



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI

KARLA COSTA BEZERRA FONTENELE OLIVEIRA

**APLICAÇÕES DO ARGILOMINERAL PLYGORSKITA ASSOCIADO A
BIOMOLÉCULAS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS**

TERESINA, PI
2019

KARLA COSTA BEZERRA FONTENELE OLIVEIRA

**APLICAÇÕES DO ARGILOMINERAL PLYGORSKITA ASSOCIADO A
BIOMOLÉCULAS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, Curso de Doutorado em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia em Saúde, Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Eiras

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

TERESINA, PI
2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processos Técnicos

O48a Oliveira, Karla Costa Bezerra Fontenele.
Aplicações do argilomineral palygorskita associado a
biomoléculas no desenvolvimento de biomateriais / Karla Costa
Bezerra Fontenele Oliveira. -- 2019.
162 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste
de Biotecnologia (RENORBIO), Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Teresina, 2019.

“Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Eiras”.

“Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida
Leite”.

1. Argilas. 2. Paligorsquita- Análise. 3. Peptídeos antimicrobianos.
4. Biopolímeros. 5. Materiais nanoestruturados. I. Eiras, Carla.
II. Leite, José Roberto de Souza de Almeida. III. Título.

CDD 666.3

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Karla Costa Bezerra Fontenele Oliveira

TÍTULO DO PROJETO: “APLICAÇÕES DO ARGILOMINERAL PALYGORSKITA ASSOCIADO A BIOMOLÉCULAS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS.”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Carla Eiras

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Carla Eiras- UFPI (Presidente)	<u>Aprovada</u>	<u>Carla Eiras</u>
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	<u>Aprovada</u>	<u>Durcilene A. S. L.</u>
Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI (Examinador)	<u>APROVADA</u>	<u>Lívio C. C. N.</u>
Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos - UFPI (Examinadora)	<u>Aprovada</u>	<u>Maria Rita de Moraes Chaves Santos</u>
Profa. Dra. Ana Clécia Santos de Alcântara – UFMA (Examinadora)	<u>Aprovada</u>	<u>Ana Clécia Santos de Alcântara</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 18 de março de 2019.

HORÁRIO: 14:30h

LOCAL: Auditório do Curso de Engenharia dos Materiais - LIMAV-CT/UFPI.

“Toda cultura científica deve começar por uma catarse intelectual e afetiva. Resta, então, a tarefa mais difícil: colocar a cultura científica em estado de mobilização permanente, substituir o saber fechado e estático por um conhecimento aberto e dinâmico, dialetizar todas as variáveis experimentais, oferecer enfim à razão razões para evoluir.”
Bachelard

DEDICATÓRIA

A Deus, pois, sem Ele este trabalho não teria sentido. Juntos, enfrentamos cada etapa e neste processo de crescimento Ele me concedeu muitas dádivas...

Ao meu esposo Rômulo, companheiro na vida, nas orações, nos estudos, trabalho e em casa com nossas filhas. Como sou grata a Deus pelo nosso casamento e família!

À nossa filha Sophie que com sua doçura entendia (às vezes nem tanto) as ausências da mamãe...Ao nosso presentinho em forma de bebê, Lissie, que “podia” acompanhar a mamãe durante os experimentos, me fazendo uma linda companhia!

Ao meu pai Guilherme (*in memoriam*) pelo exemplo de hombridade e amor e à minha mãe Norma, ombro amigo e socorro em todos os momentos. Sua ajuda, apoio e dedicação por mim são porções do céu.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Carla Eiras, muito obrigada por todo apoio e paciência. Como eu aprendi com cada exortação, sempre me motivando a melhorar e amadurecer. Agradeço imensamente pelas oportunidades e conexões com tantas pessoas incríveis, graças à sua generosidade. Sempre se esforçando para melhorar e nos levar junto!

Aos professores José Roberto e Edson Cavalcanti pelas valiosas contribuições. Um privilégio poder contar com o conhecimento sólido e a experiência de ambos! Obrigada por me apresentarem a DRS 01 e a palygorskita!!

Ao professor Luís Carlos Bertolino e ao Vitor Schwenck do Cetem-RJ por todo carinho, receptividade e pela parceria desenvolvida ao longo deste trabalho. Conhecer e vivenciar um pouco da rotina desta instituição, que é referência em argilominerais, foi muito enriquecedor e gratificante!

Aos pesquisadores Andréia Meneguim e Hernane Barud da Universidade de Araraquara (Uniar) por toparem fazer parte deste trabalho. Obrigada pela oportunidade em um momento tão crucial! Por tornarem o ambiente tão produtivo e agradável. Pelos momentos de trabalho e descontração que vivenciamos em Teresina, Araraquara e São Paulo. Muito bom misturar o sol de Teresina com o de “Arara” na rua 6, onde encontrei uma “Quimmera”, os passeios gastronômicos nas ruas 4 e 5 com Tais e Rafa... E na rua 8 tive as melhores companhias, Abigail e Ricarrdo!!!

À equipe do MatSens e Biotec por cada reunião de grupo e confraternização. Crescemos juntos como pesquisadores e em amizade. Agradeço especialmente ao Emanuel por todo *help* com os *papers*. Valeu demais, meu amigo!! Ao Leandro pela força no início dos meus estudos e experimentos com a palygorskita e à Cristiany por compartilharmos viagens argilosas (rsrs). Ao Paulo pela ajuda nos meus primeiros passos na Eletroquímica! Ao Handerson pela ‘assessoria’ eletroquímica à distância, sempre tão acessível. Passamos muita graça com o “temperamental” que eu não ousou mencionar o nome, mas você sabe quem (rsrs). Ao Rafael, por toda ajuda com a importação... sua especialidade! À Alyne por me ajudar com as ‘ruginhas’ nas medidas de AFM (rs)!

À Katiane Xavier, que privilégio dividir a sala de professores com você, conversar, tirar dúvidas... pela sua generosidade em ajudar a bióloga a adentrar o mundo das caracterizações dos argilominerais quando tudo parecia embaralhado.

Ao corpo do programa Renorbio! Aos professores, pelo empenho em nossa formação, em especial à professora Maria Rita, por todas as conversas enriquecedoras. À turma de Renorbianos 2014.1, como não lembrar do professor Rivelilson (*in memoriam*) que com seu humor nos concedeu este apelido?! A vitória de cada um nos motivou a superar estes anos de desafios. Aos servidores e técnicos do Limav, em especial Raimundo, Kelson e Edgar por estarem sempre a postos para o que fosse preciso.

A todos os cientistas e escritores com quem convivi e travei diálogos densos e solitários lendo seus artigos. Aos que me inspiraram, confrontaram e expandiram a minha mente em direção ao horizonte além. Nas intempéries em busca pelo conhecimento, com vocês sofri, me alegrei, cresci e já não sou mais a mesma.

RESUMO

Os materiais de origem natural representam alternativas cada vez mais atrativas para o desenvolvimento de dispositivos visando a melhoria da saúde e da qualidade de vida. Entre as possibilidades, os argilominerais aliam estabilidade térmica, reforço mecânico, viscosidade e biocompatibilidade à imobilização de moléculas bioativas no *design* de materiais multifuncionais. A palygorskita (PAL) consiste em um argilomineral fibroso com potencial para interação com moléculas orgânicas. Uma classe de moléculas de interesse é a dos peptídeos antimicrobianos, detentores de propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiparasitária podendo atuar como elementos terapêuticos ou no reconhecimento de agentes patogênicos em sistemas sensores. Um exemplo é a Dermaseptina 01 (DRS 01), um peptídeo sintetizado da secreção dérmica de anfíbios anuros da família Phyllomedusidae. Outra classe de biomoléculas é a dos exopolissacarídeos, produtos biotecnológicos obtidos a partir de uma gama de organismos, entre eles, as bactérias do gênero *Sphingomonas*, produtoras da goma gelana, um biopolímero com aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e na área médica. Diante do potencial destes materiais, o presente trabalho apresenta os avanços recentes na literatura acerca da associação de moléculas biológicas com argilominerais. A parte experimental descreve os processos de purificação da PAL e imobilização da DRS 01 por meio da técnica *Layer-by-Layer* (LbL) sobre um substrato de óxido de estanho dopado com índio (ITO). Os filmes LbL foram caracterizados eletroquimicamente por Voltametria Cíclica em meio tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,25; 25°C) à velocidade de 50 mV/s, Espectroscopia de UV-Vis, FTIR por ATR e Microscopia de Força Atômica. Os resultados para os filmes ITO/DRS 01 e ITO/PAL/DRS 01 mostraram que a DRS 01 manteve seu comportamento eletroativo. Além disso, a utilização da PAL purificada influenciou positivamente a formação do filme com aumento na densidade de corrente. Os filmes LbL a base de DRS 01 e PAL representam uma alternativa no desenvolvimento de plataformas bioativas versáteis e de fácil preparação. A PAL, por sua vez, também foi avaliada em associação com a goma gelana quanto à sua aplicação no desenvolvimento de filmes por meio do método *casting* como plataforma para liberação de fármaco. Duas amostras de PAL foram testadas, uma natural e outra ativada termicamente em diferentes concentrações. As propriedades físico-químicas dos filmes foram investigadas e seu comportamento avaliado por Testes Mecânicos, de Permeabilidade ao Vapor d'água, Genotoxicidade e Ensaio de Liberação *in vitro*. A adição de PAL desempenhou o reforço das propriedades mecânicas dos filmes com aumento dos valores para força de punção e alongação relacionados à rigidez das fibras do argilomineral. Os estudos de permeabilidade revelaram um sistema com comportamento hidrofílico. Nenhum sinal de toxicidade foi reportado para os filmes biocompósitos. O estudo de liberação *in vitro* revelou que a adição de PAL natural na concentração de 1% melhorou o perfil de liberação do fármaco modelo em relação ao filme formado exclusivamente por gelana. O conjunto de resultados desta pesquisa contribui agregando valor à PAL piauiense, um material regional ainda pouco investigado. Desta forma, abre-se novas possibilidades de aplicação destes sistemas na área de dispositivos sensores e revestimento de biomateriais na área biomédica.

Palavras-chave: argilas, peptídeos antimicrobianos, biopolímeros, filmes, materiais nanoestruturados.

ABSTRACT

Materials of natural origin represent increasingly attractive alternatives for the development of devices aimed at improving health and quality of life. Among the possibilities, the clay minerals show some interesting properties such as thermal stability, mechanical reinforcement, viscosity and biocompatibility to the immobilization of bioactive molecules in the design of multifunctional materials. Palygorskite (PAL) consists of a fibrous clay with potential for interaction with organic molecules. One class of molecules of interest is antimicrobial peptides, which have antibacterial, antiviral, antifungal and antiparasitic properties and can act as therapeutic elements or in the recognition of pathogens in sensor systems. Dermaseptin 01 (DRS 01) is a peptide synthesized from the dermal secretion of anuran amphibians of the family Phyllomedusidae. Another class of biomolecules is the exopolysaccharides, biotechnological products synthesized from a range of organisms, including bacteria of the genus *Sphingomonas*, producers of gellan gum, a biopolymer for applications in the food, pharmaceutical and medical industries. Considering the potential of these materials, the present work presents recent advances in the literature on the association of biological molecules with clay minerals. The experimental part describes the purification processes of PAL and the immobilization of DRS 01 by the Layer-by-Layer (LbL) technique on an Indium tin oxide (ITO) substrate. The LbL films were electrochemically characterized by Cyclic Voltammetry in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.25; 25°C) at a rate of 50 mV / s, UV-Vis Spectroscopy, ATR FTIR and Microscopy of Atomic force. The results for the ITO / DRS 01 and ITO / PAL / DRS 01 films showed that DRS 01 maintained its electroactive behavior. In addition, the use of purified PAL influenced positively the formation of the film with increase in current density. The LbL films based on DRS 01 and PAL appear as an alternative in the development of versatile and easy to prepare platforms. PAL, on the other hand, was also evaluated in association with gellan gum for its application in the development of films by means of the casting method as platform for drug release. Two samples of PAL were tested, one raw and another thermally activated at different concentrations. The physicochemical properties of the films were investigated. Mechanical tests, Water Vapor Permeability, Genotoxicity and in vitro release assays were evaluated. The addition of PAL enhanced the mechanical properties of the films with increased values for puncture strength and elongation related to the stiffness of the argillomineral fibers. Permeability studies revealed a system with hydrophilic behavior. No toxicity was reported for the biocomposite films. The in vitro release study revealed that the addition of 1% of raw PAL improved the template of drug release profile relative to the exclusively gellan film. The set of results of this research contributes adding value to the PAL, a regional material still few investigated. In this way, it opens new possibilities of applications of these systems in sensor devices or in the development of biomaterials in the biomedical field.

Keywords: clays, antimicrobial peptides, biopolymers, films, nanostructured materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática das folhas tetraédricas e octaédricas dos argilominerais.....	23
Figura 2.	Representação esquemática das características estruturais e texturais da palygorskita. (A) Estrutura da palygorskita; (B) Microscopia eletrônica de transmissão da palygorskita utilizada neste estudo.....	25
Figura 3.	Espécime de <i>Pithecopus hypochondrialis</i>	33
Figura 4.	Representação da molécula de DRS 01. Modelos da sequência de monômeros (A) e α -hélice (B).....	36
Figura 5.	Estrutura da goma gelana na forma nativa (A) e desacetilada (B).....	39
Figura 6.	Esquema do processo de deposição de um filme LbL.....	44
Figura 7.	Esquema de preparação e aparência de um filme polimérico elaborado pela técnica de evaporação do solvente.....	46
Figura 8.	Esquema de liberação de fármaco da matriz polimérica em um sistema formador de filme para aplicação tópica.....	47
Figura 9.	Difratogramas de raios X das amostras <20 μm não magnética e não magnética purificada.....	101
Figura 10.	Espectros de FTIR das amostras <20 μm não magnética e não magnética purificada no intervalo de 4000–400 (cm^{-1}).....	102
Figura 11.	Imagens de MEV (A e B) e MET (C e D) da amostra <20 μm não magnética purificada.....	107
Figura 12.	Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de ITO i) não modificado (ITO), modificado com ii) o filme monocamada de DRS 01 (ITO/DRS 01) e com os filmes com uma única bicamada de iii) ITO/PAL/DRS 01 e iv) ITO/PAL-IN/DRS 01. Todas as medidas foram realizadas em meio tampão fosfato (0,1 mol/L^{-1}) a 50 mV/s	108
Figura 13.	Perfil eletroquímico dos filmes ITO/PAL/DRS 01 de acordo com a variação no número de bicamadas (n) depositadas. Todas as medidas foram realizadas em meio tampão fosfato (0,1 mol/L^{-1}) a 50 mV/s	111
Figura 14.	(A) Espectros de UV-Vis mostrando o crescimento dos filmes bicamada ITO/PAL/DRS 01. Inserção: Relação entre a absorbância em 280 nm e o número de bicamadas adsorvidas. (B) Espectro de FTIR do eletrodo de ITO e do	

	filme com 3 bicamadas com as bandas características observadas.....	113
Figura 15.	Imagens de MFA das superfícies de vidro cobertas com (A) – ITO (controle), (B) – ITO/PAL, (C) – ITO(PAL/DRS 01), (D) – ITO(PAL/DRS 01) ₃	115
Figura 16.	Comparação dos valores de rugosidade (Ra) das superfícies de vidro cobertas com ITO, ITO/PAL, ITO(PAL/DRS 01) e ITO(PAL/DRS 01) ₃	116
Figura 17.	(I-IV) Scheme of the general procedure employed for the preparation of the CF-(PAL/PAL AT); (V) Biocomposite films based on GG-PAL/CF and GG-PAL AT/CF samples at 1-5% concentration of clay.....	136
Figura 18.	Films FEG-SEM images (upper surface) taken at the same magnification of the samples: (A) GG-PAL 1%, (B) GG-PAL AT 1%, (C) GG-PAL 5%, (D) GG-PAL AT 5%, (E) GG-PAL 15%, (F) GG-PAL AT 15%, (G) GG-PAL 30%, (H) GG-PAL AT 30%, (I) GG-PAL 50%, (J) GG-PAL AT 50%.....	137
Figura 19.	ATR-FTIR images of the samples: (A) and (B) PAL, PAL AT and GG; (C) Films based on pristine palygorskite GG-PAL and (D) Films based on thermally activated palygorskite GG-PAL AT.....	139
Figura 20.	TG/DTG curves TG (black) and DTG (blue) curves recorded in the 25-600°C range, under air flow conditions: (A) GG-PAL 1%, (B) GG-PAL AT1%, (C) GG-PAL 5%, (D) GG-PAL AT 5%, (E) GG-PAL 15%, (F) GG-PAL AT 15%, (G) GG-PAL 30%, (H) GG-PAL AT 30% (I) GG-PAL 50% (J) GG-PAL AT 50%, (K) GG (control).....	142
Figura 21.	XRD patterns of the samples: (A) PAL, PAL AT and GG powders, (B) Films based on pristine palygorskite GG-PAL and (C) Films based on thermally activated palygorskite GG-PAL AT.....	145
Figura 22.	In vitro release profiles of caffeine from control (GG) and composite films (GG-PAL, GG-PAL AT) in phosphate buffer (pH 5.8).....	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Algumas aplicações do argilomineral palygorskita reportadas na literatura.....	28
Tabela 2.	Diversidade de biomoléculas imobilizadas em argilominerais naturais reportados na literatura nos últimos dez anos.....	69
Tabela 3.	Biossensores à base de eletrodos modificados com argilominerais e biomoléculas imobilizadas.....	75
Tabela 4.	Posições e atribuições das bandas de vibração no espectro de infravermelho da PAL.....	104
Tabela 5.	Composição química da amostra de palygorskita purificada (% em peso).....	105
Tabela 6.	Mechanical properties of control (GG) and biocomposite films (mean \pm SD, n = 3).....	147
Tabela 7.	Water vapor permeability (WVP) of control (GG) and composite films (mean \pm SD, n = 3).....	149
Tabela 8.	Mutagenic activity expressed through the mean and standard deviation of the number of revertants / plate and mutagenicity index in the TA 98, TA 100 and TA 97a strains of <i>S. typhimurium</i> after treatment with extracts of GG-PAL 5% and GG-PAL AT 5%.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIPEA - Association International pour l'Étude des Argiles
CETEM – Centro de Tecnologia Mineral
CF – Cafeína
CMS – Clay minerals society – Sociedade de argilominerais
CTAB – Brometo de cetil trimetilamônio
CTC – Capacidade de troca cationica
Da – Dalton
DMF – Dimetilformamida
DNA – Deoxyribonucleic acid – ácido desoxirribonucleico
DRS 01 – Dermaseptina 01
DRX – Difração de Raios X
FDA – Food and Drug Administration
FRX – Fluorescência de Raios X
FTIR – Fourier Transformer Infrared Spectroscopy – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
FTIR-ATR – Fourier Transformer Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance – Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão total atenuada
GG – Goma gelana
HDLs – Hidróxidos duplo lamelares
ITO – Indium tin oxide – óxido de estanho dopado com índio
kHz – Quilohertz
LbL – *Layer-by-layer* – Camada por camada
LIMAV – Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
mA – Miliampere
 μ A – Microampere
meq – Miliequivalente
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MFA – Microscopia de força atômica
MMT – Montmorilonita
mVs – Milivolts por segundo
PAL – Palygorskita
PAMs – Peptídeos antimicrobianos
pH – Potencial hidrogeniônico
pI – Ponto isoelétrico

PCR – Polimerase chain reaction – Reação em cadeia da polimerase
PVA – Permeabilidade ao vapor d'água
Ra – Rugosidade
SAM – Self assembled monolayer – monocamada automontada
SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia
SC – *Solvent Casting* – Evaporação do solvente
SCE – Saturated calomel Electrode – Eletrodo de calomelano saturado
T – Tetraédrica
 θ - Teta
Trp – Triptofano
u.a. – Unidade arbitrária
UV-Vis – Ultravioleta visível
V – Voltz
VC – Voltametria cíclica
WVP – Water Vapor Permeability

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	14
2. CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Argilas e Argilominerais	20
2.1.1 Características gerais e definições	20
2.1.2 Classificação dos argilominerais	22
2.1.3 Argilomineral palygorskita (PAL)	24
2.2 Aplicações de argilominerais em sistemas biológicos	28
2.3 Biomoléculas	31
2.3.1 Peptídeos antimicrobianos	31
2.3.1.1 Dermaseptina 01 (DRS 01)	35
2.3.2 Polímeros naturais	38
2.3.2.1 Goma gelana	38
2.4 Filmes em aplicações biotecnológicas	41
2.4.1 Técnica <i>Layer-by-Layer</i> (LbL)	41
2.4.2 Técnica de evaporação do solvente ou <i>Solvent Casting</i> (SC)	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
3. CAPÍTULO III - PRODUÇÕES DERIVADAS DA TESE	62
3.1 Imobilização de biomoléculas em argilominerais para aplicações médicas ...	64
3.2 Desenvolvimento de um filme nanoestruturado contendo palygorskita e o peptídeo DRS 01 para aplicações biotecnológicas potenciais	89
3.3 Films based on gellan gum and palygorskite clay: physicochemical and drug release evaluation	127
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	160

PÁGINAS SUPRIMIDAS

DE 16 A 164