

# COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXTRAÍVEIS DO LATEX DE BORRACHA NATURAL (LBN)

Sizue O. Rogero; Patrick J. Spencer; Vânia E. Campos; Fábio M. Lusvarghi e Olga Z. Higa.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP  
Caixa Postal 11049  
05422-970, São Paulo, Brasil

## RESUMO

Várias proteínas do látex de borracha natural (LBN) têm sido indicadas como alérgenos importantes. Sabe-se que quando as proteínas são submetidas a radiação ionizante sofrem desnaturação e modificação imunoquímica resultando em baixa reatividade antigênica. O objetivo deste trabalho foi extrair e comparar as proteínas residuais extraíveis em água dos filmes de LBN vulcanizados pelo processo convencional e pela radiação ionizante. A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) e a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) mostraram uma banda difusa na região de proteína de massa molecular em torno de 14 kDa, que acreditamos ser o fator de alongação da borracha (REF), nos dois eluatos, sendo menor nos filmes de látex vulcanizados pela radiação ionizante. O REF tem sido citado como o alérgeno mais importante do látex. Esses dados sugerem que a utilização da radiação ionizante na vulcanização do LBN pode ser um processo útil na produção de artefatos de LBN com baixa antigenicidade.

## I. INTRODUÇÃO

O látex de borracha natural (LBN) extraído da árvore *Hevea brasiliensis*, contendo cerca de 1-2% de proteínas, provém das células latíferas situadas abaixo da casca das seringueiras. Durante os últimos 15 anos tem-se verificado que usuários de artefatos de borracha natural, como luvas, podem tornar-se sensibilizados a essas proteínas que são provenientes dessas árvores e que ainda continuam presentes no produto final. O processo de polimerização das moléculas de isopreno para obtenção da borracha natural depende de uma proteína com massa molecular em torno de 14 kDa, conhecida como fator de alongação da borracha (REF) e que tem sido apresentada como sendo uma das responsáveis por processos alérgicos à borracha<sup>(1)</sup>.

Muitas proteínas encontradas no látex fresco com ou sem amônia, assim como nos produtos manufaturados de LBN tem sido reportados como alérgenos significantes, sem haver consenso para definição do qual é mais importante. Dentre os identificados estão incluídos polipeptídeos com massa molecular aproximada de 14, 20, 27, 29-30 e 45 kDa. Entretanto é pouco conhecido sobre a especificidade imunológica e forma molecular dos alérgenos residuais após manufatura por diferentes processos<sup>(2)</sup>.

Este trabalho teve como objetivo a extração e comparação das proteínas residuais extraíveis de filmes de LBN vulcanizados pelo processo convencional, com

enxofre e pelo processo alternativo, com radiação ionizante.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se o LBN centrifugado a 60%, tipo HA (alta concentração de amônia) e proveniente da Malásia.

**Preparação dos Filmes de LBN.** Foram preparados filmes de LBN vulcanizados por dois processos<sup>(3)</sup>:

1- Processo convencional com enxofre. A vulcanização foi realizada na presença de enxofre, óxido de zinco e dietilditiocarbamato de zinco, à 70 °C durante 3 horas e sob agitação constante. O látex vulcanizado foi resfriado e diluído para 50% de sólidos totais com solução de amônia 1%.

2- Processo alternativo com radiação ionizante. Ao LBN foi adicionado acrilato de n-butila como radiosensibilizador e solução de amônia 1% para redução do conteúdo de sólidos totais para 50%. A amostra foi então irradiada numa fonte de <sup>60</sup>Co do tipo panorâmica da Yoshizawa Kiko Co LTD, na presença de ar, à temperatura ambiente com uma dose de 12 kGy.

Os filmes de LBN vulcanizados pelos dois processos foram preparados pelo método de derrame seguido de lixiviação com água a 70 °C durante 15 minutos e secagem a 70 °C durante 1 1/2 h.

**Extração de Proteínas.** As proteínas foram extraídas de filmes de LBN vulcanizados pelo processo convencional (VLBN) e pelo processo alternativo com radiação  $\gamma$  (RVLBN).

Foram cortados, em pedaços de 1x1cm, 45 g de cada filme, adicionados em cerca de 300 ml de água destilada e deixados em agitação por cerca de 24 hs na temperatura ambiente. Os extratos aquosos foram liofilizados e os resíduos foram dissolvidos em 4 ml H<sub>2</sub>O destilada e as proteínas precipitadas com acetona, na proporção de 1:5, separadas por centrifugação e dissolvidos em 2 ml de H<sub>2</sub>O.

As concentrações de proteínas nos extratos aquosos foram determinadas pelo método de Lowry modificado<sup>(4)</sup> utilizando-se como padrão a soroalbumina (BSA).

**Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).** Foi realizada SDS-PAGE dos extratos aquosos de acordo com Laemmli, U.K.<sup>(5)</sup>. Os géis foram corados com Coomassie Blue e Prata.

**Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).** Os extratos aquosos foram injetados em coluna de exclusão molecular (7,5x600mm) da Toso-Haas TSK-2000 para cromatografia líquida de alta pressão e eluídos com solução de bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7, fluxo de 1 ml/min e leitura a 220 nm.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da quantidade de proteínas extraídas em água ser muito pequena pode ser suficiente para causar reações de hipersensibilidade em usuários de artefatos de borracha natural, conforme observações de vários grupos de pesquisas<sup>(6,7)</sup>.

O processo de vulcanização utilizado resultou em diferenças de extratibilidade: a quantidade de proteínas extraídas de filmes de látex vulcanizados pela radiação  $\gamma$  é menor que nos vulcanizados pelo processo convencional, como se pode verificar na Tabela 1.

TABELA 1. Proteínas Extraíveis em Água

	$\mu\text{g/g}$ filme látex
LBN vulcanizado pelo processo convencional	108
LBN vulcanizado pela radiação $\gamma$	73

Nas figuras 1 e 2 pode-se verificar que a proteína predominante no RVLBN é a de cerca de 14 kDa, que acreditamos ser o Fator de Elongação da Borracha (REF)<sup>(1)</sup>. No perfil cromatográfico do extrato de VLBN em SDS-PAGE aparece uma banda difusa na zona de 14 kDa, o que pode explicar os dois picos neoformados nesta zona no

perfil do HPLC. Em ambos os extratos foi observado um arraste difuso tanto no SDS-PAGE como no HPLC, indicando formação de produtos de alto PM. Foi observado também peptídeos de aproximadamente 7 kDa e menores ainda no perfil cromatográfico do extrato de filmes vulcanizados pela radiação  $\gamma$ .

Vários grupos de pesquisadores tem observado que a radiação ionizante provoca desnaturação e modificações imunológicas nas proteínas, principalmente mudanças na imunoreatividade pela destruição dos epitopos, regiões da proteína responsáveis pelo reconhecimento do anticorpo<sup>(7,8)</sup>.

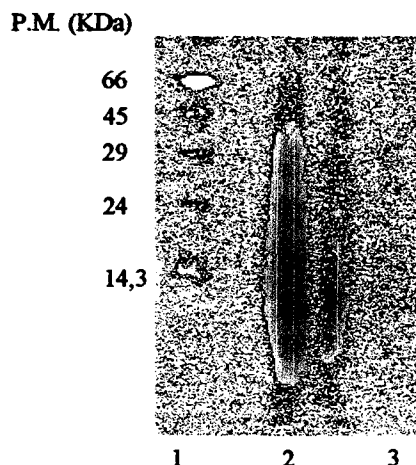


Figura 1: SDS-PAGE dos extratos de filme de látex. 1-Padrão de peso molecular. 2-VLBN. 3-RVLBN

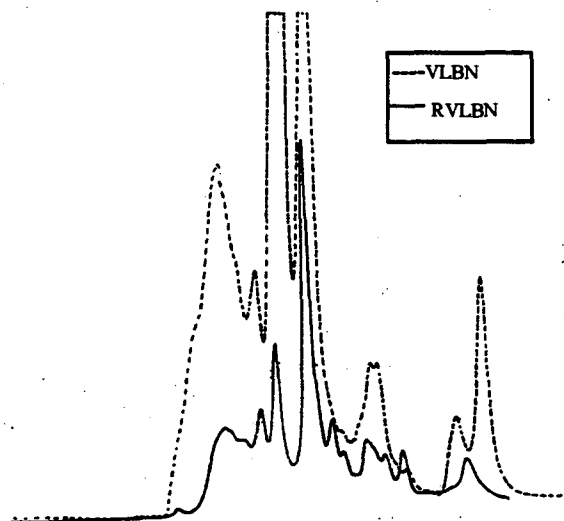


Figura 2. Perfil cromatográfico em HPLC dos extratos de filmes de látex.

Segundo Puig<sup>(10)</sup>, a destruição das proteínas presentes no LBN durante a irradiação torna o *crosslinking* mais eficiente

Os resultados obtidos mostram que a irradiação modifica efetivamente a estrutura e a extratibilidade das proteínas do LBN podendo ser um processo útil para obtenção de artefatos de borracha natural hipoalergênicos.

Estudos posteriores serão desenvolvidos para caracterização do comportamento imunológico das proteínas do LBN vulcanizados pela radiação ionizante.

#### AGRADECIMENTOS

- Indústria Nacional de Artefatos de Borracha Ltda.
- CNPq pelas bolsas de estudos.

#### REFERENCES

- [1] TURJANMA, K., **Occupational Aspects and Occurrence of Natural Rubber Latex Allergy.**, International Conference: **LATEX PROTEIN ALLERGY: The Latest Position.** La Maison de la Chimie, Paris-France, 11th. January, 1995 p.7-10.
- [2] PALOSUO, T., **Purification and Molecular Characterisation of Latex Allergens.** International Conference: **LATEX PROTEIN ALLERGY: The Latest Position.** La Maison de la Chimie, Paris-France, 11th. January, 1995 p.11-16.
- [3] CAMPOS, V. E., ROGERO, S. O., HIGA, O. Z. and GUEDES, S. M. L., **Cytotoxicity of Vulcanized Natural Rubber Latex Films by the Conventional Process with Sulphur and by the Alternative Process with Ionizing Radiation.** Proceedings of the 5th. Latin American and 3rd. Ibero American Polymer Symposium 1996, Mar del Plata, Argentina, 2nd.-5th December, 1996 p. 289-299.
- [4] MILLER, G.L. **Protein Determination for Large Numbers of Samples.** Anal. Chem., vol. 31, p. 964, 1959.
- [5] LAEMMLI, U. K., **Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of bacteriophage T4.** Nature, 227: 680-685, 1970.
- [6] SUNDERASAN, E., HAMID, S., CARDOSA, M. J. and YEANG, H. Y. **Allergic Proteins of *Hevea brasiliensis* Latex Fractions.** J. Nat. Rubb. Res., vol.9(2), p. 127-130, 1994
- [7] SHAMSUL BAHRI, A. R., HAMZAH, S., GHAZALLY, H. M. and YEANG, H. Y.. **Latex Allergy Studies: Location of Soluble Proteins in Latex Examination Gloves.** J. Nat. Rubb. Res., vol. 8(4), p. 299-307, 1993.
- [8] NASCIMENTO, N. **Dissertação de Mestrado**, 1991.

[9] KUME, T. and MATSUDA, T. **Changes in Structural and Antigenic Properties of Proteins by Radiation.** Radiat.Phys.Chem. vol. 46(2), p. 225-231, 1995.

[10] PUIG, J.R., **Radiation Curing of Natural Rubber Latex.** ATOMIC ENERGY REVIEW, Vol. 9(2), p. 373-379, 1971.

#### ABSTRACT

Several proteins in natural rubber latex (NRL) have been assigned to be significant allergens. It is known that proteins submitted to ionizing radiation suffer denaturation and immunochemical modification resulting in low antigenic reactivity. The aim of this study was to extract and compare water extractable proteins from NRL films vulcanized by conventional and by ionizing radiation methods. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and high pressure liquid chromatography (HPLC) showed a diffuse protein band of about 14 kDa, which we believe is rubber elongation factor (REF), in both eluates, but smaller in latex film vulcanized by ionizing radiation. REF has been suggested to be a major latex allergen. These data suggest that ionizing radiation vulcanization could be an useful method for the production of NRL goods with low antigenicity.