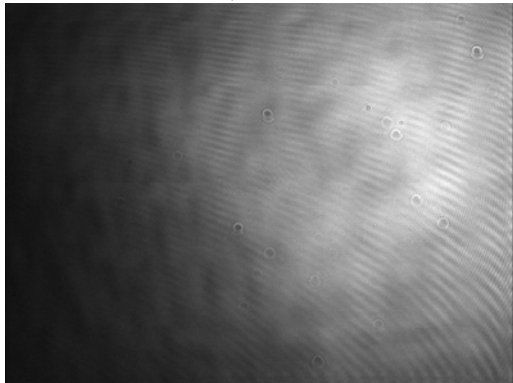




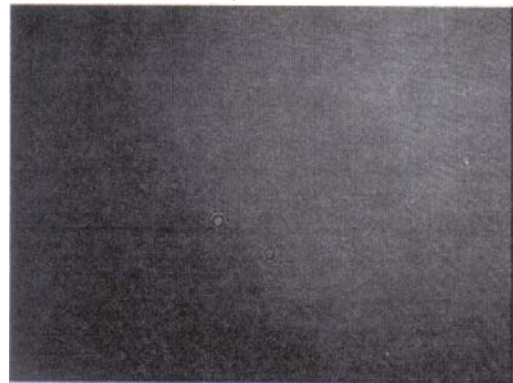
P=3,1 mN/m



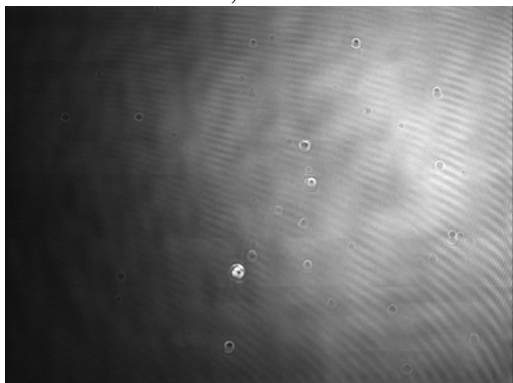
P=3,1 mN/m



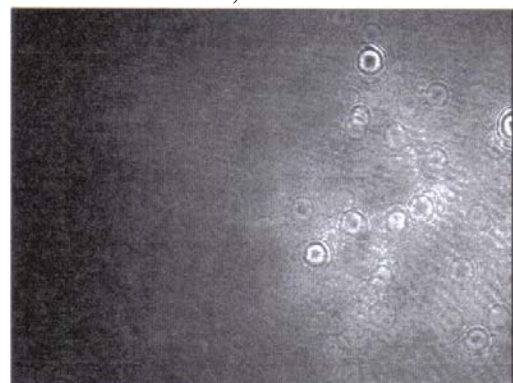
P=6,3 mN/m



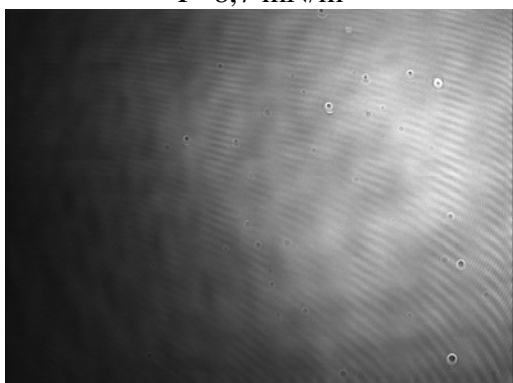
P=5,8 mN/m



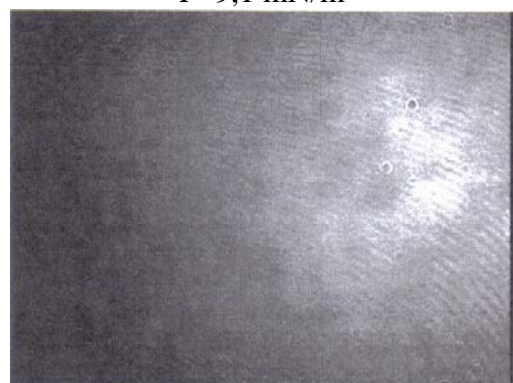
P=8,7 mN/m



P=9,1 mN/m



P=11,6 mN/m



P=12,0 mN/m

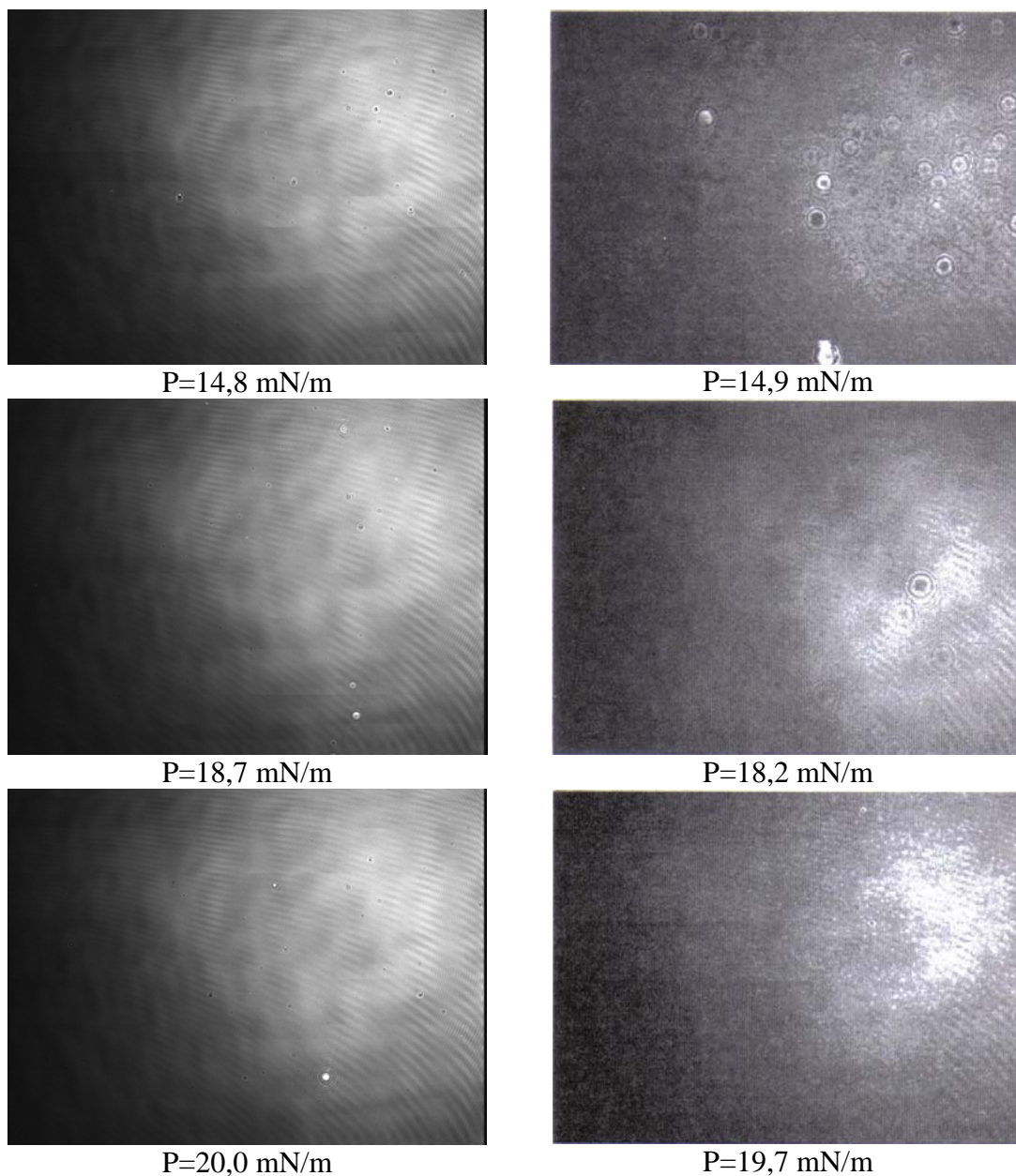


Figura 6.40 - Imagens obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster da monocamada de GL e GL mais hialuronidase nas pressões de 0 a 20 mN/m.

As isotermas do glicolipídio e da hialuronidase na presença de glicolipídio mostraram-se diferentes. As imagens obtidas para a monocamada de GL são típicas de monocamadas de colesterol não apresentando variações nas imagens obtidas para diferentes valores de pressão. As imagens foram realizadas durante a construção das isotermas, quando eram depositados 50 μ L de uma solução 0,545 mM de GL. 20 minutos após a etapa de deposição, fazia-se a compressão, seguida da descompressão e injeção de 30 μ L de uma solução 1 mg /mL de hialuronidase. A segunda compressão era realizada 150 minutos após a etapa de injeção da hialuronidase. Com base nas

imagens da Figura 6.40 e nas isotermas da Figura 6.41, observa-se que a proteína interage com o GL a ponto de modificar a sua isoterma, porém, esta interação também foi observada nas imagens obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster. Estes resultados sugerem que a hialuronidase migra para interface ar / água mesmo na presença da monocamada do GL.

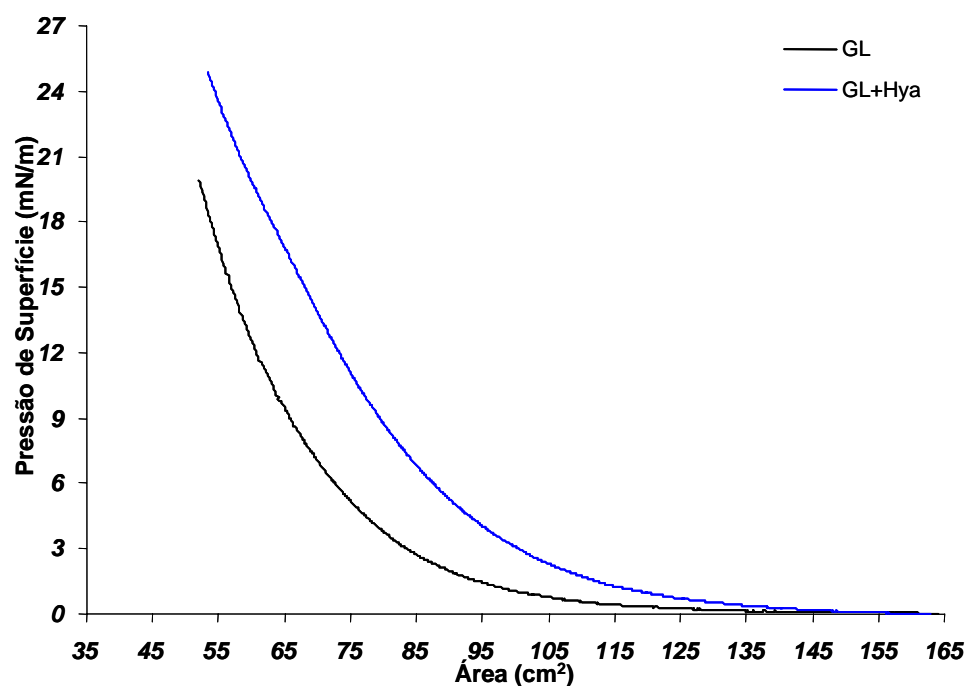
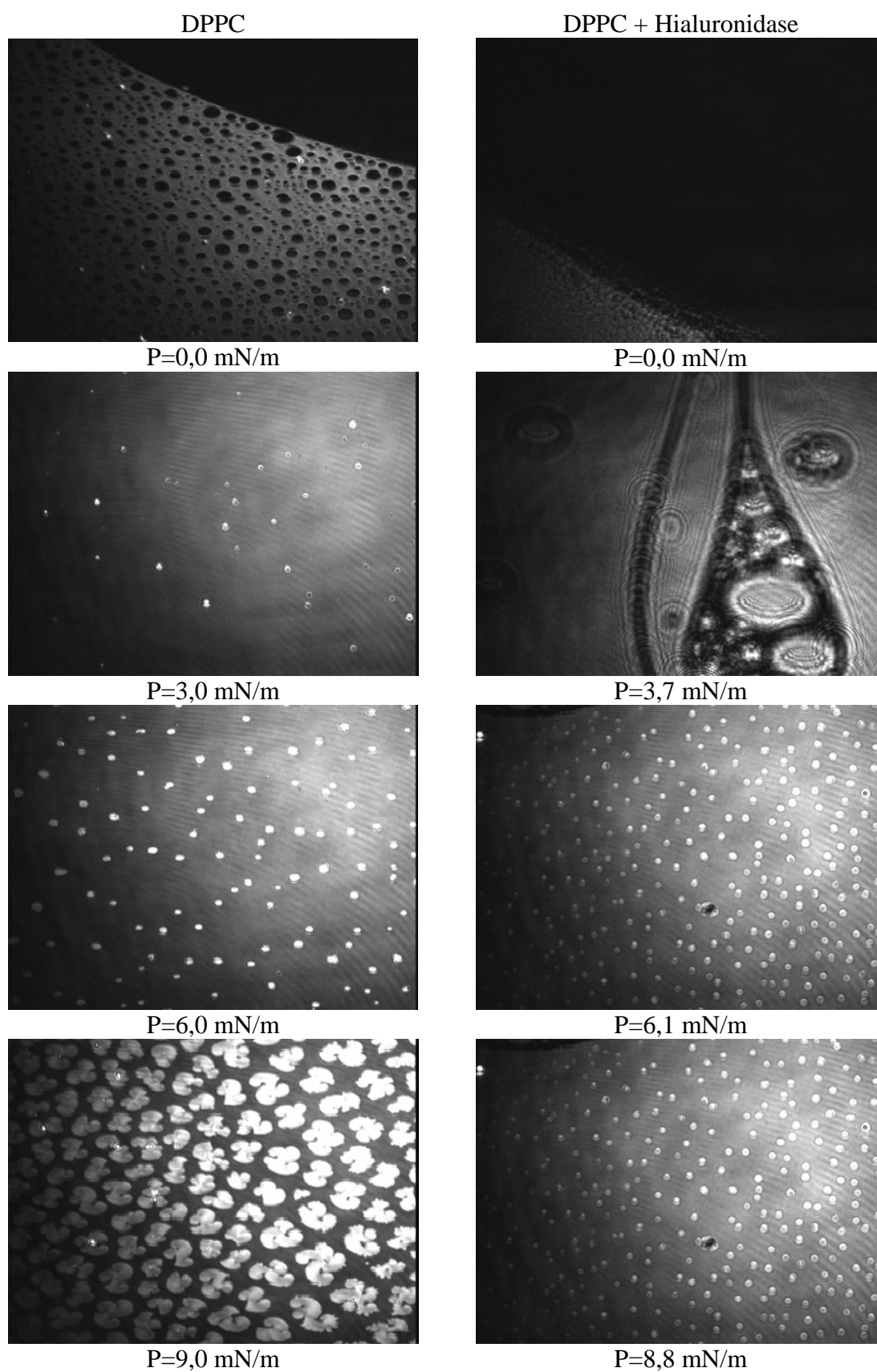
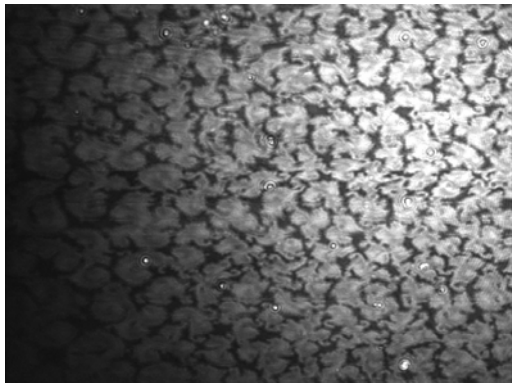


Figura 6.41 - Isoterma do GL (50 μ L de uma solução 0,545 mM) e do GL mais hialuronidase (30 μ L de uma solução 1mg /mL) a temperatura de 21°C.

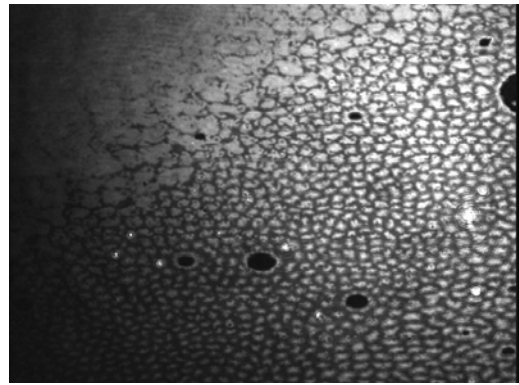
As imagens apresentadas na Figura 6.42 foram obtidas, primeiramente fazendo-se uma deposição de DPPC (40 μ L de uma solução a 0,545mM), obtendo-se imagens típicas de monocamadas de DPPC, seguida de etapas de compressão e descompressão. As imagens referentes às isotermas de hialuronidase na presença de DPPC foram obtidas após 150 minutos da injeção de 30 μ L de uma solução 1 mg / mL de hialuronidase. As isotermas mostram que a hialuronidase interfere na isoterma da DPPC (Figura 6.43). As imagens obtidas através de microscopia confirmam de maneira independente esta modificação (Figura 6.42). Observando-se as imagens correspondentes a pressão de 6,0 mN/m para a DPPC e de 8,8 mN/m para a hialuronidase na presença da DPPC, imagens semelhantes para pressões diferentes, pode-se dizer que a hialuronidase retarda a interação entre moléculas de DPPC. Estas

imagens indicam que as moléculas de hialuronidase migram para a superfície se acomodando entre as moléculas de DPPC.





P=12,0 mN/m



P=12,0 mN/m

Figura 6.42 - Imagens obtidas através da microscopia pelo ângulo de Brewster da monocamada de DPPC e DPPC mais hialuronidase nas pressões de 0 a 12 mN/m.

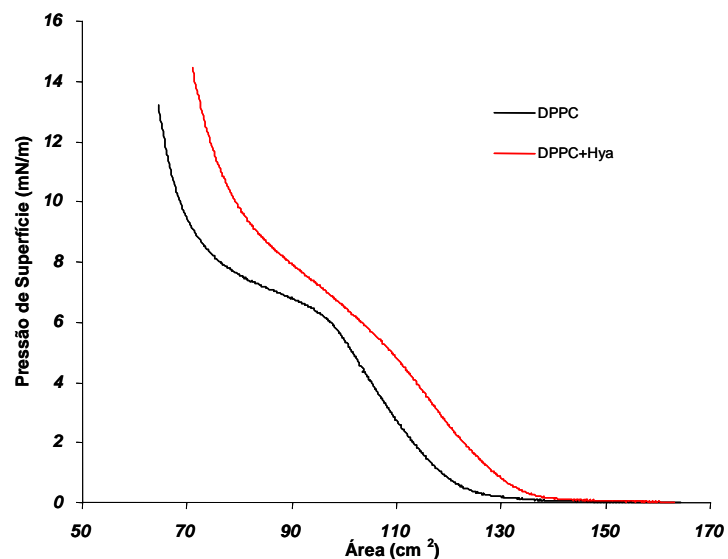


Figura 6.43 - Isoterma do DPPC (40 μ L de uma solução 0,545 mM) e do DPPC mais hialuronidase (30 μ L de uma solução 1mg /mL) a temperatura de 21°C.

A Figura 6.43 (curva preta) mostra uma isoterma típica da molécula de DPPC, na qual se observa a formação de um patamar em torno da pressão de 6 mN/m, corresponde ao estado de transição da fase líquido expandido para líquido condensado.

CAPÍTULO VII

Conclusões e Sugestões

7.1 Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho são pioneiros nos campos de separação e caracterização da hialuronidase bovina. Mostraram que a hialuronidase do testículo bovino pode ser separada utilizando-se a hidroxiapatita como adsorvente de proteínas contaminantes presentes no extrato. E que a enzima é uma molécula anfifílica, através do emprego da técnica de Langmuir para formação de filmes monomoleculares na interface ar / água.

Os resultados de caracterização do adsorvente mostram que a hidroxiapatita produzida apresenta uma deficiência em cálcio, uma vez que os resultados obtidos de análises de fluorescência de raio-X e XPS mostraram uma relação Ca/P (Ca/P = 1,59) menor que a razão da hidroxiapatita estequiométrica (Ca/P = 1,67). Os resultados da análise de BET mostram que o adsorvente é tipicamente mesoporoso ($20 < \bar{D} < 250$) com uma área de superfície de 43,5 m²/g. Pela análise de DRX pode-se concluir que a hidroxiapatita produzida é cristalina e apresenta-se como uma fase pura.

A carga superficial da hidroxiapatita, determinada através de análises de potencial zeta, mostrou o pI em torno de 7,0. Desta forma, abaixo deste pH a hidroxiapatita apresenta-se carregada positivamente, ou seja, podendo formar ligações eletrostáticas com outras moléculas através de seus sítios cálcio. Para valores de pHs acima deste, os sítios fosfato estão mais propícios a formar este tipo de ligação.

Os ensaios de adsorção para avaliar a influência do tempo na adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita mostraram que para os valores de pH na faixa de cinco até oito e para o valor de pH onze não há variação significativa na adsorção com relação ao tempo, em testes realizados para os tempos de uma e de vinte quatro horas. Porém

para os valores de pH de nove e dez observa-se um aumento de 42% e 75% respectivamente, para o tempo de contato de 24 horas, quando comparado com o tempo de 1 hora. O pH ótimo de adsorção da hialuronidase em hidroxiapatita é de 7,2, podendo ser observado em condições em que a relação da concentração inicial de proteína por grama de hidroxiapatita é igual a 0,4 (mg/L)/g.

As isotermas de adsorção da hialuronidase e da BSA em hidroxiapatita mostraram que a quantidade máxima de proteína adsorvida por grama de hidroxiapatita, foi $q_{\max} = 50 \text{ mg Hya/ g HAp}$ e 94 mg BSA/ g HAp e a constante de afinidade k foi de $9,5 \text{ L/g}$ e $382,7 \text{ L/g}$ para hialuronidase e BSA, respectivamente. Assim, pode-se concluir que a BSA adsorve em maior quantidade e mais fortemente na hidroxiapatita que a hialuronidase.

Os testes de adsorção de uma mistura binária contendo hialuronidase e hidroxiapatita apresentaram um pH ótimo de adsorção entre 6,0 e 7,0. Nestes valores de pH, praticamente todas as proteínas em solução foram adsorvidas. Nos ensaios de dessorção, uma pequena quantidade foi removida (3,9%), na etapa de lavagem. O emprego do tampão fosfato de potássio favoreceu a remoção de cerca de 95% das proteínas adsorvidas. Uma vez que as soluções de cloreto de cálcio não conseguiram remover de forma significativa as proteínas, percentual de remoção de 3,7%, pode-se concluir que ambas as proteínas estão adsorvidas nos sítios cálcio da hidroxiapatita.

Os resultados de atividade enzimática da hialuronidase após os processo de adsorção e dessorção, mostraram que a mesma permanece ativa, recuperando-se cerca de 78% da proteína ativa ao fim do ciclo de adsorção-dessorção.

A extração da hialuronidase do testículo bovino foi realizada com três diferentes agentes extratores, os quais apresentaram concentrações de proteína distintas. Os resultados obtidos mostraram que todos os extratos contêm a hialuronidase em concentrações equivalentes. Contudo estes valores são bem menores que o da atividade específica da enzima comercial (cerca de 1.800 vezes menor)

Os testes de adsorção e dessorção dos extratos diluídos mostram que as proteínas foram adsorvidas e que a dessorção com o tampão fosfato apresenta o mesmo

comportamento obtido para a dessorção da mistura binária. No entanto, na etapa de lavagem, a remoção de proteínas é praticamente nula, diferentemente dos resultados obtidos para a mistura binária. Com isto, pode-se concluir que nestas condições as proteínas adsorvem fortemente na hidroxiapatita. Quando a concentração molar do tampão fosfato é baixa, a recuperação da hialuronidase é razoável (0,0001 M e 0,001 M), aumentando a concentração da hialuronidase por proteínas totais nestas etapas de dessorção, de 151,5 U / g proteína para o extrato bruto, aumentando para 9458 U / g proteína para a remoção com 0,0001 M e 4652 U / g proteína para a remoção com 0,001 M do tampão fosfato.

Com base nos resultados de dessorção pode-se concluir que a hialuronidase adsorve nos sítios cálcio da hidroxiapatita, uma vez que não foi possível a sua remoção com solução de cloreto de cálcio. Porém, a hialuronidase apresentou o pH ótimo de adsorção em torno de 7,2, pH no qual a hidroxiapatita apresenta carga líquida de superfície praticamente nula, demonstrando que a hialuronidase não adsorve através de interações eletrostáticas. Este resultado corrobora que a ligação entre a hialuronidase e a hidroxiapatita é governada por interações secundárias.

A adsorção da proteína a partir do extrato bruto sem diluição mostrou que a hidroxiapatita apresenta uma grande capacidade na adsorção de cerca de 300 mg de proteína por grama de hidroxiapatita. Nestas condições, a dessorção realizada pela modificação de pH não é eficiente na remoção de todas as proteínas.

Os resultados mostram que apesar da hialuronidase do testículo bovino estar associada a membrana, esta associação não ocorre através de um grupamento lipídico. A modelagem tridimensional da proteína mostrou que a mesma apresenta áreas hidrofóbicas superficiais que são mais ou menos opostas ao sítio catalítico da enzima. Os resultados da formação de filmes de Langmuir evidenciam que a hialuronidase é uma molécula com propriedades anfifílicas, o que possibilita a formação de monocamada da proteína sozinha, ou ainda podendo-se avaliar a afinidade desta molécula por outras moléculas, anfifílicas ou não.

As isotermas de adsorção da hialuronidase na interface ar / água mostram, que a proteína apresenta-se estável na interface. Também foi possível quantificar que a área

média ocupada para cada molécula de hialuronidase apresenta 36 Nm^2 . Observou-se que somente a variação o pH da subfase não contribui para variação na forma de migração da enzima. Por outro lado quando a variação de pH ocorre na presença do sal, observa-se uma variação nas isotermas obtidas para os pHs de 7,2 e 8,0, devido a um princípio de desnaturação da molécula, pois nestes pHs a atividade enzimática não é muito elevada quando comparado com o pH ótimo de atividade.

Observou-se que as isotermas da hialuronidase na interface ar / água sofrem influência quanto à forma de deposição. Quando a proteína é depositada de uma única vez, há um aumento da área em relação à mesma quantidade depositada por partes. Este resultado mostra que nos pH 6,2, 7,2 e 8,0 parte da proteína depositada na interface não apresenta-se muito estável e após sucessivas compressões e descompressões, uma pequena quantidade da proteína não permanece na interface. Este resultado ainda mostra que para o pH 5,3 (pH ótimo de atividade) a proteína apresenta-se muito estável na interface.

Estudos da afinidade da hialuronidase pelo N-Acetil glucosamina (NAC), mostram que a hialuronidase não apresenta afinidade significativamente forte, capaz de remover a molécula da proteína da superfície. Por outro lado, esta interação pode estar ocorrendo, de forma que a enzima arraste a molécula de NAC para a interface, sem que a molécula do NAC ocasione mudanças na pressão de superfície. Os estudos realizados diretamente com o ácido hialurônico mostraram que a interação entre a hialuronidase e seu substrato é forte o suficiente para alterar a monocamada formada. O aumento da pressão observado pode ser devido a pedaços da cadeia do ácido hialurônico, que durante o processo são atraídos pela proteína para a interface, ou devido a uma mudança na estrutura da proteína durante a migração do ácido para interface ar / água, sofrendo um aumento da área ocupada por molécula.

As isotermas da hialuronidase na presença de uma camada lipídica, mostraram que a proteína apresenta uma força motriz forte, que faz com que a proteína permanecer na interface, mesmo na presença de moléculas fortemente anfífilas. Resultados que são confirmados com as imagens da microscopia pelo ângulo de Brewster. A microscopia mostra que a proteína se acomoda entre as moléculas de DPPC. A microscopia ainda mostra que a monocamada da proteína apresenta certa organização

na pressão de 4,0 mN/m, ponto onde a molécula passa do estado líquido condensado para o estado sólido.

Os ensaios de FTIR mostraram que há um aumento de estruturas do tipo folhas- β , com o aumento do pH, e que provavelmente este aumento ocorre em detrimento da diminuição de estruturas do tipo α -hélice. Em pH 8,0, as diferenças envolvem 2-3 % dos aminoácidos presentes na proteína, o que significa que em torno de 11 aminoácidos estão presentes na formação de estruturas do tipo folhas- β .

Ensaio complementares de adsorção mostraram que é possível purificar a hialuronidase do testículo bovino utilizando a hidroxiapatita, empregando como estratégia a não adsorção da proteína no adsorvente. Utilizando-se esta estratégia obteve-se um purificado onde a atividade é 10 vezes menor que a encontrada para a proteína comercial.

7.2 Sugestões

Realização de estudos mais detalhados sobre a atividade enzimática da hialuronidase na interface ar / água, procurando quantificar esta atividade.

Realização de testes utilizando outros lipídios e fosfolipídeos, constituintes da membrana plasmáticas, para a formação de monocamadas de hialuronidase, visando uma reconstituição passo a passo da membrana.

Aprofundar os estudos de separação da hialuronidase, otimizando a etapa de precipitação dos contaminantes do extrato bruto. Estudar a influência de variáveis como concentração, massa de adsorvente, na etapa de adsorção dos contaminantes em hidroxiapatita. Estudar o emprego da hidroxiapatita como adsorvente da hialuronidase em uma etapa final no processo de purificação.

CAPÍTULO VIII

Referências Bibliográficas

- ABDALLAH, J.; KERN, R.; MALKI, A.; ECKEY, V.; RICCHARME, G.; 2006, "Cloning, Expression, and Purification of the General Stress Protein YhbO from *Escherichia Coli*", *Protein Expression and Purification*, v. 47, n. 2, p. 455-460.
- ABOUGHALIA, A. H.; 2006; "Elevation of Hyaluronidase-1 and Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 Helps Select Bladder Cancer Patients at Risk of Invasion"; *Archives of Medical Research*, v. 37, Issue 1, pp. 109-116
- ADAMS, J. R. J.; SANDER, G.; BYERS, S.; 2006; "Expression of Hyaluronan Synthases and Hyaluronidases in the MG63 Osteoblast Cell Line"; *Matrix Biology*, v. 25, Issue 1, pp. 40-46
- AKAZAWA, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIDA, M.; MATSUSHIMA, K.; MINOSHIMA, H.; SUGIMURA, H.; KANNO, T.; HORIUHCHI, J.; 1999; "Adsorption of Bovine Serum Albumin Onto TiO₂ Particles"; *Journal of Chromatography A*, v. 862, pp. 217-220
- ALEXANDRE, S.; DUBREUIL, N.; FIOL, C.; LAIR, D.; SOMMER, F.; DUC, T. M.; VALLETON J. M.; 1997; "Analysis of the Dynamic Organization of Mixed Protein/Patty Acid Langmuir Films"; *Thin Solid Films*, v. 293, Issues 1-2, pp. 295-298
- ALVAREZ, C.; BERTORELLO, H.; STRUMIA, M.; 1996; "Preparation and Characterization of New Biospecific Adsorbents with Fatty Acids as Ligands, Usable to Retain Bovine Serum Albumin"; *Polymer*, v. 37, pp. 3715-3719
- ALWITRY, A.; CHAUDHARY, S.; GOPEE, K.; BUTLER, T. K. H.; HOLDEN, R.; 2002; "Effect of Hyaluronidase on Ocular Motility in Sub-Tenon's Anesthesia"; *Journal of Cataract Refract Surg*, v. 28, pp. 1420-1423

- AOKI, Y; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; 2005; "Role of the Mucous/Glycocalyx Layers in Insulin Permeation Across the Rat Ileal membrane"; *International Journal of Pharmaceutics*, v. 297, Issues 1-2, pp. 98-109
- ARONSON, N. N. Jr., DAVIDSON, E. A.; 1967; "Lysosomal Hyaluronidase from Rat Liver"; *The Journal of Biological Chemistry*, v. 242, No. 3, pp. 437-440
- AROSARENA, O. A.; COLLINS, W. L.; 2005, "Bone Regeneration in the Rat Mandible with Bone Morphogenetic Protein-2: A Comparison of Two Carriers", *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, v. 132, n. 4, p. 592-597.
- ASTÉRIOU, T.; VINCENT, J. C.; TRANCHEPAIN F.; DESCHREVEL B.; 2006; "Inhibition of Hyaluronan Hydrolysis Catalysed by Hyaluronidase at High Substrate Concentration and Low Ionic Strength"; *Matrix Biology*, v. 25, Issue 3, pp. 166-174
- AZEREDO, L. A. I.; LEITE, S. G. F.; FREIRE, D. M. G.; BENCHETRIT, L. C.; COELHO, R. R. R.; 2001; "Proteases from Actinomycetes Interfere in Solid Plate Assays of Hyaluronidase Activity"; *Journal of Microbiological Methods*, v. 45, pp. 207-212
- BALASUBRAMANIAN, K. A.; ABRAHAM, D.; BACHHAWAT, B. K.; 1975; "Partial Purification of Testicular Hyaluronidase Using Concanavalin A-Sepharose Affinity Chromatography "; *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, v. 12, pp. 204-206
- BARRETT, C.P.; JOYNER, L.G.; HALLEND, P. P.; 1951; *Journal of American Chemical Society*, v. 75, pp. 373
- BENIASH, E.; SIMMER, J. P.; MARGOLIS, H. C.; 2005, "The Effect of Recombinant Mouse Amelogenins on The Formation and Organization of Hydroxyapatite Crystals in Vitro", *Journal of Structural Biology*, v. 149, n. 2, p. 182-190.

- BERZINA, T. S.; TROITSKY, V. I.; PETRIGLIANO, A.; ALLIATA, D.; TRONIN, A. Y. U.; NICOLINI, C.; 1996; "Langmuir-Blodgett Films Composed of Monolayers of Amphiphilic Molecules and Adsorbed Soluble Proteins"; *Thin Solid Films*, v. 284-285, pp. 757-761
- BHERING, D. L.; SANTOS, S. M.; RESENDE, N. S.; SALIM, V. M. M.; ROSSI A. M.; 1998; "Síntese e Caracterização de Carboapatitas do Tipo B"; 120º Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Cd Rom T335
- BLODGETT, K.; 1955; "Irving Langmuir 1881–1957", *Vacuum*, v. 5, pp. 1-3
- BLUNDELL, C. D.; ALMOND, A.; 2006; "Enzymatic and Chemical Methods for the Generation of Pure Hyaluronan Oligosaccharides with Both Odd and Even Numbers of Monosaccharide Units"; *Analytical Biochemistry*, v. 353, Issue 2, pp. 236-247
- BOIX, T.; GOMEZ-MORALES, J.; TORRENT-BURGUES, J.; MONFORT, A.; PUIGDOMENECH, P.; RODRIGUEZ-CLEMENTE, R.; 2005, "Adsorption of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein rhBMP-2m onto Hydroxyapatite", *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 99, n. 5, p. 1043-1050.
- BOOKBINDER, L. H.; HOFER, A.; HALLER, M. F.; ZEPEDA, M. L.; KELLER, G. A.; LIM, J. E.; EDGINGTON, T. S.; SHEPARD, H. M.; PATTON, J. S.; FROST, G. I.; 2006; "A Recombinant Human Enzyme for Enhanced Interstitial Transport of Therapeutics"; *Journal of Controlled Release*, v. 114, Issue 2, pp. 230-241
- BORDERS, C. L. JR.; RAFTERY, M. A.; 1968; "Purification and Partial Characterization of Testicular Hyaluronidase"; *Journal of Biological Chemistry*, v. 243, No 13, pp. 3756-3762
- BOULLANGER, P.; SANCHO-CAMBORIEUX, M-R.; BOUCHU, M-N.; MARRON-BRIGNONE, L.; MORELIS, R-M.; COULET, P. R.; 1997; "Synthesis and

Interfacial Behavior of Three Homologous Glycero Neoglycolipids with Various Chain Lengths"; *Chemistry Physical Lipids* 90, 63-74

BOZEC, L.; GROOT, J. D.; ODLYHA, M.; NICHOLLS, B.; NESBITT, S.; FLANAGAN, A.; HORTON, M.; 2005, "Atomic Force Microscopy of Collagen Structure in Bone and Dentine Revealed by Osteoclastic Resorption", *Ultramicroscopy*, v. 105, n. 1-4, p. 79-89.

BRANDES, N.; WELZEL, P. B.; WERNER, C.; KROH, L. W.; 2006, "Adsorption-Induced Conformational Changes of Proteins onto Ceramic Particles: Differential Scanning Calorimetry and FTIR Analysis", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 299, n. 1, p. 56-69.

BRIGNONE, L. M.; MORÉLIS, R. M.; BLUM, L. J.; COULET, P. R.; 1996; "Behaviour of Firefly Luciferase Associated with Langmuir-Blodgett Films"; *Thin Solid Films*, v. 284-285, pp. 784-788

CARLÉN, A.; ELIASSON, L.; ARONSSON, G.; BIRKHED, D.; 2004, "Human Minor and Major Gland Saliva Proteins and Ability to Mediate Actinomyces naeslundii Adherence", *Archives of Oral Biology*, v. 49, n. 3, p. 177-181.

CASELI, L.; ZANIQUELLI, M. E. D.; FURRIEL, R. P. M.; LEONE, F. A.; 2002; "Enzymatic Activity of Alkaline Phosphatase Adsorbed on Dimyristoylphosphatidic Acid Langmuir-Blodgett Films"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 25, Issue 2, pp. 119-128

CHENG, D.; KELLEY, R. W.; CAWLEY, G. F.; BACKES, W. L.; 2004, "High-Level Expression of Recombinant Rabbit Cytochrome P450 2E1 in Escherichia coli C41 and its Purification", *Protein Expression and Purification*, v. 33, n. 1, p. 66-71.

CHENG, X.; FILIAGGI, M.; ROSCOE, S. G.; 2004, "Electrochemically Assisted Co-Precipitation of Protein with Calcium Phosphate Coatings on Titanium Alloy", *Biomaterials*, v. 25, n. 23, p. 5395-5403.

- CHERR, G. N.; MEYERS, S. A.; YUDIN, A. I.; VANDEVOORT, C. A.; MYLES, D. G.; PRMAKOF, P.; OVERSTREET, J. W.; 1996; "The PH-20 Protein in Cynomolgus Macaque Spermatozoa: Identification of Two Different Forms Exhibiting Hyaluronidase Activity"; *Developmental Biology*, v. 175, pp. 142-153
- CHOI, S. I.; PARK, S. R.; HEO T. R.; 2006; "Matrix Degradation Inhibitory Effect of *Schisandra Fructus* on Human Articular Cartilage and Chondrocytes"; *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, Issue 2, pp. 279-284
- CHOW, G.; KNUDSON C. B.; KNUDSON, W.; 2006; "Expression and Cellular Localization of Human Hyaluronidase-2 in Articular Chondrocytes and Cultured Cell Lines"; *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 14, Issue 9, pp 849-858
- CHRISTOPOULOS, A.; PAPAGEORGAKOPOULOU, N.; THEOCHARIS, D. A.; MASTRONIKOLIS, N. S.; PAPADAS, T. A.; VYNIOS, D. H.; 2006; "Hyaluronidase and CD44 Hyaluronan Receptor Expression in Squamous Cell Laryngeal Carcinoma"; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1760, Issue 7, pp. 1039-1045
- CLAESSON, M.; BLOMBERG, E.; FRÖBERG, J. C.; NYLANDER, T.; ARNEBRANT, T.; 1995; "Protein Interactions at Solid Surfaces"; *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 57, pp. 161-227
- COLBROOK, R.; RICHARDSON, T.; POULTER, M. W.; ROBERTS, G. G.; POLYWKA, M. E. C.; DAVIES, S. G.; 1990; "Pyroelectric Organo-ruthenium Langmuir-Blodgett Superlattices", *Materials Science and Engineering B*, v. 7, N° 3, pp. 189-193
- CONDER, J. R.; HAYEK, B. O.; 2000; "Adsorption Kinetics and Equilibria of Bovine Serum Albumin on Rigid Ion-Exchange and Hydrophobic Interaction Chromatography Matrices in a Stirred Cell"; *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, pp. 215-223

- CONSTANTINO, C. J. L.; DHANABALAN, A.; CURVELO, A. A. S.; OLIVEIRA, O. N.; 1998; "Preparation and Characterization of Composite LB Films of Lignin and Cadmium Stearate" *Thin Solid Films*, v. 327-329, pp. 47-51
- CSÓKA, A. B.; FROST, G. I.; STERN, R.; 2001; "The Six Hyaluronidase-Like Genes in the Human and Mouse Genomes"; *Matrix Biology*, v. 20, pp. 499-508
- CSÓKA, T. B.; FROST, G. I.; WONG, T.; STERN, R.; 1997; "Purification and Microsequencing of Hyaluronidase Isozymes from Human Urine"; *Analytical Biochemistry*, v. 229, pp. 35-41
- DAVID, L.; DULONG, V.; CERF, D.; CHAUZY, C.; NORRIS, V.; DELPECH, B.; LAMACZ, M.; VANNIER, J. P.; 2004 "Reticulated Hyaluronan Hydrogels: a Model for Examining Cancer Cell Invasion in 3D"; *Matrix Biology*, v. 23, Issue 3, pp. 183-193
- DeLEON, P. A. M.; 2006; "Epididymal SPAM1 and Its Impact on Sperm Function"; *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 250, Issues 1-2, pp. 114-121
- DIDOLKAR, A. K.; PATEL, P. B.; ROYCHOWDHURY, D.; 1980 "Effect of Aspirin on Spermatogenesis in Mature and Immature Rats" *International Journal Of Andrology*, v. 3, N° 5, pp. 585-593
- DUBREUIL, N.; ALEXANDRE, S.; LAIR, D.; SOMMER, F.; DUC, T. M.; VALLETON, J. M.; 1998; "Scanning Force Microscopy of Mixed Fatty Acid/Protein Langmuir-Blodgett Films Transferred on Muscovite, a Model of their Organization"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 11, Issues 1-2, pp. 95-102
- DUBROVSKY, T.; TRONIN, A.; DUBROVSKAYA, S.; VAKULA, S.; NICOLINI, C.; 1995; "Immunological Activity of IgG Langmuir Films Oriented by Protein A Sublayer"; *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 23, Issue 1, pp. 1-7

- DUBROVSKY, T.; TRONIN, A.; NICOLINI, C.; 1995; "Determination of Orientation of the IgG Molecules in Immobilized Langmuir Monolayers by Means of Binding with Fragment Specific Anti-Immimoglobin Antibodies"; *Thin Solid Films*, v. 257, Issue 1, pp. 130-133
- EL KIRAT K.; CHAUVET, J-P.; ROUX, B.; BESSON, F.; 2004; "*Streptomyces chromofuscus* phospholipase D Interaction with Lipidic Activators at the Air–Water Interface." *Biochim Biophys Acta*; v.1661, pp. 144-153
- EL KIRAT, K.; BESSON, F.; PRIGENT, A-F.; CHAUVET, J-P.; ROUX, B.; 2002; "Role of Calcium and Membrane Organization on Phospholipase D Localization and Activity. Competition Between a Soluble and Insoluble Substrate". *Journal Biological Chemistry*; v.277, pp. 21231-21236
- EL KIRAT, K.; PRIGENT, A-F.; CHAUVET, J-P.; ROUX, B.; BESSON, F.; 2003; "Transphosphatidylation Activity of *Streptomyces chromofuscus* Phospholipase D in Biomimetic Membranes". *Eurpe Journal Biochemistry*; v. 270, pp. 4523-4530
- EROKHIN, V.; CARRARA, S.; GUERZONI, S.; GHISELLINI P.; NICOLINI C.; 1998; "Synchrotron study of Heat Induced Order in Protein Langmuir–Blodgett Films"; *Thin Solid Films*, v. 327-329, pp. 636-638
- FARRELL, A. M.; TAYLOR, D.; HOLLAND, K. T.; 1995; "Cloning, Nucleotide Sequence Determination and Expression of the *Staphylococcus aureus* Hyaluronate Lyase Gene"; *FEMS Microbiology Letters*, v. 130, pp. 81-85
- FELDMAN, C.; COCKERAN, R.; JEDRZEJAS, M. J.; MITCHELL, T. J.; ANDERSON, R.; 2006; "Hyaluronidase Augments Pneumolysin-Mediated Injury to Human Ciliated Epithelium"; *International Journal of Infectious Diseases*
- FENG, B.; CHEN, J.; ZHANG, X.; 2001; "Interaction of Calcium and Phosphate in Apatite Coating on Titanium with Serum Albumin"; *Biomaterials*; v. 23, N° 12, pp. 2499-2507

- FENG, L.; ANDRADE, J. D.; 1994; "Protein Adsorption on Low-Temperature Isotropic Carbon: II – Effects of Surface Charge of Solids"; *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 166, i. 2, pp. 419-426
- FISZER-SZAFARZ, B.; 1984;"Hyaluronidase Polymorphism Detected by Polycrylamide Gel Electrophoresis Application to Hyaluronidases from Bacteria, Slime Molds, Bee and Snake Venoms, Bovine Testes, Rat Liver Lysosomes, and Human Serum"; *Analytical Biochemistry*, v. 143, pp. 76-81
- FLINT, E. J.; DE GIOVANNI, J.; CADIGAN, P. J.; LAMB, P.; PENTECOST, B. L.; 1982; "Effect of GL Enzyme (a Highly Purified form of Hyaluronidase) on Mortality After Myocardial Infarction"; *Lancet*, v. 1, N^o 8277, pp. 871-874
- FREITAS, R. G.; NOBRE, Y. D.; DEMARCHI, G. T. S.; HACHUL, M.; MACEDO, A. JR.; SROUGI, M.; ORTIZ, V.; 2006; "Topical Treatment for Phimosis: Time Span and Other Factors Behind Treatment Effectiveness"; *Journal of Pediatric Urology*, v. 2, Issue 4, pp. 380-385
- FROST, G. I.; STERN, R.; 1997; "A Microtiter-based Assay for Hyaluronidase Activity Not requiring Specialized Reagents"; *Analytical Biochemistry*, v. 251, pp. 263-269
- FUJII, E.; OHKUBO, M.; TSURU, K.; HAYAKAWA, S.; OSAKA, A.; KAWABATA, K.; BONHOMME, C.; BABONNEAU, F.; 2006, "Selective Protein Adsorption Property and Characterization of Nano-Crystalline Zinc-Containing Hydroxyapatite", *Acta Biomaterialia*, v. 2, n. 1, p. 69-74.
- GELHAUSEN, M. ; BESSON, F. ; CHIERICI, S. ; LAFONT, D. ; BOULLANGER, P. ; ROUX B.; 1998; "Lectine-induced Recognition of Liposomes Containing Neoglycolipids. Influence of their Lipidic Anchor and Spacer Length. " *Colloid Surface B*. v. 10, pp. 395-404

- GIACOMELLI, C. E.; AVENA, M. J.; DE PAULI, C. P.; 1997; "Adsorption of Bovine Serum Albumin onto TiO₂ Particles"; *Journal of Colloid and Interface*, v. 188, pp. 387-395
- GINEBRA, M. P.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A.; 2004, "Effect of the Particle Size on the Micro and Nanostructural Features of a Calcium Phosphate Cement: A Kinetic Analysis", *Biomaterials*, v. 25, n. 17, p. 3453-3462.
- GINEBRA, M. P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J. A.; 2006, "Calcium Phosphate Cements as Bone Drug Delivery Systems: A Review", *Journal of Controlled Release*, v. 113, n. 2, p. 102-110.
- GIRARD-EGROT, A. P.; GODOY, S.; BLUM, L. J.; 2005; "Enzyme Association with Lipidic Langmuir-Blodgett Films: Interests and Applications in Nanobioscience"; *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 116, Issues 1-3, pp. 205-225
- GITTENS, S. A.; BAGNALL, K.; MATYAS, J. R.; LÖBENBERG, R.; ULUDA, H.; 2004, "Imparting Bone Mineral Affinity to Osteogenic Proteins Through Heparin-Bisphosphonate Conjugates", *Journal of Controlled Release*, v. 98, n. 2, p. 255-268.
- GMACHL, M.; SAGAN, S.; KETTER, S.; KREIL, G.; 1993; "The Human Sperm Protein PH-20 has Hyaluronidase Activity"; *Febs Letters*, v. 336, No 3, pp. 545-548
- GOLD, E. W.; 1982; "Purification and Properties of Hyaluronidase from Human Liver"; *Journal Biochemistry*, v. 205, pp. 69-74
- GONÇALVES, S. B.; 2002; "Adsorção de Proteínas em Hidroxiapatita"; Tese de Mestrado, PEQ/COPPE/UFRJ; Rio de Janeiro, 97 pp.
- GORBUNOFF, M. J.; TIMASHEFF, S. N.; 1984; "The Interaction of Proteins with Hydroxyapatite III Mechanism"; *Analytical Biochemistry*, v. 136, pp. 440-445

- GORDJESTANI, M.; DERMAUT, L.; RIDDER, L. D.; THIERENS, H.; WAELE, P. D.; WILLY, W. D. L.; BOSMAN, F.; 2005, "Osteopontin and Bone Metabolism: A Histology and Scintigraphy Study in Rats", *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 34, n. 7, p. 794-799.
- GUILLE, M. M. G.; MOSSER, G.; HELARY, C.; EGLIN, D.; 2005, "Bone Matrix Like Assemblies of Collagen: From Liquid Crystals to Gels and Biomimetic Materials", *Micron*, v. 36, n. 7-8, p. 602-608.
- GUO, C. X.; BOULLANGER, P.; JIANG L.; LIU, T.; 2007; "Colorimetric Detection of WGA in Carbohydrate-Functionalized Polydiacetylene Langmuir–Schaefer Films", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 293, n. 1-3, pp. 152-156
- GUPTA, G. S.; GOLDBERG, E.; 1981; "Isolation, Properties, Immunological Specificity and Localization of Mouse Testicular Hyaluronidase"; *Biochimical et Biophysica Acta*, v. 657, pp. 364-373
- HANSEN, F. K.; MYRVOLD, R.; 1995; "The Kinetics of Albumin Adsorption to the Air/Water Interface Measured by Automatic Axisymmetric Drop Shape Analysis"; *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 176, Issue 2, pp. 408-417
- HELIOTIS, M.; LAVERY, K. M.; RIPAMONTI, U.; TSIRIDIS, E.; SILVIO, L. D.; 2006, "Transformation of a Prefabricated Hydroxyapatite/Osteogenic Protein-1 Implant into a Vascularised Pedicled Bone Flap in The Human Chest", *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 35, n. 3, p. 265-269.
- HEYN, S. P. ; TILLMANN, R. W. ; EGGER, M. ; GAUB, H. E.; 1991; "A Miniaturized Micro-Fluorescence Film Balance for Protein-Containing Lipid Monolayers Spread from a Vesicle Suspension". *Journal Biochemistry Biophysics Methods* v. 22, pp. 145-158

- HO, D.; CHANG, S.; MONTEMAGNO, C. D.; 2006; "Fabrication of Biofunctional Nanomaterials via *Escherichia coli* OmpF Protein Air/Water Interface Insertion/Integration with Copolymeric Amphiphiles"; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 2, Issue 2, pp. 103-112
- HONDA, F.; HONDA, H.; KOISHI, M.; MATSUNO, T.; 1998;"Properties of Cattle Bone Powder-Coated Composite Particles as High-Performance and Open Column Liquid Chromatographic Column Packings"; *Journal of Chromatography A*, v. 813, pp. 21-33
- HOVINGH, P.; LINKER, A.; 1999; "Hyaluronidase Activity in Leeches (Hirudinea)"; *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 124, pp. 319-326
- HYNES, W. L.; DIXON, A. R.; WALTON, S. L.; ARIDGIDES, L. J.; 2000; "The Extracellular Hyaluronidase Gene (*hyla*) of *Streptococcus Pyogenes*"; *FEMS Microbiology Letters*, v. 184, pp. 109-112
- HYNES, W. L.; WALTON, S. L.; 2000; "Hyaluronidase of Gram-positive Bacteria"; *FEMS Microbiology Letters*, v. 183, pp. 201-207
- IKEGAMI-KAWAI, M.; TAKAHASHI, T.; 2002; "Microanalysis of Hyaluronan Oligosaccharides by Polyacrylamide Gel Electrophoresis and its Application to Assay of Hyaluronidase Activity"; *Analytical Biochemistry*, v. 311, pp. 157-165
- JALOTA, S.; BHADURI, S. B.; TAS, A. C.; Osteoblast Proliferation on Neat and Apatite-like Calcium Phosphate-Coated Titanium Foam Scaffolds", *Materials Science and Engineering: C*, v. In Press, Corrected Proof.
- JEONG, K. Y.; LEE, J.; LEE, I.-Y.; HONG, C.-S.; REE, H.-I.; YONG, T.-S.; 2004, "Expression of Tropomyosin from *Blattella Germanica* as a Recombinant Non-fusion Protein in *Pichia Pastoris* and Comparison of its IgE Reactivity with its Native Counterpart", *Protein Expression and Purification*, v. 37, n. 2, p. 273-278.

- JIN, M.; ROSARIO, W.; WATLER, E.; CALHOUN, D. H.; 2004, "Development of a Large-Scale HPLC-Based Purification for the Urease from *Staphylococcus Leei* and Determination of Subunit Structure", *Protein Expression and Purification*, v. 34, n. 1, p. 111-117.
- JOY, M. B.; DODGSON, K. S.; OLAVESSEN, A. H.; GACESA, P.; 1985; "The Purification and Some Properties of Pig Liver Hyaluronidase"; *Biochemical et Biophysical Acta*, v. 838, pp. 257-263
- KAMAKURA, S.; SASANO, Y.; SUZUKI, O.; 2005, "Synthetic Octacalcium Phosphate (OCP) is an Effective Scaffold to Regenerate Bone", *International Congress Series Interface Oral Health Science - Proceedings of the International Symposium for Interface Oral Health, held in Sendai, Japan*, v. 1284, p. 290-295.
- KANDORI, K.; MIYAGAWA, K.; ISHIKAWA, T.; 2004, "Adsorption of Immunoglobulin G onto Various Synthetic Calcium Hydroxyapatite Particles", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 273, n. 2, p. 406-413.
- KANDORI, K.; SHIMIZU, T.; YASUKAWA, A.; ISHIKAWA, T.; 1995; "Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Synthetic Calcium Hydroxyapatite: Influence of Particle Texture"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 5, pp. 81-87
- KASS, E.; SEASTONE, C.; 1944; "The Role of the Mucoïd Polysaccharide (Hyaluronic Acid) in the Virulence of Group a Hemolytic *Streptococci*"; *Journal of Experimental Medicine*, v. 79, pp. 319
- KAWAI, T.; OHTSUKI, C.; KAMITAKAHARA, M.; MIYAZAKI, T.; TANIHARA, M.; SAKAGUCHI, Y.; KONAGAYA, S.; 2004, "Coating of an Apatite Layer on Polyamide Films Containing Sulfonic Groups by a Biomimetic Process", *Biomaterials*, v. 25, n. 19, p. 4529-4534.

- KEMENY, D. M.; DALTON, N.; LAWRENCE, A. J.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A.; 1984; "The Purification and Characterisation of Hyaluronidase from the Venom of the Honey Bee"; *Europe Journal Biochemical*, v. 139, pp. 217-223
- KILIAN, O.; FUHRMANN, R.; ALT, V.; NOLL, T.; COSKUN, S.; DINGELDEIN, E.; SCHNETTLER, R.; FRANKE, R. P.; 2005, "Plasma Transglutaminase Factor XIII Induces Microvessel Ingrowth into Biodegradable Hydroxyapatite Implants in Rats", *Biomaterials*, v. 26, n. 14, p. 1819-1827.
- KIM, H.-W.; KIM, H.-E.; SALIH, V.; 2005, "Stimulation of Osteoblast Responses to Biomimetic Nanocomposites of Gelatin-Hydroxyapatite for Tissue Engineering Scaffolds", *Biomaterials*, v. 26, n. 25, p. 5221-5230.
- KOHL, A. C.; KERR, R. G.; 2004, "Identification and Characterization of the Pseudopterisin Diterpene Cyclase, Elisabethatriene Synthase, from the Marine Gorgonian, *Pseudopterogorgia Elisabethae*", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 424, n. 1, p. 97-104.
- KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; MIYAJI, F.; TAKADAMA, H.; MIYAZAKI, T.; 1999; "Ceramic-Metal and Ceramic-Polymer Composites Prepared by a Biomimetic Process"; *Composites part A: applied science and manufacturing*, v. 30, pp 405-409
- KREIL, G; 1995 "Hyaluronidases--a Group of Neglected Enzymes"; *Protein Science: a Publication Of The Protein Society*, v. 4, N^o 9, pp. 1666-1669
- KRISHNAPILLAI, A. M.; TAYLOR, K. D. A.; MORRIS, A. E. J.; QUANTICK, P. C.; 1999; "Extraction and Purification of Hyaluronoglucosidase (EC 3.2.1.35) from Norway Lobster (*Nephrops Norvegicus*)"; *Food Chemistry*, v. 65, pp. 359-365
- KSV Instruments LTD; "Langmuir and Langmuir – Blodgett Films what and how?", Applocation Note 107, www.ksvltd.fi, visitado em 12/03/2004

- KUMTA, P. N.; SFEIR, C.; LEE, D.-H.; OLTON, D.; CHOI, D.; 2005, "Nanostructured Calcium Phosphates for Biomedical Applications: Novel Synthesis and Characterization", *Acta Biomaterialia*, v. 1, n. 1, p. 65-83.
- KUPPERMANN, B. D.; THOMAS, E. L.; SMET, M; D.; GRILLONE, L. R.; Vitrase for Vitreous Hemorrhage Study Groups; 2005; "Safety Results of Two Phase III Trials of an Intravitreal Injection of Highly Purified Ovine Hyaluronidase (Vitrace®) for the Management of Vitreous Hemorrhage"; *American Journal of Ophthalmology*, v. 140, Issue 4, pp 585.e1-585.e15
- KUPPERMANN, B. D.; THOMAS, E. L.; SMET, M; D.; GRILLONE, L. R.; Vitrase for Vitreous Hemorrhage Study Groups; 2005; "Pooled Efficacy Results From Two Multinational Randomized Controlled Clinical Trials of a Single Intravitreal Injection of Highly Purified Ovine Hyaluronidase (Vitrace®) for the Management of Vitreous Hemorrhage"; *American Journal of Ophthalmology*, v. 140, Issue 4, pp. 573-584
- KWON, B.; JENIS, L. G.; 2005, "Carrier Materials for Spinal Fusion", *The Spine Journal*, v. 5, n. 6, Supplement 1, p. S224-S230.
- LAIRD, M. W.; ZUKAUSKAS, D.; JOHNSON, K.; SAMPEY, G. C.; OLSEN, H.; GARCIA, A.; KARWOSKI, J. D.; COOKSEY, B. A.; CHOI, G. H.; ASKINS, J.; 2004, "Production and Purification of Bacillus Anthracis Protective Antigen from Escherichia Coli", *Protein Expression and Purification*, v. 38, n. 1, p. 145-152.
- LAMARCHE, F. ; TÉCHY, F. ; AGHION, J. ; LEBLANC, R. M.; 1987; "Surface Pressure, Surface Potential and Ellipsometric Study of Cytochrome c Binding to Dioleoylphosphatidylcholine Monolayer at the Air-Water Interface". *Colloid Surface* v.30, pp. 209-222
- LAURENT, T. C.; FRASER, J. R.; 1992 "Hyaluronan"; *The FASEB Journal: Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology*, v. 6, N° 7, pp. 2397-2404

- LAZIÉ, S.; KATANIÉ- PROPOVIÉ, J.; ZEC, S.; MILJEVIÉ, N.; 1996; "Properties of Hydroxyapatite Crystallized from High Temperature Alkaline Solutions"; *Journal of Crystal Growth*, v. 165, pp. 124-128
- LI, J.; DU, Y.; BOULLANGER, P.; JIANG, L.; 1999; "The Folding and Enzymatic Activity of Glucose Oxidase in the Glycolipid Matrixes of Different Charges"; *Thin Solid Films*, v. 352, Issues 1-2, pp. 213-217
- LIPP, M. M.; LEE, K. Y. C.; ZASADZINSKI, J. A.; WARING, A. J.; 1997; "Solving Medical Problems with Chemical Engineering", American Chemical Society, pp 42-57
- LIU, Z.; YIN, G. ; ZHAN, J. ; DING, F. ; YUAN, N.; 2001; "Impacts of the Surface Charge Property on Protein Adsorption on Hydroxyapatite". *Chemical Engineering Journal*; v. 3925, pp. 1-6
- LOBANOV, O. V.; DUBROVSKY, T. B.; SAVITSKY, A. P.; AKINDINOV, D. E.; ALEXEEV, I. V.; SAVRANSKY, V. V.; 1995; "Optical Methods of Investigation of the Protein Langmuir—Blodgett Films"; *Thin Solid Films*, v. 259, Issue 1, pp. 85-90
- Mac RITCHIE, F.; 1986; "Spread Monolayers of Proteins." *Advance Colloid Interface Science*; v. 25, pp. 341-385
- Mac RITCHIE, F.; 1991; "Air/Water Interface Studies of Proteins." *Anal. Chim. Acta*; v. 249, pp. 241-245
- MACHIAH, D. K.; GIRISH, K. S.; GOWDA, T. V.; 2006; "A glycoprotein from a Folk Medicinal Plant, *Withania somnifera*, Inhibits Hyaluronidase Activity of Snake Venoms"; *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 143, Issue 2, pp.158-161

- MALMGREN, H.; 1953; "Characteristics of Testicular Hyaluronidase"; *Biochemistry and Biophysics Acta*, v. 4, pp. 524-529
- MARGOLIS, R. U.; MARGOLIS, R. K.; SANTELLA, R.; ATHERTON, D. M.; 1972; "The Hyaluronidase of Brain"; *Journal of Neurochemistry*, v. 19, pp. 2325-2332
- MATOUŠEK, J.; POUČKOVÁ, P.; HLOUŠKOVÁ, D.; ZADINOVÁ, M.; SOUČEK, J.; ŠKVOR, J.; 2004; "Effect of Hyaluronidase and PEG Chain Conjugation on the Biologic and Antitumor Activity of RNase A"; *Journal of Controlled Release*, v. 94, Issues 2-3, pp. 401-410
- MATSUMOTO, T.; OKAZAKI, M.; INOUE, M.; YAMAGUCHI, S.; KUSUNOSE, T.; TOYONAGA, T.; HAMADA, Y.; TAKAHASHI, J.; 2004, "Hydroxyapatite Particles as a Controlled Release Carrier of Protein", *Biomaterials*, v. 25, n. 17, p. 3807-3812.
- MENZEL, E. J.; FARR, C.; 1998; "Hyaluronidase and its Substrate Hyaluronan: Biochemistry, Biological Activities and Therapeutic uses"; *Cancer Letters*, v. 131, pp. 3-11
- MIO, K.; CARRETTE, O.; MAIBACH, H. I.; STERN, R.; 2000; "Evidence That the Serum Inhibitor of the Hyaluronidases May Be a Member of the Inter- α -Inhibitor Famil"; *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, N^o. 42, pp. 32413-32421
- MIO, K.; STERN, R.; 2002; "Inhibitors of the Hyaluronidases"; *Matrix Biology*, v. 21, pp. 31-37
- MIZUSHIMA, Y.; IKOMA, T.; TANAKA, J.; HOSHI, K.; ISHIHARA, T.; OGAWA, Y.; UENO, A.; 2006, "Injectable Porous Hydroxyapatite Microparticles as a New Carrier for Protein and Lipophilic Drugs", *Journal of Controlled Release*, v. 110, n. 2, p. 260-265.

- MOLNAR, M. J.; GILBERT, R.; LU, Y.; LIU, A. B.; GUO, A.; LAROCHELLE, N.; ORLOPP, K.; LOCHMULLER, H.; PETROF, B. J.; NALBANTOGLU, J.; KARPATI, G.; 2004; "Factors Influencing the Efficacy, Longevity, and Safety of Electroporation-Assisted Plasmid-Based Gene Transfer into Mouse Muscles"; *Molecular Therapy*, v. 10, Issue 3, pp. 447-455
- MONKAWA, A.; IKOMA, T.; YUNOKI, S.; YOSHIOKA, T.; TANAKA, J.; CHAKAROV, D.; KASEMO, B.; 2006, "Fabrication of Hydroxyapatite Ultra-Thin Layer on Gold Surface and its Application for Quartz Crystal Microbalance Technique", *Biomaterials*, v. 27, n. 33, p. 5748-5754.
- MOREY, S. S.; KIRAN, K. M.; GADAG, J. R.; 2006; "Purification and Properties of Hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian Black Scorpion) Venom"; *Toxicon*, v. 47, Issue 2, pp. 188-195
- MURALITHRAN, G.; RAMESH, S.; 2000; "The Effects of Sintering Temperature on the Properties of Hydroxyapatite"; *Ceramics International*, v. 26, pp. 221-230
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W., *Harper Biochemistry*, Appleton & Lange, 1996
- MUSA, F.; SRINIVASAN, S.; KING, C. M.; KAMAL, A.; 2006; "Raised Intraocular Pressure and Orbital Inflammation: A Rare IgE-Mediated Allergic Reaction to sub-Tenon's Hyaluronidase"; *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v 32, Issue 1, pp. 177-178
- NAGATA, H.; KOJIMA, R.; SAKURAI, K.; SAKAI, S.; KODERA, Y. NISHIMURA, H.; INADA, Y.; MATSUSHIMA, A.; 2004; "Molecular-Weight-Based Hyaluronidase Assay Using Fluorescent Hyaluronic Acid as a Substrate"; *Analytical Biochemistry*, v. 330, Issue 2, pp. 356-358
- NAKAJIMA, A.; TAKAKUWA, K.; KAMESHIMA, Y.; HAGIWARA, M.; SATO, S.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIDA, N.; WATANABE, T.; OKADA, K.; 2006,

- "Preparation and Properties of Titania-Apatite Hybrid Films", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 177, n. 1, p. 94-99.
- NAWY, S. S.; CSÓKA, A. B.; STERN, R.; 1999; "Hyaluronidase Expression in Human Skin Fibroblasts "; *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, v. 266, pp. 268-273
- NAYAR, S.; PRAMANICK, A. K.; SHARMA, B. K.; MISHRA, R. K.; BANSAL, S. K.; PRAJAPATI, A.; SAHU, K. K.; DAS, S. K.; PATHAK, L.; SINHA, A.; 2006, "Hydroxyapatite Coating on Stainless Steel Pre-Coated with Bovine Serum Albumin at Ambient Conditions", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 48, n. 2, p. 183-187.
- NG, H. C.; RANGANATHAN, S.; CHUA, K. L.; KHOO, H. E.; 2005; "Cloning and Molecular Characterization of the First Aquatic Hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of Stonefish (*Synanceja horrida*)"; *Gene*, v. 346, pp. 71-81
- NIÑO, M. R. R.; SÁNCHEZ, C. C.; PATINO, J. M. R.; 1999; "Interfacial Characteristics of β -Casein Spread Films at the Air–Water Interface"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 12, Issues 3-6, pp. 161-173
- NISHIKAWA, H.; 2001; "Thermal Behavior of Hydroxyapatite in Structure and Spectrophotometric Characteristics"; *Materials Letters*, v. 50, pp. 364-370
- NIU, J.-F.; WANG, G.-C.; TSENG, C.-K.; 2006, "Method for Large-Scale Isolation and Purification of R-Phycocerythrin from Red Alga *Polysiphonia Urceolata* Grev", *Protein Expression and Purification*, v. 49, n. 1, p. 23-31.
- NORDE, W.; 1986; "Adsorption of Proteins from Solution at the Solid-Liquid Interface"; *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 25, pp. 267-340
- NORDE, W.; ANUSIEM, A. C. I.; 1992; "Adsorption, Desorption and Re-Adsorption of Proteins on Solid Surfaces"; *Colloid and Surfaces*, v. 66, i. 1, pp. 73-80

- NORDE, W.; GIACOMELLI, C.E.; 2000; "BSA Structural Changes During Homomolecular Exchange Between the Adsorbed and the Dissolved States"; *Journal of Biotechnology*, v. 79, i. 3, pp. 259-268
- OHYA, T.; KANEKO Y.; 1970; "Novel Hyaluronidase from Streptomyces"; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, v. 198, N° 3, pp. 607-609
- OLIVEIRA, L. M.; RERESNDE, N. S.; GOMES, F. T.; SALIM, V. M. M.; ROSSI, A. M.; 1996; "Propriedades Dosimétricas de Hidroxiapatitas Sintéticas com Composição Similar a dos Tecidos Calcificados"; *Anais da SBF*, Caxambu
- ONO, I.; YAMASHITA, T.; JIN, H.-Y.; ITO, Y.; HAMADA, H.; AKASAKA, Y.; NAKASU, M.; OGAWA, T.; JIMBOW, K.; 2004, "Combination of Porous Hydroxyapatite and Cationic Liposomes as a Vector for BMP-2 Gene Therapy", *Biomaterials*, v. 25, n. 19, p. 4709-4718.
- ONUMA, K.; 2006, "Recent Research on Pseudobiological Hydroxyapatite Crystal Growth and Phase Transition Mechanisms", *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v. 52, n. 3, p. 223-245.
- OOTSUKA, S.; SAGA, N.; SUZUKI, K.-I.; INOUE, A.; OJIMA, T.; 2006, "Isolation and Cloning of an *endo*- β -1,4-Mannanase from Pacific Abalone *Haliotis Discus Hannai*", *Journal of Biotechnology*, v. 125, n. 2, p. 269-280.
- OUIZAT, S.; BARROUG, A.; LEGROURI, A.; REY, C.; 1999; " Adsorption of Bovine Serum Albumin on Poorly Crystalline Apatite: Influence of Maturation"; *Materials Research bulletin*, v. 34, pp. 2279-2289
- PAIVA, P.; DAMME, M. P. V.; TELLBACH, M.; JONES, R. L.; JOBLING, T.; SALAMONSEN, L. A.; 2005; "Expression Patterns of Hyaluronan, Hyaluronan Synthases and Hyaluronidases Indicate a Role for Hyaluronan in the Progression of Endometrial Cancer"; *Gynecologic Oncology*, v. 98, Issue 2, pp. 193-202

- PANDA, A.K.; NAG, K.; HARBOTTLE, R. R.; POSSMAYER F.; PETERSEN, N.O.; 2004; "Thermodynamic Studies on Mixed Molecular Langmuir Films: Part 2. Mutual Mixing of DPPC and Bovine Lung Surfactant Extract with Long-Chain Fatty Acids" *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 247, Issues 1-3, pp. 9-17
- PARK, S. Y.; HANNEMANN, R. E.; FRANSES, E. I.; 1999; "Dynamic Tension and Adsorption Behavior of Aqueous Lung Surfactants"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,; v. 15, Issues 3-4, pp. 325-338
- PARK, W.-K.; CHUNG, J.-W.; KIM, Y.-K.; CHUNG, S.-C.; KHO, H.-S.; 2006, "Influences of Animal Mucins on Lysozyme Activity in Solution and on Hydroxyapatite Surfaces", *Archives of Oral Biology*, v. 51, n. 10, p. 861-869.
- PASTORINO, L.; BERZINA, T. S.; TROITSKY, V. I.; FONTANA, M. P.; BERNASCONI, E.; NICOLINI, C.; 2002; "Biocatalytic Langmuir-Blodgett Assemblies Based on Penicillin G Acylase"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 23, Issue 4, pp. 357-363
- PATTUS, F.; ROTHEN, C.; STREIT, M; ZAHLER, P.; 1981; "Structure, composition, enzymatic activities of human erythrocyte and sarcoplasmic reticulum membrane films"; *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 647, N° 1, pp 29-39
- PEPE, I. M.; MAXIA, L.; NICOLINI, C.; 1996; "Properties of Langmuir-Blodgett Films of Rhodopsin"; *Thin Solid Films*, v. 284-285, pp. 739-742
- PETRIGLIANO, A.; TRONIN, A.; NICOLINI, C.; 1996; "Deposition and Enzymatic Activity of Langmuir-Blodgett Films of Alkaline Phosphatase"; *Thin Solid Films*, v. 284-285, pp. 752-756
- PETTY, M. C.; 1992; "Possible applications for Langmuir-Blodgett films", *Thin Solid Films*, v. 210-211, N° 2, 30, pp. 417-426

- POCKELS, A.; 1891; "Surface Tension"; *Nature*, v. 43, pp. 437. *apud* SCHWARTZ, D. K.; 1997; "Langmuir-Blodgett film structure", *Surface Science Reports*, v. 27, n. 7-8, pp. 245-334
- PODYMA, K. A.; YAMAGATA, S.; SAKATA, K.; YAMAGATA, T.; 1997; "Difference of Hyaluronidase Produced by Human Tumor Cell Lines with Hyaluronidase Present in Human Serum as Revealed by Zymography"; *Biochemical and Biophysics Research Communications*, v. 241, pp. 446-452
- PREININGER, C.; SCHAUMANN, H. C.; AHLUWALIA, A.; ROSSI, D.; 2000; "Characterization of IgG Langmuir-Blodgett Films Immobilized on Functionalized Polymers"; *Talanta*, v. 52, Issue 5, pp. 921-930
- QUHILL, F.; BOWLING, B.; PACKARD, R. B.; 2004; "Hyaluronidase Allergy After Peribulbar Anesthesia with Orbital Inflammation"; *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 30, Issue 4, pp. 916-917
- RACHANA, R.; BANERJEE, R.; 2006; "Effects of albumin and erythrocyte membranes on spread monolayers of lung surfactant lipids"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 50, Issue 1, 1 June 2006, Pages 9-17
- RAZUMOVSKY, L.; DAMODARAN, S.; 1999; "Thermodynamic Incompatibility of Proteins at the Air-Water Interface?"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 13, Issue 5, pp. 251-261
- REES, S. G.; HUGHES WASSELL, D. T.; PETER SHELLIS, R.; EMBERY, G.; 2004, "Effect of Serum Albumin on Glycosaminoglycan Inhibition of Hydroxyapatite Formation", *Biomaterials*, v. 25, n. 6, p. 971-977.
- RENAULT, F.; CHABRIERE, E.; ANDRIEU, J.-P.; DUBLET, B.; MASSON, P.; ROCHU, D.; 2006, "Tandem Purification of two HDL-Associated Partner Proteins in Human Plasma, Paraoxonase (PON1) and Phosphate Binding Protein (HPBP) Using Hydroxyapatite Chromatography", *Journal of Chromatography B*, v. 836, n. 1-2, p. 15-21.

- RESENDE, N. S.; GOMES, F.T.; ROSSI, A. M.; SALIM, V.M.M.;"Estudo da Adsorção de Amônia em Materiais Biocerâmicos"; I Encontro Brasileiro de Adsorção- Fortaleza-CE,1996
- RIEU, J. P.; RONZON, F.; ROUX, B.; 2002; "Adsorption and Aggregation of Glycosylphosphatidyl Inositol (GPI) Anchored Alkaline Phosphatase on Methylated Glass Surfaces Studied by Tapping Mode Atomic Force Microscopy" *Thin Solid Films*, v. 406, N° 1-2, pp. 241-249
- RIPART, J. ; NOUVELLON, E.; 2004; "Conséquence de l'Arrêt d'Approvisionnement de la Hyaluronidase : Avons-nous Changé nos Pratiques ?" ; *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, v. 23, Issue 7, pp. 762-764
- RITZOULIS, C.; SCOUTARIS, N.; PAPADEMETRIOU, K.; STAVROULIAS, S.; PANAYIOTOU, C.; 2005, "Milk protein-Based Emulsion Gels for Bone Tissue Engineering", *Food Hydrocolloids Food Colloids 2004 (Harrogate)*, v. 19, n. 3, p. 575-581.
- RIVIECCIO, V.; ESPOSITO, A.; BELLOFIORE, P.; PASQUALE, P.; SASSANO, M.; COLOMBO, M.; VERDOLIVA, A.; High-Level Expression and Efficient Purification of Recombinant Human Long Pentraxin PTX3 in Chinese Hamster Ovary Cells", *Protein Expression and Purification*, v. In Press, Corrected Proof.
- ROUABI, M.; CHAMPION, E.; GALLET, O.; JADA, A.; ANSELME, K.; 2006, "Physico-Chemical Characteristics and Protein Adsorption Potential of Hydroxyapatite Particles: Influence on in Vitro Biocompatibility of Ceramics After Sintering", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 47, n. 1, p. 10-19.
- SACHSE, A.; WAGNER, A.; KELLER, M.; WAGNER, O.; WETZEL, W.-D.; LAYHER, F.; VENBROCKS, R.-A.; HORTSCHANSKY, P.; PIETRASZCZYK, M.; WIEDERANDERS, B.; 2005, "Osteointegration of Hydroxyapatite-Titanium Implants Coated with Nonglycosylated Recombinant

Human Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) in Aged Sheep", *Bone*, v. 37, n. 5, p. 699-710.

SAITO, N.; MURAKAMI, N.; TAKAHASHI, J.; HORIUCHI, H.; OTA, H.; KATO, H.; OKADA, T.; NOZAKI, K.; TAKAOKA, K.; 2005, "Synthetic Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems for Bone Morphogenetic Proteins", *Advanced Drug Delivery Reviews Targeted Drug Delivery for Musculoskeletal Diseases*, v. 57, n. 7, p. 1037-1048.

SALAMEH, Y.; SHOUFANI, A.; 2004; "Full-Thickness Skin Necrosis After Arginine Extravasation—a Case Report and Review of Literature"; *Journal of Pediatric Surgery*, v. 39, Issue 4, pp. e9-e11

SALEEM, I. Y.; VORDERMEIER, M.; BARRALET, J. E.; COOMBES, A. G. A.; 2005, "Improving Peptide-Based Assays to Differentiate between Vaccination and Mycobacterium Bovis Infection in Cattle using Nanoparticle Carriers for Adsorbed Antigens", *Journal of Controlled Release*, v. 102, n. 3, p. 551-561.

SALIM, V. M. M.; RESENDE, N. S.; ROSSI, A. M.; 1995; "Projeto de Materiais Biocerâmicos"

SCHANBACHER, F. L.; LEE, C.K.; WILSON, I. B.; HOWELL, D. E.; ODELL, G. V.; 1973; " Purification and Characterization of Tarantula, *Dugesiella hentzi* (Girard) Venom Hyaluronidase"; *Comparative Biochemistry And Physiology. B, Comparative Biochemistry*, v. 44B, pp. 389-396

SCHLATTERER, B.; BAEKER, R.; SCHLATTERER, K.; 2004, "Improved Purification of β -Lactoglobulin from Acid Whey by Means of Ceramic Hydroxyapatite Chromatography with Sodium Fluoride as a Displacer", *Journal of Chromatography B*, v. 807, n. 2, p. 223-228.

SCHROEDER, G. L.; GOMEZ, M. F. L.; HAUTMANN, S. H.; FRIEDRICH, M. G.; EKICI, S.; HULAND, H.; LOKESHWAR, V.; 2004;"A Side by Side

Comparison of Cytology and Biomarkers for Bladder Cancer Detection"; *The Journal of Urology*, v. 172, Issue 3, pp. 1123-1126

SCHUKIN, E. D., PERTSOV, A. V., AMÉLINA, E. A. Química Coloidal, Ed. Mir, 1988

SHELLIS, R. P.; ADDY, M.; REES, G. D.; 2005, "In Vitro Studies on the Effect of Sodium Tripolyphosphate on the Interactions of Stain and Salivary Protein with Hydroxyapatite", *Journal of Dentistry*, v. 33, n. 4, p. 313-324.

SHIMODA, S.; AOBA, T.; MORENO, E.C.; MIAKE, Y.; 1990; "Effect of Solution Composition on Morphological and Structural Features of Carbonated Calcium Apatites"; *Journal of Dental Research*, v. 69, N° 11, pp. 1731-1740

SHIRLEY, D.A.; 1972; *Physical Review* – B.S. 4072.

SLAVICA, L.; SLAVICA Z.; MILJEVIĆ, N.; MILONJIĆ, S.; 2001 "The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid"; *Thermochimica Acta*, v. 374, N° 1, pp 13-22

SLOTTE, J. P.; 1992; "Substrate Specificity of Cholesterol Oxidase from *Streptomyces cinnamomeus* – A Monolayer Study", *Journal Steroid Biochemical Molecule Biologics*, v. 42, N° 5, pp. 521-526

SOLOMON, J. S.; NIXON, C. P.; MCGARVEY, S. T.; ACOSTA, L. P.; MANALO, D.; KURTIS, J. D.; 2004, "Expression, Purification, and Human Antibody Response to a 67 kDa Vaccine Candidate for Schistosomiasis Japonica", *Protein Expression and Purification*, v. 36, n. 2, p. 226-231.

SPALLICCI, M.D.B.; CHIEA, M.A.; SINGER, J.M.; ALBUQUERQUE, P.B.; BITTAR, R.E.; ZUGAIB, M.; 2005; "Use of Hyaluronidase for Cervical Ripening: A Randomized Trial"; *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*

- SPICKENREITHER, M.; BRAUN, S.; BERNHARDT, G.; DOVE, S.; BUSCHAUER, A.; 2006; "Novel 6-*O*-Acylated Vitamin C Derivatives as Hyaluronidase Inhibitors with Selectivity for Bacterial Lyases"; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, Issue 20, 15 pp. 5313-5316
- StatSoft, Inc. (1995). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104-4442, (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, e-mail: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>.
- STERN, R.; 2004; "Hyaluronan Catabolism: a New Metabolic Pathway"; *European Journal of Cell Biology*, v. 83, Issue 7, pp 317-325
- STERN, R.; 2005; "Hyaluronan Metabolism: a Major Paradox in Cancer Biology"; *Pathologie Biologie*, v. 53, Issue 7, pp. 372-382
- STERN, R.; ASARI, A. A.; SUGAHARA, K. N.; 2006; "Hyaluronan Fragments: An Information-Rich System"; *European Journal of Cell Biology*, v. 85, Issue 8, pp. 699-715
- SUCHANEK, W.; YASHIMA, M.; KAKIHANA, M.; YOSHIMURA, M.; 1996; "Processing and Mechanical Properties of Hydroxyapatite Reinforced with Hydroxyapatite Whiskers"; *Biomaterials*, v. 17, pp. 1715-1723
- SURITA, F. G. C.; CECATTI, J. G.; PARPINELLI, M. A.; KRUPA, F.; SILVA, J. L. P.; 2005; "Hyaluronidase Versus Foley Catheter for Cervical Ripening in High-Risk Term and Post Term Pregnancies"; *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 88, Issue 3, pp. 258-264
- SWALEN, J. D.; 1987; "Structure of Langmuir-Blodgett films", *Thin Solid Films*, v. 152, N° 1-2, pp. 151-154
- TAKAGI, O.; KURAMOTO, N.; OZAWA, M.; SUZUKI, S.; 2004, "Adsorption/Desorption of Acidic and Basic Proteins on Needle-like

Hydroxyapatite Filter Prepared by Slip Casting", *Ceramics International*, v. 30, n. 2, p. 139-143.

TAMAI, N.; MYOUI, A.; HIRAO, M.; KAITO, T.; OCHI, T.; TANAKA, J.; TAKAOKA, K.; YOSHIKAWA, H.; 2005, "A New Biotechnology for Articular Cartilage Repair: Subchondral Implantation of a Composite of Interconnected Porous Hydroxyapatite, Synthetic Polymer (PLA-PEG), and Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2)", *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 13, n. 5, p. 405-417.

TANCRED, D. C.; McCORMACK, B. A. O.; CARR, A. J.; 1998; "A Quantitative Study of the Sintering and Mechanical Properties of Hydroxyapatite/Phosphate Glass Composites"; *Biomaterials*, v. 19, pp. 1735-1743

TANYILDIZI, S.; BOZKURT, T.; 2003; "Effects of Acetylsalicylic Acid and Metamizol on Hyaluronidase Activity and Sperm Characteristics in Rams"; *Animal Reproduction Science*, v. 76, pp. 195-204

TANYILDIZI, S.; TÜRK, G.; 2004; "The Effects of Diminazene Aceturate and Ceftriaxone on Ram Sperm"; *Theriogenology*, v. 61, Issues 2-3, pp. 529-535

TAYLOR, T. H.; ELLIOTT, T.; COLTURATO, L. F.; STRAUB, R. J.; MITCHELL, D. L.; NAGY, Z. P.; 2006; "Comparison of Bovine- and Recombinant Human-Derived Hyaluronidase with Regard to Fertilization Rates and Embryo Morphology in a Sibling Oocyte Model: a Prospective, Blinded, Randomized Study"; *Fertility and Sterility*, v. 85, Issue 5, pp. 1544-1546

TAZI, A.; BOUSSAAD S.; LEBLANC, R. M.; 1999; "Atomic Force Microscopy Study of Cytochrome *f* (Cyt *f*) and Mixed Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)/Cyt *f* Langmuir–Blodgett Films"; *Thin Solid Films*, v. 353, Issues 1-2, pp. 233-238

TISELIUS, A.; HJERTÉN, S.; LEVIN, Ö.; 1956; "Protein chromatography on calcium phosphate columns", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 65, n.1, pp. 132-155

- TOLKSDORF, S.; McCULLAGH, D.; SCHWENK, E.; 1949; "The Turbidimetric Assay of Hyaluronidase"; *Journal of Lab. Clin. Med.*, v. 34, pp. 74
- TREDGOLD R. H.; O'MULLANE, J. E.; 1980; "Protein Penetration as a Tool for the Investigation of Langmuir Films Derived from Erythrocytes"; *FEBS Letters*, v. 117, Issues 1-2, pp. 273-276
- TROITSKY, V. I.; BERZINA, T. S.; PETRIGLIANO, A.; NICOLINI, C.; 1996; "Deposition of Alternating LB Monolayers with a New Technique"; *Thin Solid Films*, v. 284-285, pp. Pages 122-126
- TRONIN, A.; DUBROVSKY, T.; NICOLINI, C.; 1996; "Deposition, Molecular Organization and Functional Activity of IgG Langmuir Films"; *Thin Solid Films*, v. 284-285, pp 894-897
- TSIRIDIS, E.; BHALLA, A.; ALI, Z.; GURAV, N.; HELIOTIS, M.; DEB, S.; DISILVIO, L.; 2006, "Enhancing the Osteoinductive Properties of Hydroxyapatite by the Addition of Human Mesenchymal Stem Cells, and Recombinant Human Osteogenic Protein-1 (BMP-7) *in Vitro*", *Injury 3rd European Clinical Symposium on Tissue Engineering and Bone Regeneration 14-16 September 2006*, v. 37, n. 3, Supplement 1, p. S25-S32.
- TURHANI, D.; CVIKL, B.; WATZINGER, E.; WEI[SS]ENBOCK, M.; YERIT, K.; THURNHER, D.; LAUER, G.; EWERS, R.; 2005, "In Vitro Growth and Differentiation of Osteoblast-Like Cells on Hydroxyapatite Ceramic Granule Calcified From Red Algae", *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 63, n. 6, p. 793-799.
- TURHANI, D.; WATZINGER, E.; WEI[BETA]ENBOCK, M.; CVIKL, B.; THURNHER, D.; WITWERT, G.; YERIT, K.; EWERS, R.; 2005, "Analysis of Cell-Seeded 3-Dimensional Bone Constructs Manufactured In Vitro With Hydroxyapatite Granules Obtained From Red Algae", *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 63, n. 5, p. 673-681.

- TURHANI, D.; WEI[SS]ENBOCK, M.; WATZINGER, E.; YERIT, K.; CVIKL, B.; EWERS, R.; THURNHER, D.; 2005, "In Vitro Study of Adherent Mandibular Osteoblast-like Cells on Carrier Materials", *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 34, n. 5, p. 543-550.
- van AKEN, G. A.; MERKS, M. T. E.; 1996; "Adsorption of Soluble Proteins to Dilating Surfaces"; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.114, pp. 221-226
- VERCLAS, S. A. W.; HOWES, P. B.; KJAER, K.; WURLITZER, A.; WEYGAND, M.; BÜLDT, G.; DENCHER, N. A.; LÖSCHE, M.; 1999; " X-ray Diffraction from a Single Layer of Purple Membrane at the Air/Water Interface"; *Journal of Molecular Biology*, v. 287, Issue 5, pp. 837-843
- VERCRUYSSSE, K. P.; LAUWERS, A. R.; DEMEESTER, J. M.; 1995; "Kinetic Investigation of the Action of Hyaluronidase on Hyaluronan Using the Morgan-Elson and Neocuproine Assays"; *Biotechnology Journal*, v. 310, pp. 55-59
- VERGER, R. ; PATTUS, F. ; PIERONI, G. ; RIVIERE, C. ; FERRATO, F. ; LEONARDI, J. ; DARGENT, B. (1984) Regulation by the "Interfacial Quality" of some Biological Activities. *Colloid Surface*; v. 10, pp. 163-180
- VERGER, R.; PATTUS, F.; 1982; "Lipid-protein Interactions in Monolayers"; *Chemistry Physics Lipids*; v. 30, pp. 189-227
- VITORINO, R.; LOBO, M. J. C.; DUARTE, J.; FERRER-CORREIA, A. J.; TOMER, K. B.; DUBIN, J. R.; DOMINGUES, P. M.; AMADO, F. M. L.; 2004, "In Vitro Hydroxyapatite Adsorbed Salivary Proteins", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 320, n. 2, p. 342-346.
- VOET, D.; VOET, J. G.; 1995; *Biochemistry*; 2 ed. New York, John Wiley & Sons

- WANG, C.; DUAN, Y.; MARKOVIC, B.; BARBARA, J.; HOWLETT, C. R.; ZHANG, X.; ZREIQAT, H.; 2004, "Phenotypic Expression of Bone-Related Genes in Osteoblasts Grown on Calcium Phosphate Ceramics with Different Phase Compositions", *Biomaterials*, v. 25, n. 13, p. 2507-2514.
- WANG, M.; BONFIELD, W.; 2001; "Chemically Coupled Hydroxyapatite-Polyethylene Composites Structure and Properties"; *Biomaterials*, v. 22, pp. 1311-1320
- WASSELL, D. T. H.; HALL, C. R.; EMBERY, G.; 1995, "Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Hydroxyapatite"; *Biomaterials*, v. 16, pp. 697-702
- WEI, G.; MA, P. X.; 2004, "Structure and Properties of Nano-Hydroxyapatite/Polymer Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, v. 25, n. 19, p. 4749-4757.
- WILKINSON, M. C.; ZABA, B. N.; TAYLOR, D. M.; LAIDMAN, D. L.; LEWIS, T. J. (1986) A monolayer study on cytochrome *b*₅-phospholipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 857, 189-197
- WRIGHT, R. P.; ELGERT, K. D.; CAMPBELL, B. J.; BARRETT, J. T.; 1973; "Hyaluronidase and Esterase Activities of the Venom of the Poisonous Brown Recluse Spider"; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 159, pp. 415-426
- WU, J. J.; DUTSON, T. R.; CARPENTER, Z. L.; 1982; "Effect of Post-mortem Time and Temperature on Bovine Intramuscular Collagen" *Meat Science*, v. 7, N^o 3, pp. 161-168
- WU, T.-K.; HUANG, C.-Y.; KO, C.-Y.; CHANG, C.-H.; CHEN, Y.-J.; LIAO, H.-K.; 2004, "Purification, Tandem Mass Characterization, and Inhibition Studies of Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase Enzyme from Bovine Liver", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 421, n. 1, p. 42-53.

- YAMANDA, M.; HASEGAWA, E.; KANAMORI, M.; 1977; "Purification of Hyaluronidase from Human Placenta"; *Journal of Biochemistry*, v. 81, pp. 485-494
- YANG, C. H.; SRIVASTAVA, P. N.; 1974; "Separation and Purification of Hyaluronidase from Ram Sperm Acrosomes"; *Febs Reproduction and Fertilization*, v. 37, pp. 17-25
- YANG, C. H.; SRIVASTAVA, P. N.; 1975; "Purification and Properties of Hyaluronidase from Bull Sperm"; *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, No. 1, pp. 79-83
- YASUDA, H. Y.; MAHARA, S.; UMAKOSHI, Y.; IMAZATO, S.; EBISU, S.; 2000; "Microstructure and Mechanical Property of Synthesized Hydroxyapatite Prepared by Colloidal Process"; *Biomaterials*, v. 21, pp. 2045-2049
- YILDIRIM, A. O.; LAMMLER, Ch.; WEIß R.; 2002 "Identification and Characterization of *Streptococcus Agalactiae* Isolated from Horses"; *Veterinary Microbiology*, v. 85, pp. 31-35
- YIN, A.; MARGOLIS, H. C.; YAO, Y.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F. G.; 2006, "Multi-Component Adsorption Model for Pellicle Formation: The Influence of Salivary Proteins and Non-Salivary Phospho Proteins on the Binding of Histatin 5 onto Hydroxyapatite", *Archives of Oral Biology*, v. 51, n. 2, p. 102-110.
- YIN, F.; PARK, S. H.; SHIN, H. K.; KWON, Y. S.; 2006; "Study of Hemoglobin-Octadecylamine LB Film Formation and Deposition by Compressibility Analyse, QCM and AFM"; *Current Applied Physics*, v. 6, Issue 4, pp. 728-734
- YIN, G.; LIU, Z.; ZHAN, J.; DING, F.; YUAN, N.; 2001; "Impacts of the Surface Charge Property on Protein Adsorption on Hydroxyapatite"; *Chemical Engineering Journal*; v. 3925, pp. 1-6

ZAITSEV, S. Y.; 1993; "Functional Langmuir Films with Glucose Oxidase"; *Colloid Surface A*; v. 75, pp. 211-216

ZAITSEV, S. Y.; 1995; "Polymeric Langmuir Films with Glucose Oxidase as Prototype Biosensors"; *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 24, Issues 1-3, pp. 177-179

ZANEVELD, L. J. D.; POLAKOSKI, K. L.; SCHUMACHER, G. F. B.; 1973; "Properties of Acrosomal Hyaluronidase from Bull Spermatozoa"; *The Journal of Biological Chemistry*, v. 248, No. 2, pp. 564-570

ZHAI, Y.; CUI, F. Z.; 2006; "Recombinant Human-like Collagen Directed Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals", *Journal of Crystal Growth*, v. 291, n. 1, p. 202-206.

ZHANG, H.; JONES, R.; MARTIN-DELEON, P.A.; 2004;"Expression and Secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the Epididymis: Role of Testicular Lumicrine Factors"; *Matrix Biology: Journal Of The International Society For Matrix Biology*, v. 22, N° 8, pp. 653-661

ZREIQAT, H.; VALENZUELA, S. M.; NISSAN, B. B.; ROEST, R.; KNABE, C.; RADLANSKI, R. J.; RENZ, H.; EVANS, P. J.; 2005, "The Effect of Surface Chemistry Modification of Titanium Alloy on Signalling Pathways in Human Osteoblasts", *Biomaterials*, v. 26, n. 36, pp. 7579-7586.