

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**FUNCIONALIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA COM  
PEPTÍDEO RGD PARA REPARAÇÃO TECIDUAL DE PELE**

**RUTE LOPES**

**Instituto de Química  
Araraquara - SP  
2015**

**RUTE LOPES**

**FUNCIONALIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA COM  
PEPTÍDEO RGD PARA REPARAÇÃO TECIDUAL DE PELE**

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

Orientador: Reinaldo Marchetto  
Co-orientadora: Sybele Saska Specian

**Araraquara - SP  
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

L864f      Lopes, Rute  
              Funcionalização de celulose bacteriana com peptídeo  
              RGD para reparação tecidual de pele / Rute Lopes. –  
              Araraquara : [s.n], 2015  
              106 f. : il.

              Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
              Instituto de Química  
              Orientador: Reinaldo Marchetto  
              Coorientador: Sybele Saska Specian

              1. Celulose. 2. Peptídeos. 3. Peptídeos-síntese.  
              4. Cicatrização de feridas. 5. Materiais biomédicos. I. Título

## Dados Curriculares

**Nome:** Rute Lopes

**Nome em citações bibliográficas:** LOPES, R.

**Filiação:** Salvador Lopes e Honorina Balbino da Silva Lopes

**Local e data de nascimento:** São José dos Campos - SP, 22/08/1980

**Estado civil:** Casada

**Endereço:** Rua Engenheiro José dos Santos, 178, Jardim Tabapuã – Araraquara – SP. CEP 14810-294.

**Telefone:** (16) 98824-8640

**e-mail:** rutelopes@inbox.com

**Resumo das qualificações:** Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase no desenvolvimento de biomateriais, Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA (2012), Bacharel em Comunicação Audiovisual: Imagem e Som pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (2004).

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

2013 – 2015 Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, UNESP,  
Instituto de Química de Araraquara.

Título: Funcionalização de Celulose Bacteriana com Peptídeo RGD  
para Reparação Tecidual de Pele.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

Co-orientadora: Sybele Saska Specian.

Bolsista CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
Nível Superior.

2009 - 2012 Bacharelado em Biomedicina

Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara.

Título: Incorporação de Complexo Metálico de Ouro-Mercaptotiazolina em Membrana de Celulose Bacteriana para uso em Medicina.

Orientador: Wilton Rogério Lustri.

2000 – 2004                      Bacharelado em Comunicação Audiovisual: Imagem e Som  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

## PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

“5<sup>th</sup> Symposium on Biological Chemistry, Health and Medicine: Frontier and New Perspectives”.

Ilhabela, São Paulo. De 6 a 8 de outubro de 2013.

Apresentação de painel intitulado: “Computational Studies of Peptide Ligands and Docking to Protein Receptors”.

Workshop “Entrepreneurship for graduate in Chemistry: A glance for Brazilian competitiveness innovation & development”.

Instituto de Química de Araraquara – UNESP. De 25 a 26 de fevereiro de 2014.

Mini-curso “Introducción a la microscopía de fuerza atómica”.

Nucleus for Manufacturing Advanced – NUMA/USP/São Carlos e QUIMMERA Research Group – UNIARA/Araraquara. 8 de abril de 2014.

“XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – XIII SBPMat”.

João Pessoa, PB. De 28 de setembro a 2 de outubro de 2014.

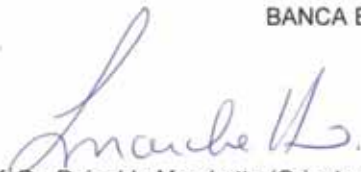
Apresentação de painel intitulado: “Bacterial cellulose membrane functionalized with RGD peptide for medical applications”.

RUTE LOPES

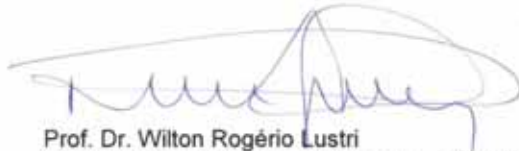
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de fevereiro de 2015.

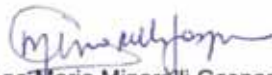
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Reinaldo Marchetto (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí  
Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara



Profª Drª Ana Maria Minarelli Gaspar  
Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara

*Dedico este trabalho aos meus amores,*

*Alexandre, meu marido, amante, amigo e companheiro, você é a minha paz, meu tudo,*

*Meus pais, Honorina, mãezinha querida, alicerce e meu norte, e Salvador (in memoriam), pai, exemplo, melhor amigo... Vocês são o meu coração,*

*Meus irmãos, Denise, Renato e Junior, que as nossas almas estejam em sintonia eternamente... Vocês são minha alegria,*

*Meus sobrinhos, tios, primos, cunhados, agregados, vocês são igualmente amados,*

*Mabi (Maria Bidê), cujo soninho embalado pelo som do teclado foi companhia constante,*

*Amo vocês!*

## *Agradecimentos*

A Deus, por fazer da minha vida uma sequência de eventos em que Sua maravilhosa graça se manifesta, por me guiar gentilmente, iluminar os caminhos mais escuros, e mostrar nas perdas a verdade do irreal.

Ao meu marido Alexandre (Ále), por sua paciência, carinho, amor e compreensão. E pelos abraços e batimentos cardíacos pra me acalmar...

Aos meus pais, Dona Norinha e seu Neno, obrigada por me deixarem participar dessa família extraordinária, com a Dê, o Rê e o Jú. Vocês são minha fonte inesgotável de sorrisos.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, pela orientação, pelas conversas e discussões e também por aguentar meu jeito afobado, batendo à porta. Obrigada pelo privilégio de trabalhar com você!

À Sybele Saska Specian, co-orientadora, pela orientação, atenção, apoio e companhia.

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, pela orientação e tempo, e por ceder seu laboratório e recursos para a realização dos ensaios *in vitro*. À técnica Marisa Campos Polesi Placeres, que tanto me ajudou e acompanhou durante os ensaios. Aos novos colegas do laboratório de Imunologia Clínica, Amanda, Francine, Camila, Carol, Deivis, Lucas e todos os que contribuíram de alguma forma.

À grande amiga, Ana Carla Caires, que muito me ajudou nos meus momentos de crise e insegurança. Vou sentir muitas saudades...

Aos amigos da “salinha de estudos”, Anderson, obrigada pela ajuda e pelas explicações, Isabelle, pela companhia nos cafezinhos, na academia e no flamenco, Camila, Júlia, Aline, Larissa, Matheus, Norris e Estéban. E Prof. Dr. Saulo Santesso, que também está sempre por lá, principalmente nas festinhas...

À minha amigona Isabela Haddad Peron, que apesar de seguir caminho diferente no mestrado, continua presente e inseparável, e que sempre me compreende, me apoia, me aguenta... Ainda que as lágrimas acabem, nossas risadas nunca hão de cessar!

Aos professores da banca de qualificação, Ana Maria Minarelli Gaspar e Hernane da Silva Barud, pelas sugestões valiosíssimas.



Às funcionárias da seção de Pós-Graduação do Instituto de Química de Araraquara, Wennia, Célia, Ana Paula e Cíntia, por toda a atenção e paciência, vocês são excelentes.

Às funcionárias da biblioteca Ana Cristina Garcia Camilo Santos e Sônia Mara Alves Scutari pelo auxílio com as referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

À CAPES pela concessão da bolsa e à FAPESP pelo auxílio financeiro à pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho cujos nomes não foram citados, mas que sabem da sua importância.

Muito obrigada a todos!

I have fought the good fight,  
I have finished the race,  
I have kept the faith.  
(2 Timothy 4:7)

## RESUMO

A celulose bacteriana (CB) apresenta ampla diversidade de aplicações. Neste trabalho o enfoque foi desenvolver um curativo temporário ou suporte para regeneração tecidual de pele, a partir da funcionalização de CB com peptídeo RGD, caracterizá-lo quanto às propriedades físico-químicas e avaliar *in vitro* a capacidade de estimular a adesão e a proliferação de fibroblastos, a citotoxicidade e a resposta imune. A finalidade do material desenvolvido consiste em promover a reparação tecidual de pele, visto que diversos fatores sistêmicos tais como diabetes, tabagismo e carência nutricional, podem dificultar o processo de cura. O uso de biomateriais como suporte de medicamentos ou curativos temporários, auxiliando ou acelerando o processo de reparação e cura, é uma necessidade nestes casos. A sequência peptídica RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico), encontrada em diversas proteínas da matriz extracelular (MEC), é frequentemente utilizada para promover a adesão celular, mediada por integrinas, em biomateriais. O peptídeo sintetizado foi escolhido por meio de estudo computacional. Foram sintetizados dois tipos de membranas, a CB-RGDAds, na qual o peptídeo RGD encontra-se adsorvido, e a CB-RGDImz, na qual o peptídeo encontra-se ligado covalentemente à membrana, e, portanto, imobilizado. Estes materiais, juntamente com a membrana de CB pura, foram caracterizados a partir de análises de ângulo de contato, difratometria de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção na região de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Posteriormente, as amostras foram submetidas a ensaios *in vitro* de viabilidade celular e morfologia celular utilizando a linhagem de fibroblastos L929; adicionalmente análises de determinação de citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e produção de óxido nítrico para avaliar a resposta imune e inflamatória foram realizadas utilizando células de camundongos Balb/c. Os resultados indicaram que as membranas de CB-RGDAds e CB-RGDImz foram funcionalizadas com sucesso, e que estas não apresentaram alterações estruturais e morfológicas significativas, nem em estabilidade térmica, em relação à membrana de CB pura, a despeito do procedimento de funcionalização. Do mesmo modo foi possível constatar que a membrana de CB-RGDImz apresentou desempenho superior nos ensaios *in vitro*, e, por conseguinte, possui maior potencial para ser estudada mais detalhadamente e eventualmente ser aplicada como biomaterial na reparação tecidual de pele.

**Palavras-chave:** celulose bacteriana; peptídeo RGD; reparação tecidual; biomaterial.

## ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) exhibits a broad diversity of applications. The aim of this study was to develop a scaffold or temporary dressing for skin tissue repair, whereof the BC would be functionalized with an RGD peptide. The synthesized materials were physicochemically characterized and submitted to *in vitro* analyses to assess their capacity of stimulating fibroblasts adhesion, proliferation and immune response. The developed materials would be applied in skin tissue repair that may be hampered by a series of systemic factors, such as diabetes, smoking and nutritional deficiency. In these cases, the usage of biomaterials as a drug delivery system or wound dressing, aiding or accelerating the repair and healing processes, becomes a necessity. The RGD peptide sequence (Arginine-Glycine-Aspartic Acid) is found in many extracellular matrix (ECM) proteins, and it is frequently used to promote cell adhesion, mediated by integrins, in biomaterials. The synthesized peptide sequence was chosen by means of computational analysis. Two types of membrane were synthesized, the BC-RGDAds in which the RGD peptide was adsorbed, and the BC-RGDImz in which the peptide was covalently bonded to the membrane, therefore, immobilized. These materials, together with the pure BC membrane, were characterized by contact angle analysis, x-ray diffractometry (XRD), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). Subsequently, the samples were submitted to *in vitro* assays of cellular viability and cellular morphology, using the fibroblast lineage L929; moreover, to evaluate the immune and inflammatory response, the nitric oxide production assay as well as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokines determination assays were performed using Balb/c mice cells. The results indicate that the BC-RGDAds and the BC-RGDImz membranes were successfully synthesized, also there were no significant structural and morphological or thermal stability alterations in consequence of the functionalizing method. Moreover, it was possible to determine that the BC-RGDImz membrane displayed the best performance on the *in vitro* assays, hence it has the greatest potential to be further studied and to be applied as a biomaterial for skin tissue repair.

**Keywords:** bacterial cellulose; RGD peptide; tissue repair; biomaterial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura da pele. ....	23
Figura 2 – Estrutura da celulose, com detalhe para a estrutura monomérica da $\beta$ -D-glicopirranose.....	24
Figura 3 – Micrografia por MET de celulose sendo extraída de uma célula bacteriana. A seta indica que todos os filamentos estão conectados em um conjunto de cadeias de celulose. ....	26
Figura 4 – Sequência RGD, fórmula molecular e nomenclatura.....	32
Figura 5 – Delineamento experimental. ....	38
Figura 6 – Estrutura primária da região 1511-1540 da fibronectina humana (A) e da sequência peptídica escolhida para síntese (B).....	40
Figura 7 – Estrutura primária do peptídeo RGD sintetizado.....	41
Figura 8 – Reação dos amino grupos livres dos aminoácidos com a ninidrina, produzindo um composto de coloração azul-violácea.....	43
Figura 9 – Esquema da modificação de superfície da membrana de CB. Reação 1: esterificação das hidroxilas da CB e acoplamento do Fmoc-Lys(Fmoc). Reação 2: Desproteção dos grupamentos amino.....	46
Figura 10 – Modelo tridimensional dos peptídeos RGD analisados, sendo L1 (A) utilizado como referência, L2 (B) e L3 (C) as duas sequências de interesse para comparação. ....	60
Figura 11 – Diagrama de interação de ligante do Maestro entre PA e L1 (A), L2 (B) e L3 (C).....	62
Figura 12 – Esquema da formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos. ....	63
Figura 13 – Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo RL-RA1, antes (A) e após (B) purificação.....	64
Figura 14 – Representação do ângulo de contato.....	67
Figura 15 – Imagens capturadas pela câmera CCD, no ensaio de ângulo de contato. (A): membrana de CB pura; (B): membrana de CB-RGDAds; (C): membrana de CB-RGDI <sub>mz</sub> .....	68
Figura 16 – Difratoograma da CB, CB-RGDAds e CB-RGDI <sub>mz</sub> , com picos assinalados...	70
Figura 17 – Modelo representando cadeias de celulose nativa, com representação dos planos cristalográficos à direita. ....	71
Figura 18 – Micrografia por MEV das membranas de CB. (A): superfície da CB pura. (B): superfície da membrana de CB-RGDAds. (C): superfície da membrana de CB-RGDI <sub>mz</sub> .	72

Figura 19 – Espectro de infravermelho para as amostras de (A): CB, (B): CB-RGDAds e (C): CB-RGDImz. ....	73
Figura 20 – Curva TG para as membranas de (A): CB, (B): CB-RGDAds e (C): CB-RGDImz. ....	76
Figura 21 – Curva de DSC para as amostras de (A): CB, (B): CB-RGDAds e (C): CB-RGDImz. ....	78
Figura 22 – Ensaio de viabilidade celular por MTT para as células L929, expresso em %, com tempo de incubação das amostras de 3 dias (A), 7 dias (B) e 10 dias (C) (* p < 0,0003; *** p < 0,0001). ....	81
Figura 23 – Micrografia por MEV das membranas. (A) e (B): superfície da CB pura; (C) e (D): superfície da membrana de CB-RGDAds; (E) e (F): superfície da membrana de CB-RGDImz (A, C, E com aumento de 500×; B, D, F com aumento de 1.000×).....	84
Figura 24 – Esquema do efeito da interação ligante RGD-integrina de membrana celular quando imobilizado em superfície, como na CB-RGDImz (A) e quando em solução, como na CB-RGDAds (B), após liberação do peptídeo no meio de cultura celular. ....	85
Figura 25 – Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, de camundongos Balb/c. Resultados expressos em $\mu\text{mols de nitrito}/5 \times 10^5$ células, como média $\pm$ desvio padrão (* p < 0,0001). ....	86
Figura 26 – Determinação da produção de TNF- $\alpha$ em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, incubados na presença de CB, CB-RGDAds, CB-RGDImz, células incubadas em LPS como controle positivo e células em meio de cultura RPMI-1640C como controle negativo (* p < 0,0032). ....	89
Figura 27 – Determinação da produção de IFN- $\gamma$ em cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c, cultivados na presença de CB, CB-RGDAds, CB-RGDImz, Con-A: controle positivo e células em meio de cultura RPMI-1640C: controle negativo.....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Citocinas envolvidas no processo cicatricial, suas células produtoras e efeitos biológicos. ....	29
Tabela 2 – Identificação de estruturas de ligantes e receptores modelados tridimensionalmente por bioinformática. ....	39
Tabela 3 – Protocolo de síntese em membrana utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc)...	48
Tabela 4 – Rendimento da purificação e pureza relativa do peptídeo RGD. ....	64
Tabela 5 – Resultado da análise de espectrometria de massas. ....	65
Tabela 6 – Resultados do ensaio de ângulo de contato para as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz. ....	67
Tabela 7 – Designação das principais bandas vibracionais de absorção de infravermelho da celulose e do peptídeo.....	74
Tabela 8 – Resultados das curvas termogravimétricas para as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz. ....	77
Tabela 9 – Valores obtidos de absorbância para o ensaio de viabilidade celular por MTT, tendo como controle negativo (C-) células em meio D-MEM-C e como controle positivo (C+) isopropanol.....	79



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### 1. Aminoácidos

Ala (A) Alanina

Arg (R) Arginina

Asn (N) Asparagina

Asp (D) Ácido Aspártico

Cys (C) Cisteína

Gln (Q) Glutamina

Glu (E) Ácido Glutâmico

Gly (G) Glicina

His (H) Histidina

Ile (I) Isoleucina

Leu (L) Leucina

Lys (K) Lisina

Met (M) Metionina

Phe (F) Fenilalanina

Pro (P) Prolina

Ser (S) Serina

Thr (T) Treonina

Trp (W) Triptofano

Tyr (Y) Tirosina

Val (V) Valina

### 2. Outras

ACN: Acetonitrila

ATCC: *American Type Culture Collection* (coleção de culturas tipo americano)

Boc: terc-Butiloxicarbonila

CB: Celulose bacteriana

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CHO: *Chinese Hamster Ovary* (células de ovário de hamster chinês)

CLAE: Cromatografia líquida de Alta Eficiência

Con-A: Concanavalina A

DCM: Diclorometano

DIC: N,N'-Diisopropilcarbodiimida

D-MEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMF: N,N-Dimetilformamida

DRX: Difractometria de raios-X

DSC: *Differential Scanning Calorimetry* (calorimetria diferencial exploratória)

EGF: Fator de crescimento epidérmico

ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

Fmoc: 9-Fluorenilmetiloxicarbonila

FT-IR: Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier

g: Força gravitacional

HOBt: N-Hidroxibenzotriazol

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

IL: Interleucina

ISO: *International Standards Organization*

LOMETS: *Local Meta-Threading-Server*

LPS: Lipopolissacarídeo

MEC: Matriz extracelular

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MHC: *Major histocompatibility complex* (complexo de histocompatibilidade principal)

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

Pbf: 2,2,4,6,7-Pentametil-diidrobenzofurano-5-sulfonila

PBS: Solução salina tamponada de fosfatos

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

Phyre2: *Protein Homology / AnalogY Recognition Engine*

q.s.p.: Quantidade suficiente para

RGD: Sequência tripeptídica constituída por Arginina-Glicina-Ácido Aspártico

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640)

SMC: *Smooth muscle cells* (células de músculo liso)

SPFS: Síntese de peptídeos em fase sólida

tBu: terc-Butila

TFA: Ácido trifluoroacético

TG: Termogravimetria

TGF- $\beta$ : Fator de transformação de crescimento beta

TIS: Triisopropilsilano

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

UniProtKB: *UniProt Knowledgebase*

UV-Vis: Ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

Resumo .....	11
Abstract.....	13
Lista de Figuras .....	14
Lista de Tabelas .....	16
Índice de abreviaturas e siglas .....	17
Sumário.....	20
I. Introdução.....	23
1.1. Celulose Bacteriana (CB) .....	24
1.2. O processo de cicatrização e a Celulose Bacteriana .....	27
1.3. Peptídeos RGD no processo de reparação tecidual.....	31
II. Objetivos.....	36
III. Material e Métodos .....	38
3.1. Delineamento experimental .....	38
3.2. Análise computacional do peptídeo RGD como ligante e docking a proteínas receptoras .....	39
3.3. Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana.....	40
3.4. Síntese Química do peptídeo RGD .....	41
3.5. Incorporação do peptídeo RGD ao suporte de celulose bacteriana .....	44
3.5.1. Adsorção (CB-RGDAds) .....	45
3.5.2. Imobilização (CB-RGDI <sub>mz</sub> ).....	46
3.6. Caracterização dos materiais .....	48
3.6.1. Ângulo de Contato .....	48
3.6.2. Difractometria de Raios-X (DRX).....	49
3.6.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
3.6.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	50
3.6.5. Análise Termogravimétrica (TG).....	50
3.6.6. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	50
3.7. Análises <i>in vitro</i> .....	51
3.7.1. Cultivo da linhagem L929.....	51
3.7.2. Ensaio de Viabilidade Celular.....	52
3.7.3. Morfologia celular.....	52
3.7.4. Animais .....	53
3.7.5. Obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal.....	54

3.7.6.	Cultura dos macrófagos peritoneais e obtenção do sobrenadante.....	54
3.7.7.	Obtenção dos esplenócitos totais .....	55
3.7.8.	Cultura das células esplênicas e obtenção do sobrenadante.....	55
3.7.9.	Determinação da produção de NO .....	56
3.7.10.	Determinação da liberação de citocinas TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ .....	56
3.7.11.	Análise estatística.....	57
IV.	Resultados e Discussão.....	59
4.1.	Análise computacional do peptídeo RGD como ligante e docking a proteínas receptoras .....	59
4.2.	Síntese Química do peptídeo RGD .....	61
4.3.	Incorporação do peptídeo RGD ao suporte de celulose bacteriana .....	65
4.3.1.	CB-RGDAds .....	65
4.3.2.	CB-RGDI <sub>mz</sub> .....	66
4.4.	Caracterização dos materiais .....	66
4.4.1.	Ângulo de Contato .....	66
4.4.2.	Difratometria de Raios-X (DRX).....	69
4.4.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	71
4.4.4.	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	73
4.4.5.	Análise Termogravimétrica (TG).....	75
4.4.6.	Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) .....	78
4.5.	Análises <i>in vitro</i> .....	79
4.5.1.	Ensaio de Viabilidade Celular.....	79
4.5.2.	Morfologia celular.....	83
4.5.3.	Determinação da produção de NO .....	86
4.5.4.	Determinação da liberação da citocina TNF- $\alpha$ .....	88
4.5.5.	Determinação da liberação da citocina IFN- $\gamma$ .....	90
V.	Conclusões.....	94
	Perspectivas futuras .....	96
	Referências .....	98
	Anexo .....	107

## *I. Introdução*

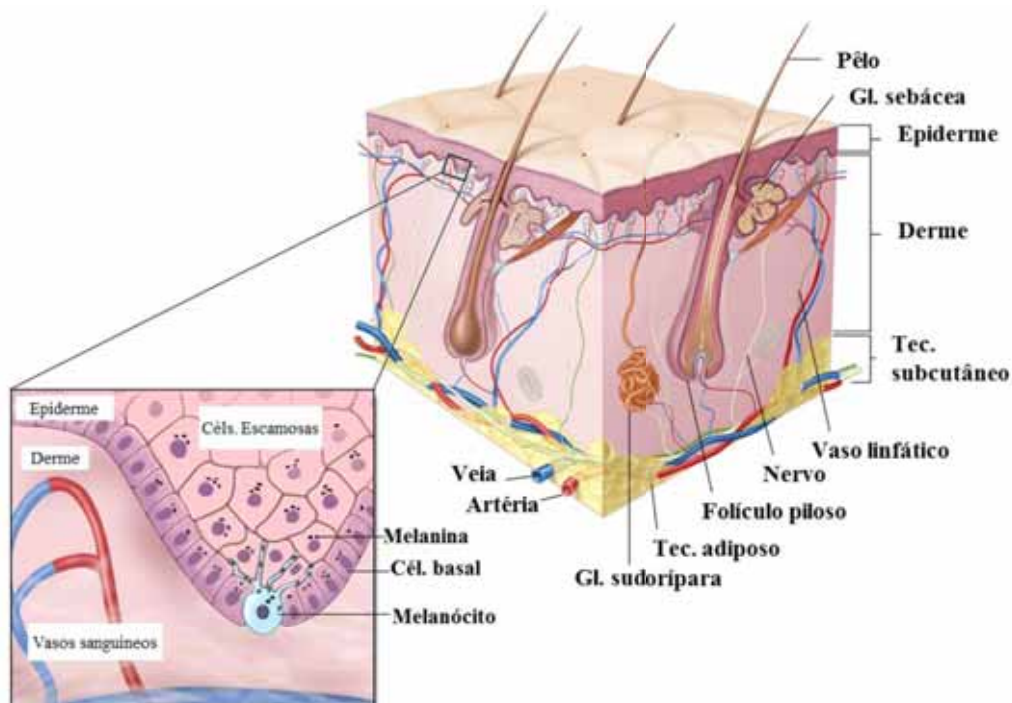
---

---

## I. INTRODUÇÃO

A pele é uma estrutura multicamadas considerada o maior órgão do corpo, atingindo de 15 a 20% da massa corpórea humana total, sendo constituída anatomicamente e funcionalmente por duas camadas, a epiderme e a derme, ilustradas na Figura 1. A hipoderme ou tecido subcutâneo é um tecido conjuntivo frouxo que conecta a pele aos órgãos subjacentes. Apresenta estruturas anexas como folículos pilosos, unhas, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A pele desempenha múltiplas funções essenciais à sobrevivência, como proteção do organismo contra atrito, penetração de materiais estranhos e perda de fluidos; atua como barreira contra perigos ambientais, como micro-organismos, radiação e alérgenos; detecta estímulos externos como pressão, dor, calor, frio, através das terminações nervosas sensitivas; contribui com a síntese de vitamina D e com a regulação térmica do organismo (JAMES et al., 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; VENTRE et al., 2009; WALTERS; ROBERTS, 2002).

**Figura 1** – Representação da estrutura da pele.



**Fonte:** Adaptado de University of Chicago Medicine (2015).

Estímulos danosos à estrutura e fisiologia da pele podem ser provocados por um amplo espectro de fatores, tais como traumas físicos, queimaduras, cortes, ressecções cirúrgicas, úlceras e podem ainda ser agudas ou crônicas.

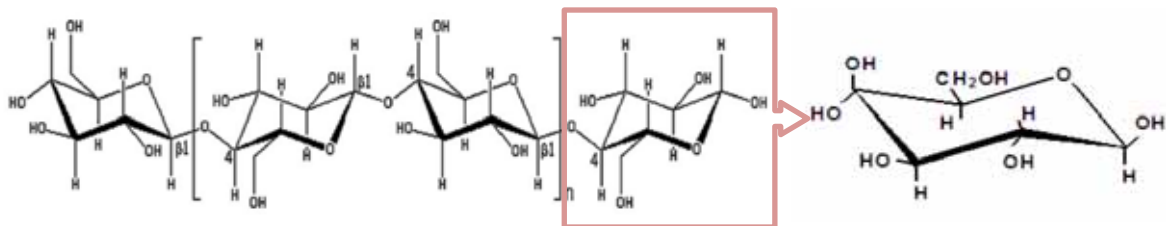
A partir destes estímulos, desencadeia-se a reparação tecidual, que é uma combinação de processos biológicos complexos e interações entre células e mediadores, envolvendo homeostasia e inflamação, quimiotaxia, migração celular, fagocitose, síntese e degradação de colágeno, angiogênese, remodelagem da matriz extracelular (MEC), contração e reepitelização. Estes processos são dependentes de fatores locais e sistêmicos, cujo objetivo final é a reconstrução dos componentes da pele para restaurar sua função e aparência (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; JAMES et al., 2009).

Em muitos casos, substitutos de pele ou curativos sintéticos podem ser necessários para reduzir o tempo estimado ou para melhorar a taxa de sucesso da reparação ou reconstrução do tecido danificado (JAMES et al., 2009). O uso de polímeros naturais ou sintéticos, entre eles a celulose bacteriana, aprimorados pela incorporação de compostos terapêuticos, está entre as principais linhas de pesquisa nesta área.

### 1.1. Celulose Bacteriana (CB)

A celulose (Figura 2) é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosose unidas em cadeias longas não ramificadas, com ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). É considerada uma matéria prima polimérica sustentável e quase inesgotável, e é sintetizada não apenas por plantas, como também por algumas bactérias, algas e fungos (KLEMM et al., 2005).

**Figura 2** – Estrutura da celulose, com detalhe para a estrutura monomérica da  $\beta$ -D-glicopiranosose.



**Fonte:** Adaptado de SHEYKHNAZARI et al. (2011).



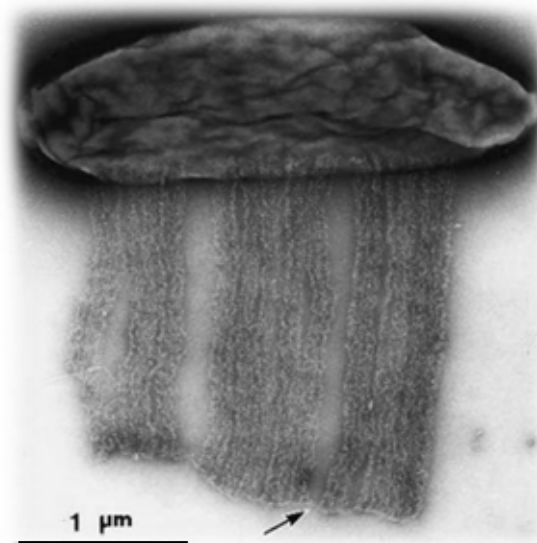
A celulose bacteriana é produzida extracelularmente por bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter* (previamente denominada *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*, com produção mais eficiente pelo gênero *Gluconacetobacter*, utilizando comumente a glicose como substrato (LEE; KIM; YANG, 2012; PHISALAPHONG; JATUPAIBOON, 2008; SHEYKHNAZARI et al., 2011).

*Gluconacetobacter sp.* (previamente denominada *Acetobacter sp.*) são bactérias gram-negativas quimioheterotróficas, estritamente aeróbias, não patogênicas, que secretam a celulose em fitas compostas de microfibrilas organizadas formando membranas, e são geralmente encontradas em frutas, vegetais, vinagre e em bebidas alcoólicas (BROWN; WILLISON; RICHARDSON, 1976; KLEMM et al., 2005). Ao selecionar substrato, condições de cultivo, aditivos e a cepa bacteriana, é possível controlar a massa molar, a distribuição da massa molar e a estrutura supramolecular da celulose produzida e, conseqüentemente, várias propriedades importantes, tais quais o curso da biossíntese, a cinética, o rendimento e os produtos metabólicos (KLEMM et al., 2005).

A síntese da CB ocorre entre as membranas externa e plasmática da bactéria, por um complexo sintetizante de celulose que começa com a uridina difosfato-glicose (UDPG), precursora da celulose. Este complexo é associado aos poros da superfície celular bacteriana, que apresentam diâmetro de aproximadamente 3,5 nm. A enzima celulose sintase catalisa a adição da UDPG ao final da cadeia de celulose em crescimento, a qual é extraída da célula como uma fibrila elementar, e então forma uma rede 3D com outras fibrilas elementares através da formação de microfibrilas e fitas. Uma única célula pode converter 100 moléculas de glicose em celulose por hora (KLEMM et al., 2005).

A Figura 3 apresenta uma micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET), obtida por Hirai, Tsuji e Horii (2002), que mostra a extrusão de várias fitas de celulose de uma célula de *Gluconacetobacter xylinus*, cultivada em meio Hestrin-Schramm.

**Figura 3** – Micrografia por MET de celulose sendo extraída de uma célula bacteriana. A seta indica que todos os filamentos estão conectados em um conjunto de cadeias de celulose.



**Fonte:** HIRAI; TSUJI; HORII (2002).

A membrana de celulose bacteriana (CB) é altamente hidratada, apresentando até 99% de água (BARUD et al., 2013; WAN et al., 2006). Quando formada em condições de cultura estática, resulta em uma estrutura tridimensional constituída de um sistema ultrafino de nano e microfibras (BARUD et al., 2013; CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; WAN et al., 2006). Devido à sua estrutura tridimensional, alta retenção de água, grande resistência mecânica e biocompatibilidade, a CB é um *scaffold* ou suporte notável para a reparação de uma grande variedade de tecidos (FU; ZHANG; YANG, 2013).

Em contraste a outros tipos de membranas sintéticas, a membrana de CB exibe uma alta estabilidade química, hidroflicidade, transparência, baixa toxicidade, é bioinerte, biocompatível, porosa, e ainda possui boa resistência mecânica (FU; ZHANG; YANG, 2013; GEYER et al., 1994; SASKA et al., 2011; WAN et al., 2006). Em relação à celulose vegetal, a CB apresenta grau de cristalinidade superior e ausência de lignina, hemiceluloses ou outros produtos biogênicos (SASKA et al., 2012; WAN et al., 2006), propriedades únicas que a tornam um biopolímero com grande potencial a ser explorado na medicina moderna, especialmente em reparação e engenharia tecidual, como curativo de ferimentos, substituto de pele e como sistema carreador de fármacos (*drug delivery*), além de funcionar como barreira contra micro-organismos em feridas e queimaduras, o que auxilia no processo de cura.

Também ameniza a dor e reduz o tempo de formação da cicatriz (BARUD et al., 2013; FU; ZHANG; YANG, 2013; SASKA et al., 2011).

A CB é constituída por dois tipos de celulose: celulose I, o polímero em forma de fita composto por cadeias paralelas de glucana  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) arrançadas uniaxialmente por forças de van der Waals, e celulose II, o polímero termicamente mais estável e amorfo, com cadeias de glucana  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) arrançadas randomicamente. Na natureza, a estrutura da celulose I é encontrada nas formas alomórficas I $\alpha$  e I $\beta$ , dependendo do arranjo das cadeias entre si. A CB apresenta maior porcentagem de celulose I $\alpha$  (MOHITE; PATIL, 2014).

Ademais, a CB apresenta grande quantidade de grupos hidroxila, que fornece vantagens como excelente permeabilidade ao vapor de água em membranas secas ao ar livre (FU; ZHANG; YANG, 2013; WAN et al., 2006).

As características da CB a tornam um material atraente para utilização nos mais diversos campos, especialmente na biomedicina e biotecnologia. Atualmente, vários trabalhos concentram-se no desenvolvimento de dispositivos biomédicos a partir da CB, como pele, vasos sanguíneos, córnea, valvas cardíacas, uretra, ossos e cartilagens artificiais. Materiais baseados em CB demonstram obter sucesso em aplicações nos campos de reparação tecidual de pele e de curativo de feridas. Uma grande quantidade de artigos e patentes foi contabilizada nos últimos anos, demonstrando a versatilidade deste material (FU; ZHANG; YANG, 2013).

## **1.2. O processo de cicatrização e a Celulose Bacteriana**

A cicatrização é um processo dinâmico que envolve complexa interação de vários tipos celulares, moléculas da matriz extracelular (MEC) e compostos solúveis, em coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos, que interagem para que ocorra a restituição tecidual (CLARK, 1996; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A formação de cicatriz cutânea depende de diversas etapas, que incluem a inflamação precoce e tardia do tecido lesionado; a formação de tecido de granulação, a reepitelização e a contração da ferida; a deposição de MEC e a remodelagem ou fase de maturação (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

A hemostasia ocorre logo após o surgimento da ferida e depende da atividade plaquetária e do endotélio lesado para ativar a cascata de coagulação. As plaquetas liberam grânulos que contêm fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanas, que atraem neutrófilos à ferida. Forma-se o coágulo, cuja função é aderir as bordas da ferida e atuar como matriz provisória para que neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais possam ingressar na ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; ROY et al., 2012).

A fase inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia mediante substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos produzem radicais livres, dentre eles o óxido nítrico (NO) e enzimas proteolíticas, que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. A ativação de células inflamatórias é crítica, especialmente para os macrófagos, que medeiam a angiogênese, fagocitam bactérias, direcionam o desenvolvimento do tecido de granulação, sintetizam e liberam NO; também são liberadas a partir da ativação de células inflamatórias enzimas, como colagenases que desbridam a ferida, e citocinas, como as interleucinas (ILs), fator de necrose tumoral (TNF), que estimulam fibroblastos a produzir colágeno e promovem angiogênese, e TGF, que estimula queratinócitos. Todos estes eventos em conjunto marcam o começo da fase proliferativa. Esta fase, por sua vez, inclui a reepitelização, a angiogênese e a formação de matriz provisional (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; ROY et al., 2012).

A reepitelização ocorre no início do reparo da ferida. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, então as células epiteliais da borda da pele começam a se proliferar e a enviar projeções para restabelecer uma barreira protetora. A angiogênese, estimulada pelo TNF- $\alpha$ , é marcada pela migração de células endoteliais e a formação de capilares (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; ROY et al., 2012).

A fase de granulação e deposição tecidual requerem nutrientes supridos pelos capilares. O estímulo para a proliferação epitelial e quimiotaxia é feito por EGF e TGF- $\alpha$ , produzidos por plaquetas e macrófagos ativados. Nesta fase, os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a

ferida, são ativados por intermédio do PDGF e começam a sintetizar colágeno e a proliferar. A expressão de PDGF por fibroblastos é amplificada por sinalização autócrina e parácrina. Macrófagos liberam TGF- $\beta$ 1, que induz os fibroblastos já presentes no local da ferida a sintetizar colágeno tipo I, e a transformar-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida. Em resposta ao PDGF, fibroblastos começam a sintetizar uma matriz provisional composta por colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina. Dentre os fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial podem ser citados o PDGF, que induz a proliferação celular, a quimiotaxia e a síntese matricial; o EGF, que estimula a epitelização; o TNF- $\alpha$ , responsável pela angiogênese e pela epitelização; o FGF, que estimula a proliferação celular e angiogênese e o TGF- $\beta$ , responsável pelo aumento da síntese matricial (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; SONNEMANN; BEMENT, 2011).

A Tabela 1 mostra um resumo das principais citocinas envolvidas no processo cicatricial, juntamente com as células que a produzem e os efeitos biológicos.

**Tabela 1** – Citocinas envolvidas no processo cicatricial, suas células produtoras e efeitos biológicos.

Citocinas	Células produtoras	Efeito biológico
IL-1 (interleucina-1)	Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos	Super-expressão de selectinas no endotélio e aumento da síntese de NOSi.
IL-8 (interleucina-8)	Macrófagos, Fibroblastos	Quimioatraente para polimorfonucleares e macrófagos.
IFN- $\gamma$ (interferon gama)	Macrófagos	Diferenciação de monócitos em macrófagos e ativação destes; aumento da síntese de NOSi.
TNF- $\alpha$ (fator de necrose tumoral alfa)	Macrófagos, Endotélio	Super-expressão de selectinas no endotélio, aumento da síntese de NOSi e supra-regulação de integrinas.
EGF (fator de crescimento epidérmico)	Plaquetas, Macrófagos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos; proliferação e quimioatração de queratinócitos.
FGF (fator de crescimento dos fibroblastos)	Macrófagos, Endotélio, Fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e queratinócitos; potente fator angiogênico.
KGF (fator de crescimento dos queratinócitos)	Fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
HGF (fator de crescimento dos hepatócitos)	Células Mesenquimais	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
VEGF (fator de crescimento vascular endotelial)	Macrófagos, Queratinócitos	Potente fator angiogênico.
PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)	Plaquetas, Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos	Quimiotaxia de polimorfonucleares; proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto; degradação do colágeno I e síntese do III.
TGF- $\beta$ (fator transformador do crescimento beta)	Plaquetas, Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos, Fibroblasto	Quimiotaxia de polimorfonucleares; síntese de NOSi; proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto; degradação do colágeno III e síntese do I; fator angiogênico.

Fonte: ISAAC et al. (2010).

A fase a seguir, de maturação e remodelagem, é clinicamente a mais importante. A principal característica desta fase é a deposição de colágeno de forma organizada. O colágeno inicialmente produzido é mais fino que o colágeno na pele sem ferimentos, e é orientado em paralelo à pele. A taxa de síntese de colágeno aumentada durante a cicatrização da ferida não ocorre apenas em decorrência da maior quantidade de fibroblastos, mas também pelo aumento na síntese de colágeno por cada célula individualmente. Com o tempo, os fios de colágeno iniciais (colágeno tipo III) são reabsorvidos e um colágeno mais espesso é produzido e organizado no decorrer das linhas de tensão. Estas mudanças resultam em uma ferida com força tênsil aumentada. Fibroblastos e leucócitos secretam colagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga. Se um indivíduo tem problemas com a deposição de matriz, então a resistência da ferida estará comprometida; se a síntese de colágeno for excessiva, isto pode resultar na formação de um quelóide ou uma cicatriz hipertrófica. O colágeno de uma cicatriz nunca será tão organizado quanto o colágeno encontrado em pele normal. Da mesma forma, a resistência da ferida nunca retorna a 100% (ROY et al., 2012; SONNEMANN; BEMENT, 2011).

O processo de restauração do tecido pode ser prejudicado por uma série de fatores ou condições patológicas como a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base como anemia, hipotireoidismo, diabetes, anormalidades venosas, infecções, entre outras, nas quais o uso de biomateriais que atuem como suportes ou substitutos de pele para auxiliar ou acelerar o processo de reparação e cura torna-se necessário (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Nestes casos, a CB aparenta ser um curativo temporário de feridas altamente eficaz, uma vez que fibroblastos e queratinócitos são capazes de aderir à celulose, sintetizar a matriz extracelular, e eventualmente formar o tecido dérmico (CZAJA et al., 2007).

Para a maioria dos materiais de reparação, uma característica importante é a capacidade de absorver exsudato durante o processo de bandagens, bem como durante a remoção da superfície do ferimento após a recuperação. Tradicionalmente, materiais para a reparação de tecido cutâneo são absorventes e permeáveis. Por exemplo, a gaze, um material de bandagem tradicional, pode aderir a superfícies de ferimento, porém pode então induzir a trauma na remoção. A capacidade de bioabsorção da CB é importante para possibilitar uma restauração aprimorada do tecido alvo no ambiente da ferida (FU; ZHANG; YANG, 2013).

O uso de CB como curativo ou suporte pode ser justificado por auxiliar no processo de reparação tecidual e cicatrização (CZAJA et al., 2006; FU; ZHANG; YANG, 2013). Além do mais, a conformação e a elasticidade de curativos de CB permitem um alto grau de aderência ao local da ferida, ainda que esteja em regiões de grande mobilidade como a face e o torso (FU; ZHANG; YANG, 2013).

A CB pode também ser infundida com células e fatores de crescimento, cultivada e implantada para induzir e direcionar o crescimento de um tecido novo e sadio. Em todos os casos, peptídeos contendo o *motif* de reconhecimento celular RGD podem ser empregados efetivamente para desencadear a adesão de células bem como para direcionar seletivamente determinados tipos celulares e provocar respostas celulares específicas (ANDRADE et al., 2010), favorecendo o processo de reparação do tecido.

### 1.3. Peptídeos RGD no processo de reparação tecidual

Em organismos multicelulares as interações célula-célula e célula-componentes da MEC circundante são mediadas por receptores de adesão celular. Entre eles, o grupo mais numeroso e versátil é o das integrinas de superfície celular, que desempenham um papel importante como moléculas de ancoragem, e também atuam em processos como cicatrização de feridas, hemostasia, diferenciação celular, embriogênese, resposta imune e outros processos biológicos (FUJIMURA et al., 2007; HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003; van der FLIER; SONNENBERG, 2001).

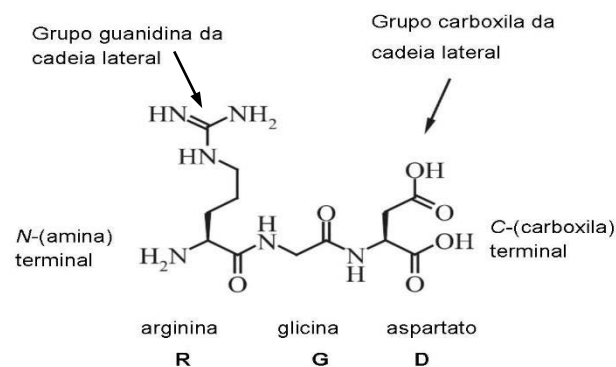
As integrinas são proteínas transmembranas e consistem de duas subunidades associadas não-covalentemente, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ . São conhecidas 18 subunidades  $\alpha$  e 8  $\beta$ , que formam 24 heterodímeros diferentes. A combinação entre as diferentes subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  determina a especificidade do ligante com a integrina (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; van der FLIER; SONNENBERG, 2001). Algumas integrinas específicas são responsáveis por intermediar o contato entre as células e a proteína fibronectina da MEC, uma glicoproteína secretada por uma grande variedade de células (FUJIMURA et al., 2007; HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003).

A sequência tripeptídica RGD (Figura 4), foi identificada em 1984 (PIERSCHBACHER; RUOSLAHTI, 1984; RUOSLAHTI, 1996) como a sequência mínima

essencial para a adesão celular em fibronectina, em um esforço para reduzir o tamanho dos ligantes macromoleculares para sequências de reconhecimento menores.

A fibronectina, por sua vez, interage via integrinas com fibroblastos, que são células responsáveis pela regulação e manutenção do tecido da derme além de atuarem na proliferação celular mesmo *in vivo* (FUJIMURA et al., 2007).

**Figura 4** – Sequência RGD, fórmula molecular e nomenclatura.



**Fonte:** Adaptado de HERSEL; DAHMEN; KESSLER (2003).

Fibroblastos são uma população heterogênea de células estruturais cuja função primária é a produção de MEC para manutenção e reparo tecidual. Com isso, os fibroblastos possuem um papel crucial não só na manutenção da integridade tecidual, mas também no processo de cura. Eles participam em desordens fibróticas (cicatrices) nos pulmões, pele e outros tecidos. A cura de feridas é um processo reparativo que resulta na restauração do tecido com perda mínima de função. Contrariamente, a fibrose é uma resposta à injúria tecidual e a resposta inflamatória resultante, que essencialmente resulta na produção anormal de MEC mediante a ativação dos fibroblastos. Os fibroblastos participam da fibrose através da diferenciação em células chamadas miofibroblastos, da produção de MEC e do recrutamento de linfócitos para o local da inflamação. Atualmente sabe-se que os fibroblastos exibem heterogeneidade fenotípica, diferenciando-se não somente entre sistemas de órgãos, mas também dentro do sítio anatômico. Subtipos de fibroblastos podem ser identificados por características morfológicas e funcionais, potencial proliferativo, capacidade biossintética e expressão de marcadores de superfície (BAGLOLE et al., 2000).

O uso de proteínas nativas como a fibronectina apresenta desvantagens em relação ao padrão de reconhecimento celular como o tripeptídeo Arginina-Glicina-Aspartato (RGD), no



que tange à aplicação médica. Dentre elas, pode-se destacar o aumento do risco de reação imune, de infecções e de transferência de patógenos, particularmente no caso de proteínas de fontes cadavéricas ou enxertos “xenos” (BELLIS, 2011; HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003). Diferentes abordagens para a melhoria de biomateriais incluem a redução de adsorção de proteínas nativas ou inespecíficas, conhecida como propriedade “*non-fouling*”, aperfeiçoamento da adsorção de proteínas específicas, e modificação de materiais pela imobilização de *motifs* de reconhecimento celular para obter interações controladas entre células e substratos sintéticos (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003).

Os sítios de adesão celular RGD foram identificados em outras proteínas da MEC além da fibronectina, incluindo vitronectina, fibrinogênio, fator de von Willebrand, colágeno, laminina, osteopontina, tenascina e sialoproteína óssea, bem como em proteínas de membrana viral, proteínas bacterianas e em venenos de serpentes (ANDRADE et al., 2010; PTAFF, 1997; RUOSLAHTI, 1996; ZHANG et al., 2010), todavia o papel central da sequência RGD no reconhecimento celular foi inicialmente inferido pela observação que um receptor de fibronectina, a integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que liga-se ao seu ligante de um forma dependente desta sequência (RUOSLAHTI, 1996). Mesmo assim, a sequência RGD não é o *motif* de reconhecimento celular universal, porém ela é única no que diz respeito à sua ampla distribuição e uso.

Os ligantes contendo RGD promovem a adesão celular na superfície de materiais modificados via interações específicas com receptores na membrana plasmática, as integrinas (ZHANG et al., 2010), e o principal responsável por esta afinidade diferenciada é o *loop* contendo RGD e seus aminoácidos flanqueados, nas respectivas proteínas (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003).

Os peptídeos de adesão podem ser usados de duas formas diferentes: quando imobilizados em uma superfície promovem a adesão celular, contudo, quando em solução, atuam como inibidores de adesão. Ambas as formas de utilizar o peptídeo têm suas aplicações. Peptídeos RGD recobertos em superfícies têm sido investigados para a melhoria da compatibilidade tecidual, e peptídeos solúveis são alvo de integrinas individuais, e mostram um potencial promissor como medicamentos no tratamento de diversas doenças (RUOSLAHTI, 1996).

Peptídeos sintéticos pequenos contendo a sequência RGD podem reproduzir a atividade ligante de integrina das proteínas de adesão. O ligante contendo RGD presente na superfície do material modificado é capaz de interagir especificamente com seus receptores na

membrana, as integrinas, sendo estas todas as integrinas  $\alpha V$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  e  $\alpha IIb\beta 3$ . É a ligação entre as integrinas e as proteínas da MEC contendo RGD que promove a migração, a adesão, o crescimento e as vias de sinalização celular (ANDRADE et al., 2010; ENWEREM; WANG; LESZCZYNSKI, 2012; ZHANG et al., 2010).

Outras sequências ligantes de integrinas apresentam em comum um aminoácido em seus *motifs*, um resíduo de ácido aspártico, que pode ser importante por seu potencial para contribuir com a ligação a um cátion bivalente. A ligação de ligantes a integrinas depende de que o ligante forneça um sítio de coordenação para a ligação ao cátion bivalente, que pode ser ativada por estímulos intra ou extracelulares (RUOSLAHTI, 1996; SEOW et al., 2002). Zhang e colaboradores (2010) estudaram o resultado de substituir o ácido aspártico do peptídeo RGD por ácido glutâmico, e perceberam diferença significativa na adesão celular, o que demonstra que a interação RGD-integrina da membrana celular é realmente muito específica.

Estudos indicam que não há uma relação simples e direta entre a concentração de RGD na superfície de um material e sua capacidade de estimular a adesão e a proliferação celular. Outros fatores, além da concentração, como a exposição, a conformação, e efeitos estéricos, podem influenciar a interação RGD-integrina. Centenas de proteínas contêm o tripeptídeo, mas a maioria não apresenta atividade de adesão celular; na verdade, apenas uma minoria das 2600 proteínas sequenciadas que contêm a sequência de RGD é funcional. Para ser funcional, a sequência RGD precisa ser exposta apropriadamente, em conformação que possa ser reconhecida por um receptor de superfície celular. Até pequenas sequências de seis aminoácidos podem não ter atividade de adesão celular se uma prolina estiver logo depois da sequência RGD (ANDRADE et al., 2010; RUOSLAHTI, 1996).

A eficácia de biomateriais, seja como substituintes de tecidos danificados, como suportes para reparação tecidual ou como curativos, baseia-se na habilidade da superfície do material em regular a adesão celular (ANDRADE et al., 2010; GOLDSTEIN, 2007). A adesão celular exerce uma função importante em vários processos biológicos básicos, incluindo guiar células para seus locais apropriados no corpo, prover ancoragem a células, e controlar a proliferação, a diferenciação e a apoptose celular (RUOSLAHTI, 1996). Desta forma, a incorporação de sítios de adesão biomiméticos, tais como peptídeos RGD, pode ser usada para promover a adesão de tipos celulares selecionados, a migração, a distribuição e a disposição celular em materiais, incluindo a celulose bacteriana (ANDRADE et al., 2010).

## *II. Objetivos*

---

---

## II. OBJETIVOS

O objetivo principal foi desenvolver membranas de celulose bacteriana (CB) funcionalizadas com peptídeo RGD e avaliá-las *in vitro* em relação à potencialidade de utilização para aplicações futuras em processos de reparação tecidual de pele.

Os objetivos específicos incluíram:

1. Obtenção de membranas de CB sintetizadas a partir da cepa *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769);
2. Síntese química de um peptídeo contendo a sequência RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico);
3. Obtenção de membranas de CB contendo o peptídeo sintetizado incorporado covalentemente e por adsorção, e caracterização físico-química para melhor entendimento da interação do peptídeo com a membrana de CB;
4. Avaliação *in vitro* da potencialidade das membranas de CB funcionalizadas, quanto à viabilidade celular ou citotoxicidade, em fibroblastos.
5. Avaliação *in vitro* da resposta imune e inflamatória para as membranas de CB funcionalizadas, quanto à produção de citocinas e de óxido nítrico.

### *III. Material e Métodos*

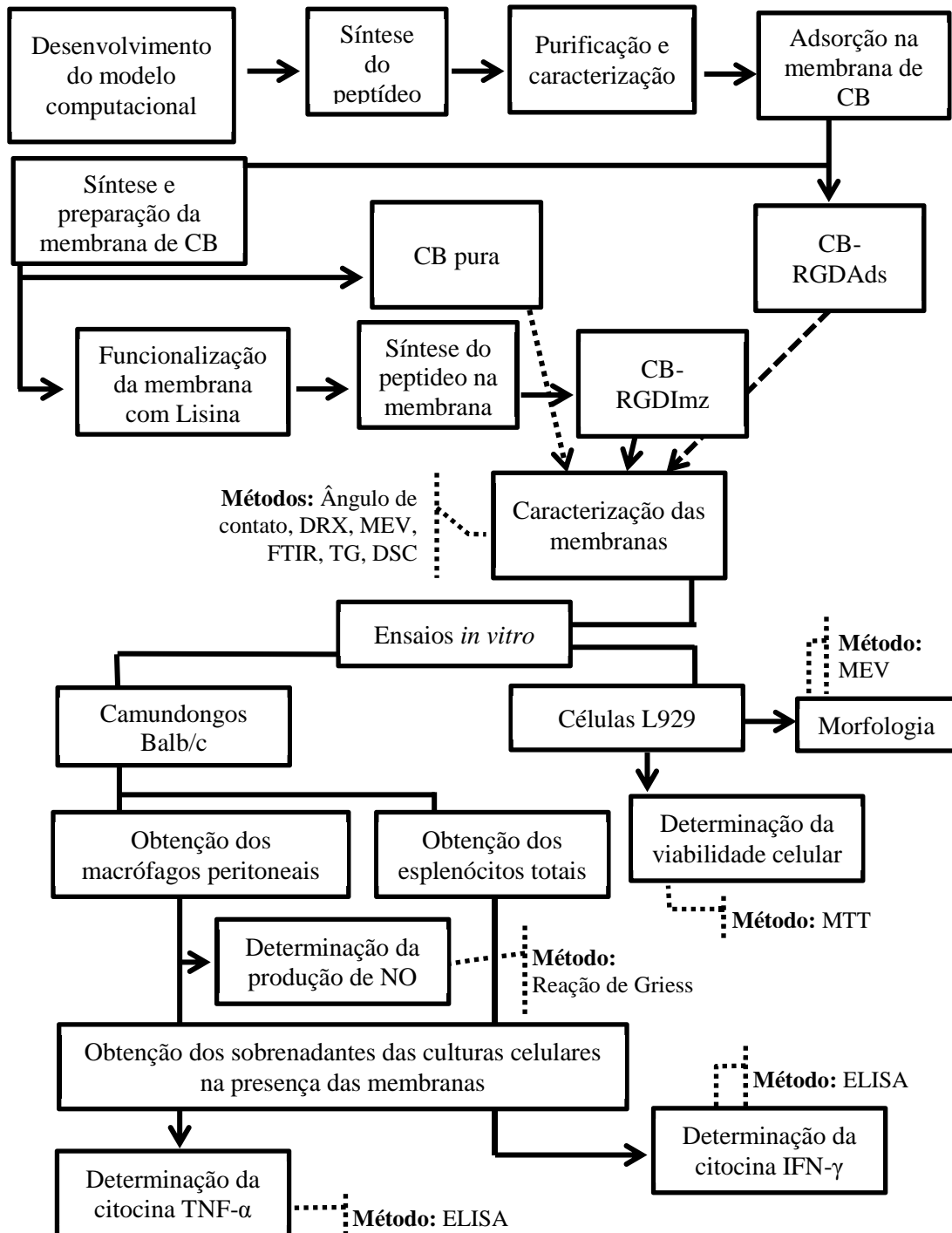
---

---

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento experimental

Figura 5 – Delineamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2. Análise computacional do peptídeo RGD como ligante e docking a proteínas receptoras

No estudo computacional realizado, três peptídeos foram tridimensionalmente modelados como possíveis ligantes empregando o do servidor LOMETS (*Local Meta-Threading-Server*), um serviço *on-line* de predição de estrutura proteica que gera modelos tridimensionais mediante a coleta de alinhamentos de modelos-alvo de maior pontuação de nove programas localmente instalados de *threading*, sendo estes: FFAS, HHsearch, MUSTER, PPA, PRC, PROSPECT2, SAM-T02, SP3, e SPARKS.

Modelou-se também uma estrutura proteica da base de dados *Protein Data Bank*, junto com outras duas frações de integrinas humanas, da base de dados UniProt KB (*UniProt Knowledgebase*) que foram utilizadas como receptores padrão. Estas foram modeladas utilizando o servidor Phyre2 (*Protein Homology / AnalogY Recognition Engine*), um serviço *on-line* de predição de estrutura tridimensional proteica que usa princípios e técnicas de modelagem por reconhecimento de homologia.

Todas estas estruturas estão relacionadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Identificação de estruturas de ligantes e receptores modelados tridimensionalmente por bioinformática.

<i>Estrutura modelada</i>	<i>Sequência peptídica/ Base de Dados</i>	<i>Descrição</i>
L1	VTGRGDSPA	Utilizada como ligante padrão; presente na sequência nativa da fibronectina humana (Fn)
L2	VWTGRGDSPA	Sequência analisada para síntese
L3	WTGRGDSPA	Sequência analisada para síntese
PA	PDB ID 3VI3	Parte da integrina $\alpha 5\beta 1$
PB	UniProtKB ID P05556	Receptor de Fn, subunidade $\beta$ (integrina $\beta 1$ )
PC	UniProtKB ID P08648	Receptor de Fn, subunidade $\alpha$ (integrina $\alpha 5$ )

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Moléculas de água foram removidas das estruturas cristalizadas e todas as estruturas tridimensionais foram então refinadas pelo servidor Chiron, o qual executa minimização de

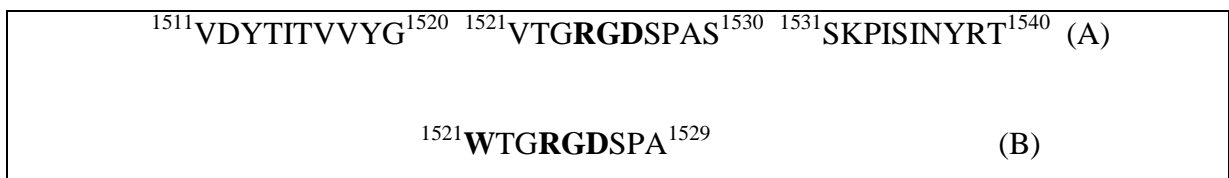
energia de moléculas proteicas através de dinâmica molecular discreta com representação de todos os átomos de cada resíduo da molécula.

Os três modelos proteicos minimizados finais foram usados como receptores de entrada para o programa de docagem molecular Autodock Vina, configurado para prover as nove melhores pontuações de afinidade entre ligantes e receptores.

As interações intermoleculares das três melhores conformações tridimensionais dos complexos docados, ou seja, das moléculas ancoradas prevendo a orientação preferencial do ligante em relação à proteína de forma a dar origem a um complexo estável, foram visualizadas, organizadas e analisadas utilizando o módulo de diagrama de interação de ligante do *software* Maestro.

A partir dos resultados obtidos a sequência derivada da fibronectina humana (Fn), especificamente os resíduos 1521 a 1529 (Figura 6), contendo o *motif* TGRGDSPA da fibronectina e a substituição do resíduo de valina 1521 por um resíduo de triptofano foi escolhida para a síntese.

**Figura 6** – Estrutura primária da região 1511-1540 da fibronectina humana (A) e da sequência peptídica escolhida para síntese (B).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 3.3. Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana

A CB foi obtida em cooperação com o Laboratório de Materiais Fotônicos, do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, com a colaboração da co-orientadora do projeto, Sybele Saska Specian.

As mantas de celulose bacteriana (CB) foram preparadas através do cultivo estático das bactérias *G. hansenii* (ATCC 23769). A composição do meio de cultura consistiu em 5% (m/v) de glicose, 0,4% (m/v) de extrato de levedura, 0,073% (m/v) de sulfato de magnésio, 0,2% (m/v) de fosfato de potássio monobásico e 2% (v/v) de etanol absoluto. A linhagem *G.*



*hansenii* foi cultivada em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo sempre 100 mL de meio com 10% (v/v) de inóculo. O frascos foram incubados a 28°C por 120 h para obtenção de membranas de 5 mm de espessura.

A celulose forma-se na interface meio de cultura-superfície com aspecto de membrana gelatinosa. As membranas foram purificadas quimicamente para remoção das bactérias, utilizando-se solução de hidróxido de sódio 2% (m/v) a 80°C por 1 h. Em seguida, as membranas foram submetidas a lavagens vigorosas com água destilada até atingir a neutralidade, e acondicionadas em água deionizada.

As membranas assim obtidas foram cortadas com auxílio de moldes de 25 mm de diâmetro interno, portanto, obtendo amostras de CB padronizadas de 5 mm de espessura com 25 mm de diâmetro.

### 3.4. Síntese Química do peptídeo RGD

O peptídeo contendo a sequência RGD (Figura 7) foi sintetizado manualmente pelo método da fase sólida - SPFS (AMBLARD et al., 2005), de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos, e derivados *tert*-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN; WHITE, 2000), em seringa de polipropileno de 5 mL, munida de um filtro de polietileno poroso, conectada a um sistema à vácuo com um frasco coletor de resíduos.

**Figura 7** – Estrutura primária do peptídeo RGD sintetizado.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Foram utilizados 517,6 mg de resina Rink-Amida MBHA, com grau de substituição inicial de 0,59 mmol.g<sup>-1</sup> (RL-RA1) como polímero de partida. O uso da Rink-Amida resina na síntese de RL-RA1 justifica-se pelo fato de que, ao final da síntese, o peptídeo produzido apresenta um grupamento amida na extremidade C-terminal, simulando uma ligação peptídica

nesta região, uma vez que o resíduo da extremidade C-terminal deste peptídeo corresponde a um resíduo interno da sequência da fibronectina. Segundo Ruoslahti (1996), os resíduos de aminoácidos no lado C-terminal da sequência RGD aparentam ser mais significativos na ligação à integrina do que os no lado N-terminal. A mesma justificativa se aplica no caso da acetilação, ao final da síntese, do resíduo de triptofano N-terminal. O objetivo é obter uma sequência peptídica sem carga efetiva nos resíduos terminais.

O resíduo de triptofano foi introduzido na sequência em substituição à valina para que o peptídeo pudesse ser detectado por espectroscopia de fluorescência, se necessário.

Como agentes de condensação foram empregados N,N'-diisopropilcarbodiimida / 1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt). Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar de 3 vezes em relação à quantidade de resina de partida, tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação, inicialmente em diclorometano:N,N-dimetilformamida (DCM:DMF) (1:1), por um período de 2 h. A desproteção dos grupos  $\alpha$ -amínicos (remoção do grupo base-lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF.

A acetilação de RL-RA1 foi realizada empregando anidrido acético e Diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF, por 60 min.

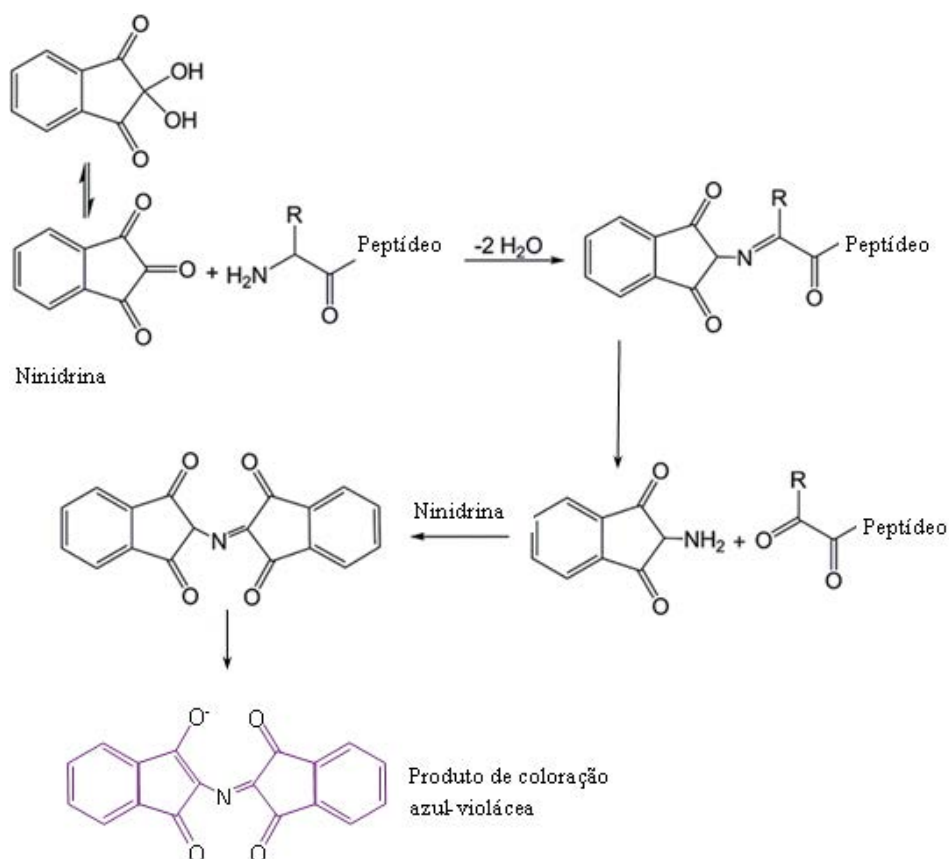
A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (presença de grupos amino livres, esquematizada na Figura 8), o processo foi repetido com metade da quantidade inicial dos reagentes.

A clivagem final do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foram efetuadas pelo tratamento da respectiva peptidil-resina com uma solução de clivagem contendo TFA (95%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (2,5%), em temperatura ambiente não controlada por 2 h.

O peptídeo, denominado bruto, foi precipitado por centrifugação a  $22.360 \times g$  por 5 min e lavado com éter dietílico gelado (cinco vezes), dissolvido em água deionizada contendo 0,045% de TFA (v/v), extraído e posteriormente liofilizado.

Uma pequena fração de cada peptídeo bruto liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa em CLAE, em escala analítica.

**Figura 8** – Reação dos amino grupos livres dos aminoácidos com a ninidrina, produzindo um composto de coloração azul-violácea.



**Fonte:** Adaptado de PALOMO (2014).

As condições relativas à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa foram determinadas a partir do tempo de retenção e a porcentagem de solvente observados no cromatograma obtido.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do peptídeo sintetizado foi realizada utilizando as seguintes condições:

- Analítica, em um cromatógrafo Shimadzu, em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Phenomenex Jupiter (150 × 4,6 mm), diâmetro da partícula de 5 μm e porosidade de 300 Å. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura. As condições cromatográficas gerais incluíram os solventes A, constituído por água contendo 0,045% de TFA, e B constituído por acetonitrila contendo 0,036% de TFA, em

gradiente de 5 a 95% de B em 30 min, fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e comprimento de onda do detector de 220 nm.

- Semi-preparativa, em um aparelho Beckman, com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Phenomenex Jupiter 5 μm (250 × 10 mm), diâmetro da partícula de 5 μm e porosidade de 300 Å. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e água ultrapura. As condições cromatográficas gerais empregaram os solventes A, constituído por água contendo 0,045% de TFA, e B constituído por acetonitrila contendo 0,036% de TFA, em gradiente de 5 a 45% de B em 90 min com fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup>, com comprimento de onda do detector de 220 nm.

A caracterização do produto após purificação foi feita através da determinação da massa molecular, pela identificação e a confirmação do pico com massa molecular correspondente ao valor teórico do peptídeo puro, empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/ESI-MS), utilizando espectrômetro de massas Bruker Amazon SL, em modo de ionização positivo (ES-MS positivo).

A análise de aminoácidos a partir de hidrólise também foi realizada, utilizando 1 mL de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup> e 1 mg de peptídeo, a 110°C por 72 h, sob agitação. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido em tampão de diluição citrato de sódio 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, e filtrado em unidade filtrante GV Millex da Millipore antes de ser injetado no analisador Shimadzu LC-10A/C-47A com método de funcionalização pós-coluna usando orto-ftalaldeído (OPA). O sistema foi calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de eluição de cada aminoácido e o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra.

### 3.5. Incorporação do peptídeo RGD ao suporte de celulose bacteriana

A incorporação do peptídeo RGD à membrana de CB foi executada de duas maneiras: por adsorção e por imobilização, com a finalidade de comparar o desempenho das amostras nos ensaios *in vitro*.

### 3.5.1. Adsorção (CB-RGDAds)

A incorporação do peptídeo RL-RA1 foi realizada pelo processo de adsorção. Por este processo o peptídeo interage à CB por ligações de hidrogênio, cuja liberação ocorre com a elevação da força iônica do meio (condições biológicas).

Nesta etapa, as membranas foram submetidas a diversas lavagens com água deionizada; posteriormente o excesso de água foi removido.

Preparou-se uma solução aquosa contendo o peptídeo RL-RA1 livre, em concentração teórica de  $0,428 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Uma alíquota da solução foi retirada para análise em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1601PC duplo feixe, em comprimento de onda fixo de 280 nm, com cubetas de quartzo de caminho óptico de 10 mm, na região de máxima absorção do triptofano, presente no peptídeo. A partir da absorbância obtida, foi possível calcular a concentração real da solução, de acordo com a Lei de Lambert Beer:

$$A = \varepsilon . b . c$$

A = Absorbância da amostra

$\varepsilon$  = Coeficiente de extinção molar teórico (absortividade molar)

c = Caminho óptico

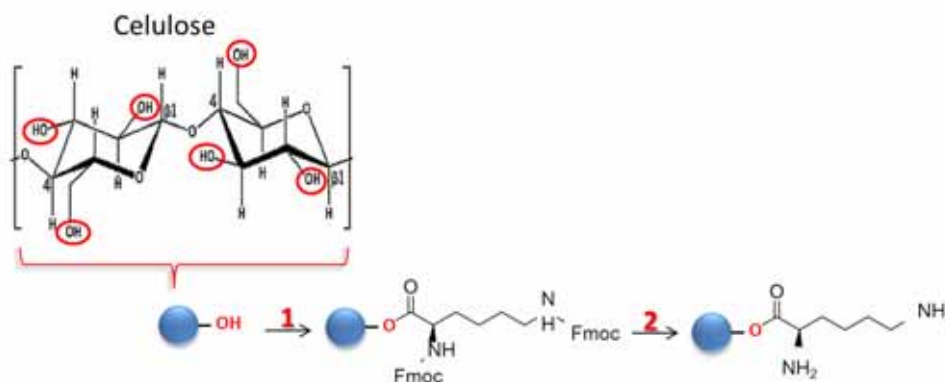
Sendo o coeficiente de extinção molar do triptofano, o único aminoácido cromóforo presente na molécula, equivalente a  $5690.n$  ( $n=1$ , número de resíduos de triptofano), foi possível determinar a concentração inicial real do peptídeo na solução como  $0,367 \text{ mmol.L}^{-1}$ . As membranas foram então imersas nesta solução por 72 h, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Ao final deste período, as membranas foram lavadas duas vezes suavemente, com um volume de 150 mL de água deionizada para remoção do excesso de peptídeo não adsorvido da superfície da membrana. Esta água foi recuperada e submetida à nova análise espectrofotométrica. A diferença entre a concentração inicial do peptídeo em solução e a concentração da água recuperada após lavagens da membrana resultou na concentração de peptídeo adsorvido.

### 3.5.2. Imobilização (CB-RGDImz)

A imobilização do peptídeo RGD na membrana de CB foi antecedida por uma etapa de funcionalização da membrana com o aminoácido lisina.

Para isso, inicialmente o excesso de água da CB foi removido. Posteriormente, as membranas foram imersas em dimetilformamida (DMF) por 48 h a 4°C. Depois de completada a troca, realizou-se a modificação da superfície da CB pela esterificação das hidroxilas livres da celulose e acoplamento do aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc), representado na Figura 9 (reação 1), e em seguida a desproteção dos grupos amínicos através da retirada dos grupos Fmoc (reação 2), no intuito de disponibilizar maior número de grupamentos amino livres, aumentando os sítios disponíveis para o crescimento da cadeia peptídica.

**Figura 9** – Esquema da modificação de superfície da membrana de CB. **Reação 1:** esterificação das hidroxilas da CB e acoplamento do Fmoc-Lys(Fmoc). **Reação 2:** Desproteção dos grupamentos amino.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Para a reação de esterificação foram utilizados os seguintes reagentes: Fmoc-Lys(Fmoc) 100 mmol.L<sup>-1</sup>; 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (Sigma) 124,9 mmol.L<sup>-1</sup>; e 127 µL N-metilimidazol (NMI) (Fluka) em de DMF. O tempo de acoplamento foi em média de 2 h à temperatura ambiente não controlada. Após a reação foram realizadas várias lavagens com DMF e posterior imersão em DMF por 24 h para remoção completa do excesso de reagentes.

A incorporação da Fmoc-Lys(Fmoc) às membranas de CB foi quantificada através da análise espectrofotométrica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) pela liberação do grupo cromóforo Fmoc em solução de piperidina. Para tal, empregou-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1601PC duplo feixe, em comprimento de onda fixo de

290 nm, região de máxima absorção dos derivados de fluoreno, e cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm e solução recém-preparada de piperidina 20% (v/v) em DMF.

Uma amostra de aproximadamente 1 mg de cada uma das membranas foi colocada no interior de uma cubeta, seguido da adição de cerca de 1,5 mL da solução de piperidina. Após agitação por cerca de 2 min efetuou-se a leitura espectrofotométrica, contra o branco da solução de piperidina no qual a amostra foi omitida. O processo de agitação e leitura foi repetido até a constância do valor de absorbância final, utilizado para o cálculo do grau de incorporação (GI) da Lisina às amostras de celulose, segundo a equação abaixo.

$$GI \left( \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{(A_{\text{amostra}})}{(1,65 \times m_{\text{amostra}})}$$

GI = Grau de incorporação em  $\text{mmol.g}^{-1}$

$A_{\text{amostra}}$  = Absorbância da amostra

$m_{\text{amostra}}$  = Massa da amostra em mg

O grau de incorporação foi considerado baixo, por esta razão um segundo resíduo de lisina foi incorporado. Desta forma, foi realizada a desproteção dos grupos  $\alpha$ -amínicos (retirada do grupo Fmoc – Figura 9), nas diferentes amostras, empregando uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF por 1 h à temperatura ambiente. Decorrida a desproteção, sucessivas lavagens com DMF foram realizadas para remoção do excesso da solução de piperidina, seguido de lavagens com DMF, procedendo-se em seguida à incorporação de um novo resíduo de Lisina, empregando-se novamente o derivado Fmoc-Lys(Fmoc) e as mesmas condições anteriores. Ao final do período de acoplamento (*overnight*) foi realizada nova quantificação do teor de lisina total incorporada. Considerando o resultado obtido mais adequado, procedeu-se com a desproteção dos grupos amina da lisina recém-incorporada com uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF por 2 h sob agitação constante. Decorrida a desproteção, as amostras foram lavadas com DMF, para continuidade da síntese do peptídeo RGD por imobilização em membrana.

A massa média inicial das membranas de CB foi de 0,4420 g. A partir deste valor e do GI médio ( $0,0143 \text{ mmol.g}^{-1}$ ), calculou-se o fator para acoplamento dos aminoácidos em 0,6 mmol, empregando um excesso molar de 3 vezes tanto para os Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, em relação à quantidade de lisina incorporada à CB.

A síntese do peptídeo RGD foi realizada ancorada à celulose bacteriana funcionalizada com Lisina, conforme protocolo descrito na Tabela 3.

A desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada pelo tratamento de cada uma das membranas com 120 mL de solução A (TFA 90%, TIS 3%, Fenol 1%, DCM 4% e água deionizada 2%) durante 30 min, posteriormente mais 120 mL de solução B (TFA 50%, TIS 3%, Fenol 1%, DCM 2% e água deionizada 44%), por 2 h.

Decorrida a desproteção, as amostras foram excessivamente lavadas com DMF, seguido por lavagens com água ultrapura a vácuo para troca de solventes.

**Tabela 3** – Protocolo de síntese em membrana utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc).

<i>Reagente/solvente</i>	<i>Operação</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Número de ciclos</i>
DMF	Lavagem	30	3
Anidrido acético 20% (v/v) em DMF	Acetilação	60	1
Piperidina 20% (v/v) em DMF	Desproteção	60	1
DMF	Lavagem	30	4
Fmoc-aa-OH (1eq) + HOBt (1eq) + DIC (1 eq) em DMF	Acoplamento	<i>Overnight</i>	1

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Todas as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz foram secas em molde prensado a 37°C e acondicionadas em envelopes apropriados, e foram esterilizadas com radiação gama a 25 KGy pela empresa Embrarad (Cotia- SP).

### 3.6. Caracterização dos materiais

#### 3.6.1. Ângulo de Contato

A mensuração de ângulo de contato foi realizada no Laboratório de Físico-Química de Materiais do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, utilizando um



equipamento Dataphysics Contact Angle System (KSV Instruments LTD, Finland), operado em ar à temperatura ambiente e munido de câmera CCD (*Charge Coupled Device*). Empregou-se o método de gota sésil para determinar a molhabilidade das membranas de CB pura, CB-RGDAds e CB-RGDImz, ou seja, o caráter hidrofílico ou hidrofóbico das mesmas. A gota sésil foi dispensada com o auxílio de uma seringa, com agulha de 0,5 mm de diâmetro e volume controlado de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  de água deionizada por gota. O ângulo de contato estático foi medido imediatamente após a dispensação da gota ( $T=0\text{s}$ ), em diferentes pontos da superfície das amostras. As imagens das gotas sésseis foram analisadas utilizando o *software* Drop-Shape Analysis SCA20. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.6.2. *Difratometria de Raios-X (DRX)*

A determinação da estrutura cristalina a partir de padrões de raios-X foi realizada no Laboratório Computacional de Análises Cristalográficas e Cristalinas (LabCACC) do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, empregando um difratômetro Rigaku Rint 2000 (Ânodo Rotatório), com filtro de níquel e radiação de Cu ( $K\alpha$ ), com varredura angular entre  $5^\circ$  a  $80^\circ$  ( $2\theta$ ) com passo de 0,02 s e  $5^\circ.\text{min}^{-1}$ . As amostras CB pura, CB-RGDAds e CB-RGDImz foram fixadas sobre um suporte de vidro. Os difratogramas foram tratados utilizando o *software* OriginPro 8 SR0, v8.0724 (B724), da OriginLab Corporation, para efetuar a normalização das intensidades.

### 3.6.3. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As micrografias das amostras foram realizadas para a análise morfológica de superfície e verificação da estrutura fina da CB pura, da CB-RGDAds e da CB-RGDImz. As amostras foram recobertas por uma camada de ouro de espessura de 6 nm (20 s, tensão de 3 Kv e corrente de 15 mA). As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico da marca FEI, modelo Magellan 400 L, com detector da marca EDAX e modelo Apolo X (Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE - da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, SP). O parâmetro de tensão utilizado foi de 2.00 kV. Para a análise das micrografias,

utilizou-se o programa ImageJ 1.48v, com calibração de 0,343 pixels.nm<sup>-1</sup> para todas as amostras.

#### ***3.6.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)***

As análises foram realizadas no Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, SP, e os espectros de FT-IR foram coletados em um equipamento Thermo Scientific Nicolet IS5, módulo de iD1 transmissão, resultado em % de Transmitância com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>, com acúmulo de 20 varreduras, na faixa de varredura de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>. As amostras de CB pura, CB-RGDAds e CB-RGDImz foram preparadas em pastilhas de KBr na proporção amostra:KBr de 1:100 em massa. Para confecção das pastilhas as amostras foram picotadas e maceradas.

#### ***3.6.5. Análise Termogravimétrica (TG)***

A análise de TG foi realizada no Laboratório Multiusuários de Caracterização Físico-Química de Materiais do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, utilizando um equipamento SDT Q600 (TA-Instruments). As amostras de CB pura, CB-RGDAds e CB-RGDImz foram aquecidas em cadinho de alumina, da temperatura ambiente até 800°C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 100 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. A partir dos dados coletados, foi calculada a porcentagem de perda de massa, através do *software* OriginPro 8 SR0, v8.0724 (B724), da OriginLab Corporation, e efetuada a interpolação da % de perda de massa das amostras em função da temperatura.

#### ***3.6.6. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)***

O estudo de calorimetria diferencial exploratória (*DSC: Differential Scanning Calorimetry*) foi realizado no Laboratório Multiusuários de Caracterização Físico-Química de

Materiais do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, utilizando um equipamento DSC modelo 2910 MDSC TA Instruments. As medidas foram realizadas em recipientes de alumínio herméticos, sob as seguintes condições: atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 40 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. O aquecimento foi feito da temperatura inicial de 30°C para a temperatura final de 600°C. Como referência utilizou-se recipientes de alumínio vazios.

### 3.7. Análises *in vitro*

#### 3.7.1. *Cultivo da linhagem L929*

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados no laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus de Araraquara, SP, utilizando células (fibroblastos) da linhagem tumoral de fibrossarcoma de tecido conjuntivo murino (clone L929). A linhagem L929 escolhida para o ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular, bem como a análise morfológica e de adesão celular, está de acordo as normas ISO 10993-5:2009 (INTERNATIONAL..., 2009), que regula os testes *in vitro* de citotoxicidade para dispositivos biomédicos.

As células L929 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, Sigma) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma), gentamicina a 4 mg.100 mL<sup>-1</sup> de meio de cultura, penicilina a 1 µL.mL<sup>-1</sup> de meio de cultura e estreptomicina a 1 µL.mL<sup>-1</sup> de meio de cultura, sendo o meio assim composto denominado D-MEM completo (D-MEM-C). Os repiques foram realizados uma vez por semana, sendo que as células foram desprendidas da garrafa de cultura estéril (Corning, Inc.) utilizando-se uma solução padrão de tripsina (Sigma), e a troca do meio de cultura realizada a cada dois dias. As células foram então centrifugadas em centrífuga refrigerada (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.) a 400 × g por 10 min a 4°C, depois ressuspensas em 1 mL de meio D-MEM-C e contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) pelo método de exclusão do Azul de Trypan a 0,04%. Estas células foram utilizadas para o ensaio de viabilidade celular e para a análise morfológica através de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

### 3.7.2. *Ensaio de Viabilidade Celular*

A análise de viabilidade celular e citotoxicidade foi realizada através do método colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio, Sigma), baseado na medida quantitativa da formação de cristais de formazana (cor púrpura) a partir da reação de redução do sal de brometo por proteinases mitocondriais ativas apenas em células viáveis.

As células foram semeadas em densidade celular de  $5 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> sobre as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz em uma placa de cultura estéril de 96 poços (Corning, Inc.). O controle positivo foi feito com amostras em meio de cultura D-MEM-C e o controle negativo com apenas as células em meio de cultura D-MEM-C. As placas de cultura foram incubadas por períodos de 3, 7 e 10 dias em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific), com troca do meio de cultura a cada dois dias. Após cada respectivo período de incubação, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 100 µL de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) estéril para lavagem e remoção de células mortas suspensas. Esta solução foi descartada e foram então adicionados 200 µL de uma solução de MTT a 10,0 mg.mL<sup>-1</sup> diluída em PBS e meio D-MEM na proporção 1:4. Cada placa foi incubada por mais 4 h nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, as membranas foram cuidadosamente transferidas para poços vazios com o auxílio de uma pinça, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico para dissolução dos cristais de formazana formados. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/Visível com filtro de 540 nm e filtro de referência de 620 nm. Quando necessário, foram realizadas diluições adicionais equivalentes de todos os sobrenadantes com álcool isopropílico. Os testes foram realizados em triplicata, em períodos diferentes.

### 3.7.3. *Morfologia celular*

A análise de adesão e morfologia celular das células L929 foi realizada por MEV. As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico da marca Philips, modelo XL30TMP, no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos, SP. O parâmetro de tensão utilizado foi de 5.00 kV. Para a análise das micrografias,

utilizou-se o programa ImageJ 1.48v, com calibração de  $0,343 \text{ pixels.nm}^{-1}$  para todas as amostras.

As células L929 com a densidade celular de  $5 \times 10^4 \text{ células.mL}^{-1}$  em meio de cultura D-MEM-C foram plaqueadas sobre as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub> em placas de cultura estéril de 96 poços (Corning, Inc.) e incubadas pelo período de 7 dias. Após o período de incubação, foram submetidas a procedimentos de preparação para MEV. Para tanto, as células foram fixadas com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído 2% em meio de cultura D-MEM por poço, por 30 min à temperatura ambiente. Depois deste período, esta solução foi descartada e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão cacodilato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em glutaraldeído 2% em cada poço, então as placas foram incubadas *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte, após o descarte da solução anterior, prosseguiu-se à etapa de desidratação das amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub> com células L929, iniciada pela lavagem com 200  $\mu\text{L}$  de água deionizada por 5 min, por 3 vezes. Após a última lavagem, a água deionizada foi descartada, e foi feita uma sequência sucessiva de incubações em 200  $\mu\text{L}$  por poço, cada incubação por um período de 10 min, em gradiente de álcool 25%, 50%, 75%, 95% e álcool absoluto, intermediadas pelo descarte da solução anterior. Terminada a desidratação, as placas foram colocadas em dessecador de vidro conectado a uma bomba de vácuo e submetidas à secagem por 15 min. Após este procedimento, o dessecador com as placas foi vedado e transportado para o LCE da UFSCar, para que as amostras fossem recobertas por uma camada de ouro de espessura de 6 nm (20 s, tensão de 3 Kv e corrente de 15 mA), para finalizar a preparação dos materiais para a análise por MEV.

#### 3.7.4. Animais

Foram utilizados 10 camundongos machos, Balb/c, pesando entre 18 e 25 g, com aproximadamente 4 semanas de idade, procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP, Campinas, São Paulo. Estes animais foram mantidos em gaiolas em grupos de 5, com condições ambientais estáveis de temperatura e umidade ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $56 \pm 2\%$  de umidade relativa do ar) e ciclos de claro e escuro de 12 h. Os animais receberam água e ração (Purina) esterilizadas, *ad libitum*, e foram eutanasiados em câmara de  $\text{CO}_2$ . Os animais foram divididos em dois grupos, com 5 animais em cada, no 1º grupo foram extraídos os macrófagos do exsudato peritoneal e no 2º grupo os esplenócitos totais do baço.

O protocolo para uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp, parecer Comitê de Ética nº 09/2015 (Anexo 1).

Os ensaios que envolveram os camundongos consistiram na determinação da produção de óxido nítrico e de citocinas, a partir de macrófagos do exsudato peritoneal e esplenócitos, todos eles realizados no laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus de Araraquara, SP.

### ***3.7.5. Obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal***

Os animais foram inoculados com 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3% (Difco) 72 h antes da coleta das células. Após este período, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. A pele da região abdominal foi retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Foram inoculados 5 mL de solução de PBS estéril gelada, pH 7,4, na cavidade abdominal, aplicando-se leve massagem para estimular a liberação das células peritoneais. O líquido resultante foi colhido através de agulha e seringa, transferido para tubo cônico estéril de 15 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a  $700 \times g$  por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). O sedimento celular foi lavado 3 vezes com 3 mL de PBS estéril, e após a última lavagem ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2 $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) a  $2 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, penicilina 100 U.mL<sup>-1</sup> (Sigma), estreptomicina 100 U.mL<sup>-1</sup> (Sigma), L-glutamina 2 mmol.L<sup>-1</sup> (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cutilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640C) para a contagem de células em câmara de Neubauer pelo método de exclusão do Azul de Trypan a 0,04%. A concentração de células foi ajustada para  $5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> em RPMI-1640C para a realização dos testes propostos.

### ***3.7.6. Cultura dos macrófagos peritoneais e obtenção do sobrenadante***

Após a obtenção das células do exsudato peritoneal, os macrófagos foram plaqueados na concentração de  $5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> sobre as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub> em placas de cultura de 96 poços (Corning, Inc.). Como controle positivo foi utilizado LPS

( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e apenas as células em meio RPMI-1640C como controle negativo, com incubação em estufa com tensão constante de 5% de  $\text{CO}_2$  (Forma Scientific) a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Posteriormente, os sobrenadantes obtidos das placas foram transferidos para microtubos estéreis (Eppendorf), centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min a  $20.817 \times g$ . Os sobrenadantes das culturas foram coletados, uma alíquota foi utilizada para a determinação da produção de óxido nítrico, e outra alíquota foi estocada em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da dosagem da citocina TNF- $\alpha$ . O ensaio foi realizado em duplicata por animal.

### ***3.7.7. Obtenção dos esplenócitos totais***

Os animais foram eutanasiados e tiveram o peritônio exposto conforme descrito no subitem 3.7.5. O peritônio foi aberto para a extração do baço, que foi macerado em malha de nylon em uma placa de Petri estéril contendo 3 mL de RPMI-1640-C gelado, para a liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado por seringa para obtenção de uma suspensão celular homogênea. As células foram então transferidas para tubo cônico estéril de 15 mL e centrifugadas em RPMI-1640-C três vezes a  $400 \times g$  por 5 min (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). Após a última lavagem as células foram novamente ressuspensas em mais 1 mL de meio RPMI-1640-C em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) pela técnica de exclusão com azul de Trypan a 0,04%. As suspensões celulares foram então ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^6$  células.mL $^{-1}$  para realização do ensaio de determinação da citocina IFN- $\gamma$ .

### ***3.7.8. Cultura das células esplênicas e obtenção do sobrenadante***

As suspensões celulares obtidas contendo células esplênicas na concentração de  $5 \times 10^6$  células.mL $^{-1}$  foram plaqueadas sobre as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI $\text{mz}$  em placas de cultura de 96 poços (Corning, Inc.), utilizando Concanavalina A (Con-A) na concentração de  $0,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como controle positivo e somente as células em meio de cultura RPMI-1640-C como controle negativo, com incubação em estufa com tensão constante de  $\text{CO}_2$  de 5% (Forma Scientific) a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Após este período os sobrenadantes obtidos das placas foram transferidos para microtubos estéreis (Eppendorf), centrifugados em

centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C durante 10 min a  $20.817 \times g$ , coletados, alíquotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da dosagem de citocina. O ensaio foi realizado em duplicata por animal.

### 3.7.9. *Determinação da produção de NO*

O óxido nítrico (NO) foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no sobrenadante da cultura de células do exsudato peritoneal, através da reação de diazotização com o reagente de Griess, composto por 58,07  $\text{mmol.L}^{-1}$  de sulfanilamida (Merck), 3,86  $\text{mmol.L}^{-1}$  de dicloro N-(1-naftil)-etilenodiamina (Merck), 47,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p. 100 mL (GREEN et al., 1982).

Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal foram transferidas para nova placa de cultura de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.), foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess, e então as células foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Microplate Reader, Ascent, Labsystems) com filtro de 540 nm. A concentração de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foi calculada a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio, e os valores foram expressos em  $\mu\text{mols}$  de nitrito/ $5 \times 10^5$  células (GREEN et al., 1982). O ensaio foi realizado em duplicata por animal.

### 3.7.10. *Determinação da liberação de citocinas TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$*

A citocina TNF- $\alpha$  foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais, enquanto que o IFN- $\gamma$  foi quantificado no sobrenadante da cultura de células esplênicas através de testes imunoenzimáticos ELISA de captura (eBioscience), de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 poços (Corning Inc.) foram adsorvidas com 100  $\mu\text{L}$  por cavidade de anticorpo monoclonal de captura (anti-citocina purificada de camundongo), na concentração adequada para cada citocina em PBS, pH 7,2, e incubadas *overnight* à temperatura ambiente.



No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T), e posteriormente bloqueadas com 200  $\mu\text{L}$  por poço de diluente de ensaio (tampão PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado, pH 7,2 - 7,4), à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100  $\mu\text{L}$  do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testadas. As placas foram novamente incubadas à temperatura ambiente por 120 min, e lavadas 5 vezes com PBS-T. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  em cada poço de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de ensaio (1% BSA, 0,05% de Tween 20 em PBS, pH 7,2-7,4). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por mais 60 min e lavadas outras 5 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100  $\mu\text{L}$  por poço do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído em diluente de ensaio do fabricante e incubadas novamente à temperatura ambiente por 60 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e em seguida adicionados 100  $\mu\text{L}$  do substrato [10  $\text{mmol.L}^{-1}$  de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4  $\text{mmol.L}^{-1}$  de tetrametilbenzidina (Sigma) e 1,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mallinckrodt Chemical)] a cada poço e incubadas por 30 min em temperatura ambiente, ao abrigo de luz. A reação foi interrompida adicionando-se 50  $\mu\text{L}$  por poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1  $\text{mol.L}^{-1}$ . A absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems), com filtro de 450 nm e filtro de referência de 570 nm, e as concentrações de cada citocina foram quantificadas mediante curva padrão, estabelecida a partir de quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em  $\text{pg.mL}^{-1}$ .

### ***3.7.11. Análise estatística***

A análise estatística dos resultados foi realizada empregando o programa estatístico GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software, Inc.), no qual aplicou-se a análise de variância (ANOVA) fator único, com teste de Tukey como pós-teste e determinação do nível de significância para  $p < 0,05$ .

## *IV. Resultados e Discussão*

---

---

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise computacional do peptídeo RGD como ligante e docking a proteínas receptoras

Existem três métodos de predição de estrutura proteica, a modelagem por homologia, a modelagem via *threading* ou *fold recognition*, e *ab initio*, também chamado de *free modeling* ou *de novo*.

A modelagem por homologia é geralmente o método utilizado quando é clara a relação entre a sequência da proteína alvo e pelo menos uma estrutura conhecida. Ela considera que domínios em sequências proteicas são entidades que têm evoluído gradualmente e podem ser agrupados em um número relativamente pequeno de famílias de domínios com sequência e estrutura semelhantes. Deste modo, estes relacionamentos evolucionários permitem o uso do método computacional por homologia para prever a estrutura de sequências proteicas baseado na similaridade com estruturas conhecidas (BARCELLOS et al., 2008).

A modelagem por *threading* utiliza o alinhamento de sequências para desenvolver um modelo. Para proteínas que apresentam relação evolutiva remota, ainda que a similaridade entre as sequências seja difícil de detectar, pode haver uma similaridade estrutural, e o alinhamento das estruturas aparentemente é capaz de identificar pares de proteínas homólogas com menos de 10% de similaridade entre sequências (BRENNER; CHOTHIA; HUBBARD, 1998).

A metodologia *ab initio* tem como objetivo prever a estrutura tridimensional de uma proteína, sua estrutura nativa, partindo da sequência de aminoácidos. Geralmente admite-se que a sequência proteica se arranja em uma conformação nativa ou em um conjunto de conformações que está próximo ou no mínimo global de energia livre. Para isso, realiza uma busca no espaço conformacional a fim de encontrar a estrutura, ou as estruturas mais apropriadas, as quais são assumidas como sendo as que possuem menor energia livre (HARDIN; POGORELOV; LUTHEY-SCHULTEN, 2002).

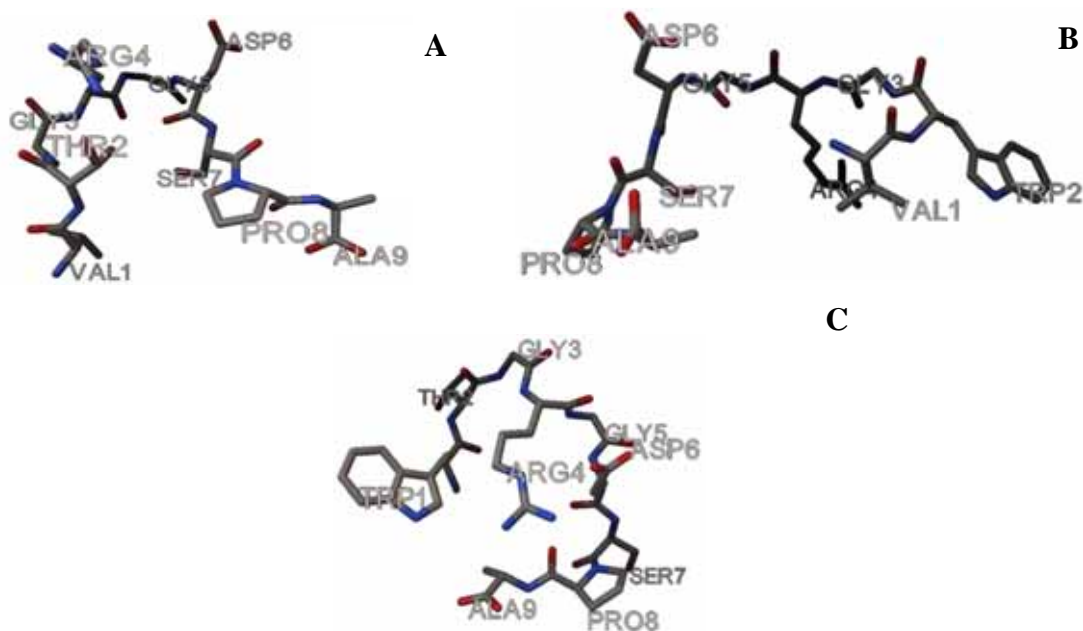
Neste trabalho, foram utilizados servidores que empregam o método de predição de estruturas por *threading*, para os peptídeos ligantes, e por homologia, para as proteínas receptoras de interesse.

A docagem ou ancoragem molecular é um procedimento computacional que busca prever a ligação não covalente entre macromoléculas ou, mais frequentemente, de uma macromolécula (receptor) e uma molécula pequena (ligante) eficientemente, começando por suas estruturas não ligadas, obtidas por simulação de docagem, ou por modelagem molecular, qualquer que seja a metodologia empregada. O objetivo é prever as conformações de ligação e a energia de afinidade (TROTT; OLSON, 2010). O processo de docagem envolve dois passos, a predição da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação em relação ao sítio de ligação do receptor, o que é geralmente referido como “pose”, e a avaliação da energia de afinidade (MENG et al., 2011).

O conhecimento sobre a estrutura tridimensional das estruturas proteicas é essencial para o entendimento dos mecanismos funcionais, e para o desenvolvimento racional de biomateriais e medicamentos. A modelagem computacional de estruturas proteicas e o estudo das interações entre ligante e proteína receptora podem ser metodologias alternativas úteis (DAHL; SYLTE, 2005).

A partir do estudo computacional descrito no item III, Material e Métodos, foi possível modelar tridimensionalmente os três peptídeos para análise de ligantes, cujos exemplos estão apresentados nos modelos da Figura 10.

**Figura 10** – Modelo tridimensional dos peptídeos RGD analisados, sendo L1 (A) utilizado como referência, L2 (B) e L3 (C) as duas sequências de interesse para comparação.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Quanto à análise comparativa das interações intermoleculares das melhores conformações tridimensionais dos complexos docados, três exemplos estão ilustrados na Figura 11, mostrando uma conformação de cada um dos três ligantes em relação ao sítio de interação da estrutura PA. Nesta etapa foi analisada a interação entre os 3 ligantes e cada uma das 3 proteínas, para cada interação ligante-receptor foram obtidas 9 pontuações de afinidade, e a partir das pontuações foram escolhidas as 3 melhores para serem visualizadas.

A pontuação de energia de afinidade obtida pelo *software* AutoDock Vina foi baixa entre os complexos ligante-receptor, todavia o diagrama de interação de ligantes realizado pelo *software* Maestro revelou maior número de interações intermoleculares entre os complexos docados do L3.

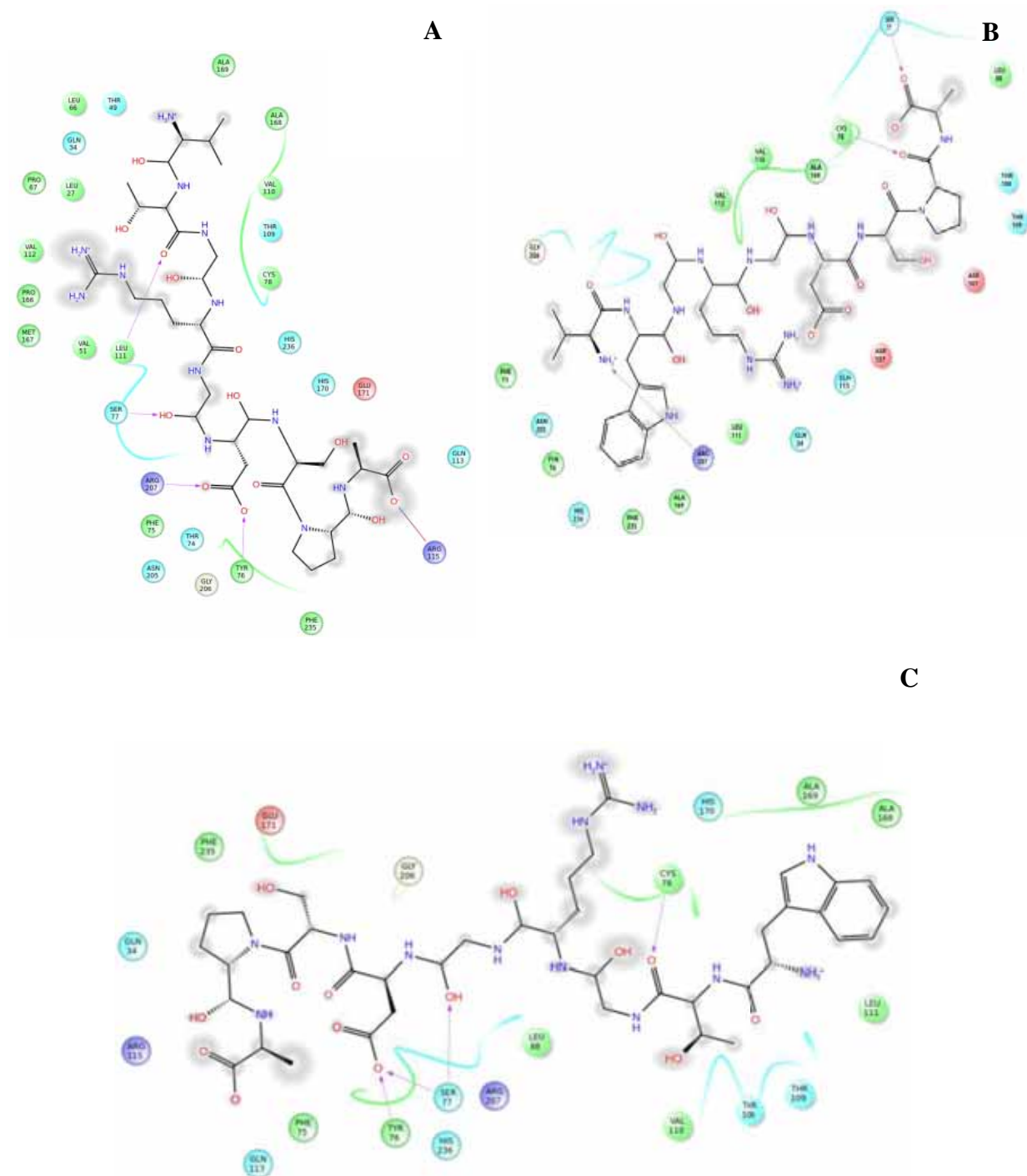
Estes resultados sugeriram maior probabilidade de interação entre as proteínas testadas e a sequência peptídica L3, em alguns casos até mais favoráveis que a sequência nativa L1. Assim sendo, L3 (WTGRGDSPA) demonstrou ser a sequência mais promissora como peptídeo ligante, e por este motivo foi escolhida para a síntese química.

Neste trabalho o estudo computacional foi realizado antes dos procedimentos experimentais, com a finalidade de auxiliar na escolha da sequência peptídica a ser sintetizada. Apenas a modelagem tridimensional e a docagem ligante-receptor foram realizadas como forma de se obter um vislumbre do comportamento molecular. Todavia seria primordial em análises futuras incluir um estudo detalhado *in silico* que englobasse, por exemplo, parâmetros como dinâmica molecular e outros servidores de pontuação de interação.

#### 4.1. Síntese Química do peptídeo RGD

Resumidamente, a síntese de peptídeos é a formação química repetida de ligações amida para conectar as funções amina e carboxílica de L- $\alpha$ -aminoácidos adjacentes (MARCHETTO, 2006).

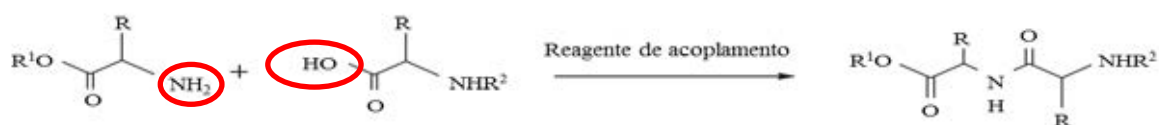
A síntese de peptídeos pode ser realizada a partir de um suporte polimérico, chamada de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), ou em solução. A SPFS apresenta o grupo carboxílico terminal unido covalentemente a um polímero sólido de forma que a cadeia peptídica em crescimento encontra-se firmemente ligada a uma partícula completamente insolúvel nos solventes utilizados, podendo ser submetida à filtração e a lavagens (AL-WARHI; AL-HAZIMI; EL-FAHAM, 2012; MERRIFIELD, 1963).

**Figura 11** – Diagrama de interação de ligante do Maestro entre PA e L1 (A), L2 (B) e L3 (C).

Fonte: Elaborado pela autora.

O sucesso na síntese química de peptídeos depende de uma combinação eficiente de grupos protetores e de reagentes de acoplamento. A formação da ligação peptídica entre os aminoácidos adjacentes depende de duas etapas, a ativação do componente eletrófilo, o grupo carboxílico (C carbonílico do ácido), pois caso contrário seria formado um sal de amônio, e o ataque nucleofílico pelo grupo amina do aminoácido que permanece ligado à resina, processo este que está esquematizado na Figura 12 (AL-WARHI; AL-HAZIMI; EL-FAHAM, 2012). Portanto, o crescimento da cadeia peptídica na SPFS é realizado da extremidade C-terminal para a N-terminal, para evitar a perda de quiralidade do resíduo associado ao grupo carboxílico que se acopla.

**Figura 12** – Esquema da formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

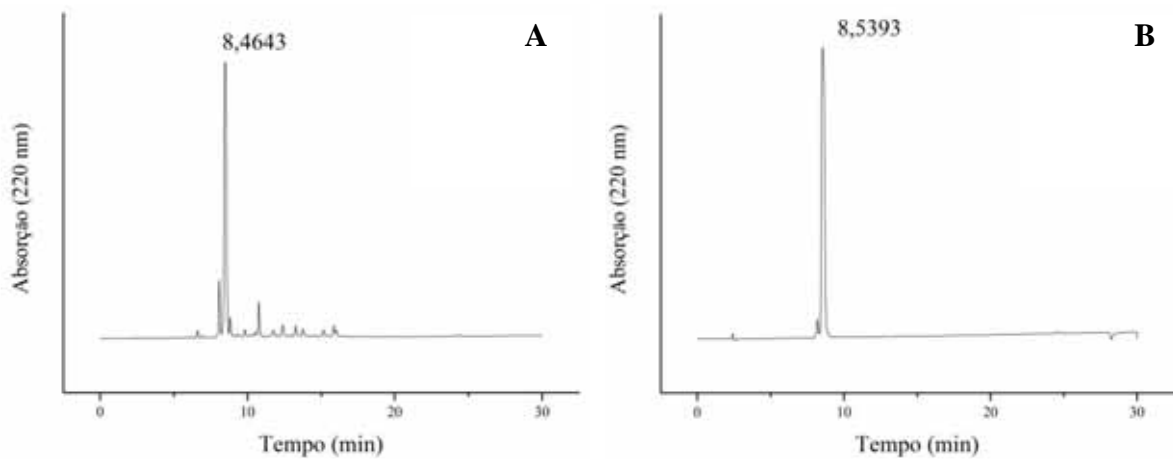
Uma questão chave na síntese de peptídeos é a proteção ou bloqueio dos grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica. Existem dois tipos de protetores, os temporários, que são eliminados a cada ciclo da síntese e que normalmente protegem a função amina, e os permanentes, que continuam estáveis durante todos os ciclos e que são removidos apenas no final da síntese (MARCHETTO, 2006). A estratégia adotada neste trabalho foi a Fmoc/tBu, a partir do grupo 9-fluorenil-metiloxicarbonila (Fmoc) como grupo protetor temporário da função  $\alpha$ -amina, que é eliminado com bases de força moderada (piperidina 20% em DMF) e, como protetor das cadeias laterais, o grupo *tert*-butila (tBu) e derivados, lábeis na presença de ácidos como o trifluoroacético.

A ativação do grupo carboxílico é feita por reagentes de acoplamento ou de condensação, que podem ser de vários tipos; neste trabalho foram usadas carbodiimidas, que são eficientes e de custo relativamente baixo. Utilizou-se *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), altamente solúvel em DMF, que reage com o ácido carboxílico formando o intermediário *O*-acilisourea, e este reage com o componente amina para produzir a ligação amida correspondente. Utilizou-se também um derivado de hidroxilaminas, o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), a partir do qual um éster ativo é obtido. E na presença de um

segundo equivalente de ácido carboxílico há a formação de anidrido simétrico. As três espécies reativas, *O*-acilisourea, éster ativo ou anidrido simétrico, são bons agentes acilantes (AL-WARHI; AL-HAZIMI; EL-FAHAM, 2012; MARCHETTO, 2006).

Após a clivagem final do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi realizada a análise e a purificação do peptídeo bruto, e os perfis cromatográficos obtidos estão representados na Figura 13, antes e após a purificação, para fins comparativos.

**Figura 13** – Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo RL-RA1, antes (A) e após (B) purificação.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

O parâmetro tempo de retenção do peptídeo purificado foi mantido, em relação ao cromatograma correspondente na análise do extrato bruto.

O rendimento da purificação foi calculado através da relação entre a massa do peptídeo bruto e a massa do peptídeo purificado. A Tabela 4 apresenta os valores obtidos de rendimento da purificação e da pureza relativa dos peptídeos.

**Tabela 4** – Rendimento da purificação e pureza relativa do peptídeo RGD.

Peptídeo	Massa do peptídeo bruto (mg)	Massa do peptídeo após purificação (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
RL-RA1	50,0	7,0	14,0	99,9

**Fonte:** Elaborado pela autora.



O resultado de pureza relativa do peptídeo indica que o método aplicado foi satisfatório.

Os valores de massa molecular obtidos pela técnica *electrospray* positivo (ES-MS positivo) estão representados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Resultado da análise de espectrometria de massas.

<i>Peptídeo</i>	<i>Massa molecular</i> ( <i>g.mol<sup>-1</sup></i> )	<i>[ES m/z (M)]</i> ( <i>g.mol<sup>-1</sup></i> )	<i>[ES m/z (M+2H)<sup>+2</sup>]</i> ( <i>g.mol<sup>-1</sup></i> )
RL-RA1	987,0	987,5	494,7

**Fonte:** Elaborado pela autora.

O resultado obtido foi compatível com o valor teórico calculado, confirmando a identidade da estrutura peptídica sintetizada, o que evidencia que os procedimentos adotados para síntese, desproteção, clivagem e purificação foram realizados com êxito.

## 4.2. Incorporação do peptídeo RGD ao suporte de celulose bacteriana

### 4.2.1. CB-RGDAds

Na membrana CB-RGDAds, a incorporação do peptídeo RL-RA1 foi realizada pelo processo de adsorção, para que ocorram entre peptídeo e CB interações moleculares por ligações de hidrogênio.

A concentração inicial real do peptídeo em solução foi determinada experimentalmente como sendo de 0,367 mmol.L<sup>-1</sup>. Após as lavagens, a mensuração da água recuperada e submetida a nova análise espectrofotométrica apresentou concentração final do peptídeo de 0,0826 mmol.L<sup>-1</sup>. Desta forma, pode-se inferir que a concentração de peptídeo adsorvido na membrana foi de aproximadamente 0,284 mmol.L<sup>-1</sup>, ou seja, um total de 9 μmols, o que está próximo a valores descritos na literatura.

Shu e colaboradores (2004) estudaram a influência da concentração e da estrutura de peptídeos RGD ligados covalentemente a um hidrogel, sobre a adesão, o espalhamento e a proliferação celular em diferentes linhagens de fibroblastos. Eles estudaram um gradiente de

concentração de peptídeo de 0 a 0,268 mmol.L<sup>-1</sup>, e puderam observar que com o aumento da concentração o resultado da adesão e da proliferação celular melhora, todavia a estrutura ou biodisponibilidade da sequência RGD na superfície do material também exerce influência sobre a função biológica.

#### **4.2.2. CB-RGDImz**

O ensaio de Grau de Incorporação (GI) do aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc) na membrana de CB-RGDImz foi realizado em triplicata (n=3). Os valores obtidos inicialmente resultaram em uma média de 0,00455 mmol.g<sup>-1</sup>. Este GI foi considerado baixo, e por esta razão, um segundo resíduo de lisina foi incorporado. Após esta etapa, o GI médio final de Fmoc-Lys(Fmoc) às membranas de CB foi equivalente a 0,0143 mmol.g<sup>-1</sup>, três vezes maior que na primeira reação, resultado este que foi aceito, considerando que cada resíduo de lisina tem a capacidade de proporcionar dois novos grupos aminas, ampliando assim o número de sítios para o crescimento das cadeias peptídicas.

As membranas de CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz foram secas em molde prensado a 37°C e acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 25 KGy. Este processo de esterilização foi adotado de acordo com os trabalhos prévios de Jipa e colaboradores (2012), Saska e colaboradores (2012) e Stoica-Guzun e colaboradores (2013) que indicam que a CB não sofre alterações estruturais significativas nem perda de propriedades quando submetida a este método de esterilização por radiação gama, independentemente da dosagem; nestes estudos os pesquisadores testaram as doses de radiação gama de 5, 10, 20 e 50 KGy em compósitos de filmes de PVA (álcool polivinílico) e CB (STOICA-GUZUN et al., 2013).

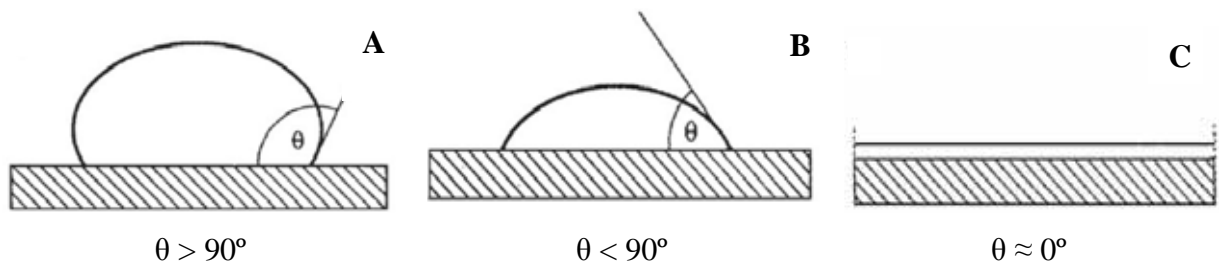
### **4.3. Caracterização dos materiais**

#### **4.3.1. Ângulo de Contato**

O valor do ângulo de contato entre o líquido, a gota de água deionizada dispensada, e o sólido, que é a amostra analisada, varia entre 0° e 180°. Este ângulo formado entre

superfícies designa a propriedade de molhamento do material. A hidrofobicidade é caracterizada quando há formação de um ângulo acima de  $90^\circ$ , não havendo o molhamento do sólido pelo líquido, pois o líquido não se espalha (Figura 14A). Quando o ângulo é menor que  $90^\circ$ , o líquido se espalha sobre a superfície sólida e há o molhamento, o material é caracterizado como hidrofílico (Figura 14B). O ângulo de aproximadamente  $0^\circ$  é atribuído ao material com molhabilidade total, pelo espalhamento completo do líquido (Figura 14C). Entretanto, o ângulo de contato formado entre a gota de um líquido com tensão superficial conhecida e uma superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fazem a gota espalhar-se sobre a superfície, e as forças coesivas do líquido, que tendem a contrair a gota a uma esfera com superfície mínima (SHAW, 1975).

**Figura 14** – Representação do ângulo de contato.



**Fonte:** LUZ; RIBEIRO; PANDOLFELLI (2008).

As medidas de ângulo de contato estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** – Resultados do ensaio de ângulo de contato para as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDIImz.

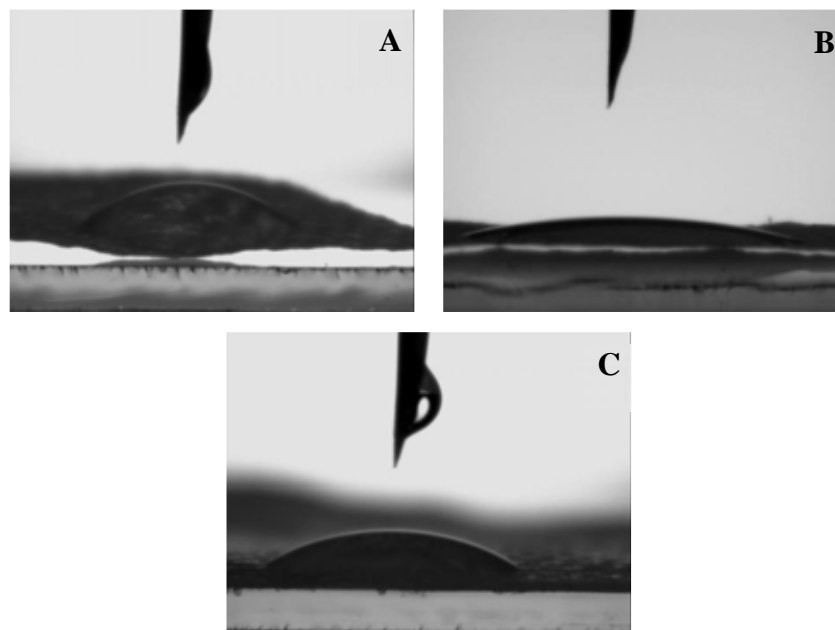
<i>Amostra</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>
CB	45,87°	1,94°
CB-RGDAds	16,27°	3,15°
CB-RGDIImz	31,20°	0,95°

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Na Figura 15, as imagens capturadas através da câmera acoplada mostram a interface líquido-superfície para as amostras de CB pura, CB-RGDAds e CD-RGDImz, imediatamente após a dispensação da gota de água deionizada.

Os resultados obtidos indicam que o ângulo de contato de ambas as membranas de CB funcionalizadas com o peptídeo de RGD (CB-RGDAds:  $16,27^\circ \pm 3,15^\circ$  e CB-RGDImz:  $31,2^\circ \pm 0,95^\circ$ ) foram menores que da membrana de CB pura ( $45,87^\circ \pm 1,94^\circ$ ). O ângulo de contato relativamente alto em relação à água do CB pura é devido à sua estrutura de superfície. A funcionalização com peptídeo RGD aumentou a quantidade de grupos hidrofílicos livres (ligações amida, grupos carboxílicos e aminas) e, portanto, diminuiu o ângulo de contato referente à água. Quanto à membrana de CB-RGDImz comparada à membrana de CB-RGDAds, observou-se um aumento do ângulo de contato, mas mantendo a molhabilidade. Isto pode ser devido à etapa de esterificação da membrana com o aminoácido lisina, que apresenta caráter hidrofóbico, bem como ao fato de que a energia de superfície da CB-RGDAds, por apresentar o peptídeo livre, é maior que da CB-RGDImz. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Bodin e colaboradores (2007), em ensaio semelhante de funcionalização de membrana de CB com conjugado xiloglucano-RGD.

**Figura 15** – Imagens capturadas pela câmera CCD, no ensaio de ângulo de contato. (A): membrana de CB pura; (B): membrana de CB-RGDAds; (C): membrana de CB-RGDImz.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

A adesão e a proliferação celular são processos complexos, que não dependem apenas da hidrofiliabilidade, mas também de interações químicas específicas entre os ligantes acoplados a superfícies bioativas. A celulose é essencialmente hidrofílica devido à presença de grupos hidroxila livres na superfície, o que faz com que seja um material útil para suporte de crescimento celular (KALASKAR et al., 2008).

Todas as amostras podem ser caracterizadas como hidrofílicas segundo os parâmetros designados no ensaio de ângulo de contato, visto que apresentaram  $\theta < 90^\circ$ , e esta propriedade de superfície propicia melhor interação com as células. Contudo, a maior energia de superfície das amostras contendo o peptídeo pode favorecer a adesão e a proliferação celular em relação à CB pura.

A adesão celular é um processo complexo, afetado por vários fatores, como o comportamento celular, propriedades de superfície do material, e fatores do meio. Dentre as propriedades de superfície do material encontram-se a hidrofobicidade, carga, rugosidade e composição química. Por sua vez, a hidrofobicidade é um conhecido fator chave no controle da adesão celular, e estudos prévios indicam que quanto mais hidrofílica a superfície de materiais, maior a adesão celular. Em superfícies hidrofílicas, células geralmente mostram bom espreadimento, proliferação e diferenciação (CHANG; WANG, 2011).

#### **4.3.2. Difractometria de Raios-X (DRX)**

Os difratogramas de raios-X das membranas de CB pura, CB-RGDImz e CB-RGDAds estão representados na Figura 16.

A DRX é uma técnica de caracterização estrutural utilizada para identificar compostos cristalinos, através da qual os planos cristalinos e suas respectivas distâncias interplanares, assim como as densidades de átomos ao longo de cada plano, são os parâmetros que caracterizam de forma única e específica cada material cristalino.

Os picos de difração observados em  $2\theta = 14,5^\circ$  e  $22,7^\circ$  em todas as amostras são atribuídos à CB em cultura estática (RETEGI et al., 2010). Cada um desses picos representa as fases cristalinas I $\alpha$  e I $\beta$  da celulose e acredita-se que o primeiro pico em  $2\theta = 14,5^\circ$  represente os planos de projeção (100) da fase I $\alpha$  e (110 e 010) da fase I $\beta$ , enquanto o segundo pico em  $2\theta = 22,7^\circ$  represente a projeção dos planos (100) I $\alpha$  e (200) I $\beta$  (BARUD et al.,

2008). Segundo Klemm e colaboradores (2005), após secagem a membrana de CB torna-se uma lâmina de orientação uniplanar que consiste em aproximadamente 80% celulose I  $\alpha$ .

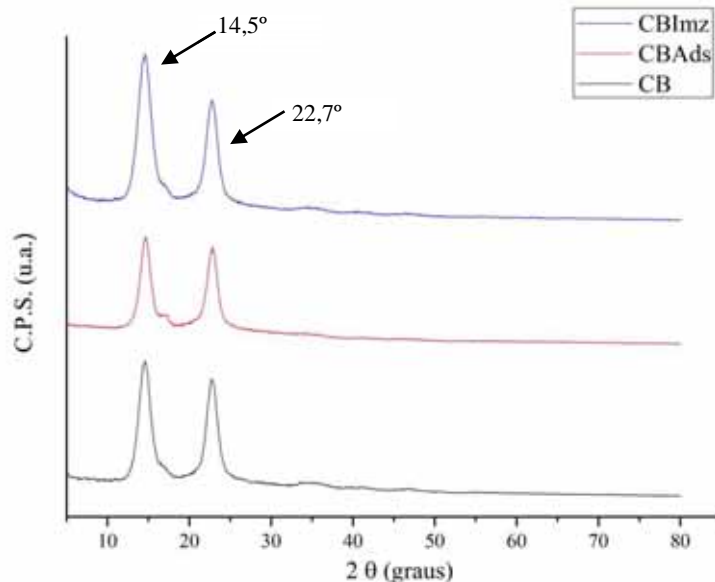
O índice de cristalinidade (IC) foi calculado segundo o método de Segal, Creely, Martin e Conrad (POLETTO; PISTOR; ZATTERA, 2013; SEGAL et al., 1959) a partir dos picos de intensidade do difratograma, de acordo com a equação:

$$IC (\%) = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}} \times 100$$

Na equação,  $I_{200}$  é a intensidade máxima de difração no plano 200 em  $2\theta = 22,7^\circ$  e  $I_{am}$  é a intensidade em  $2\theta = 18^\circ$ .

Os resultados obtidos de IC para os materiais foram de 81,16% para a CB, de 78,14% para a CB-RGDAds e de 78,50% para a CB-RGDImz. Os valores obtidos para a CB e para a CB-RGDImz são muito parecidos com os obtidos por Santos e colaboradores (2015) para a CB não tratada com etanol e não envelhecida.

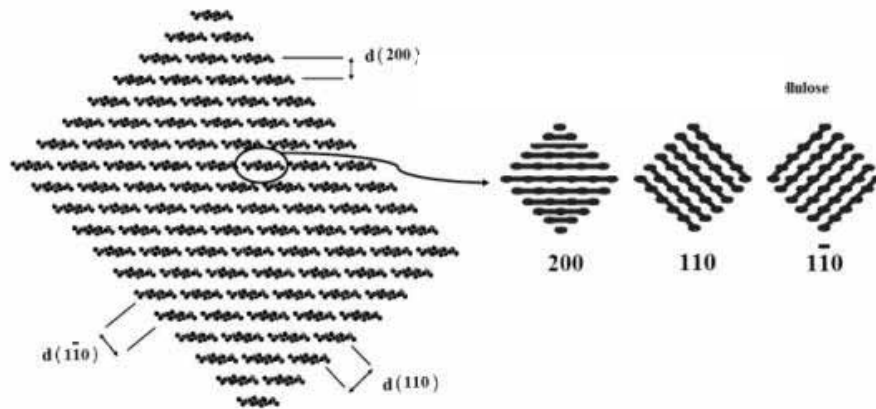
**Figura 16** – Difratograma da CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz, com picos assinalados.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

A Figura 17 é uma representação de como os planos de projeção cristalográficos da celulose nativa organizam-se espacialmente.

**Figura 17** – Modelo representando cadeias de celulose nativa, com representação dos planos cristalográficos à direita.



**Fonte:** POLETTI; PISTORI; ZATTERA (2013).

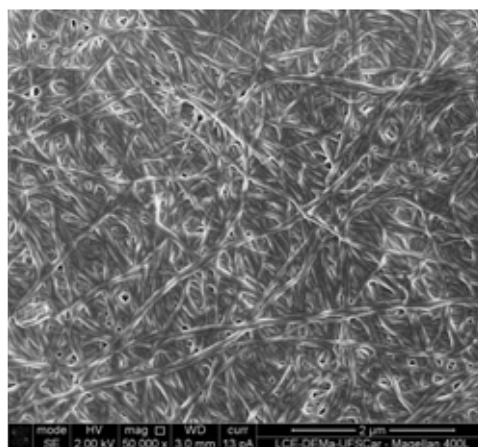
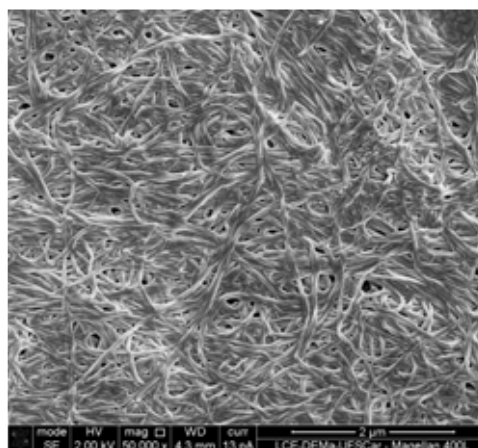
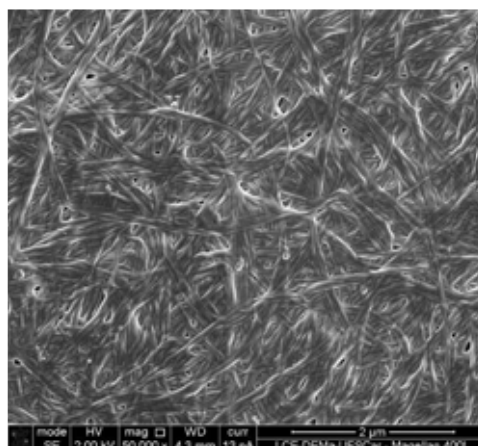
Uma pequena interferência em  $\theta=16,5^\circ$  pode ser observada nas três amostras, que aumenta levemente em consequência do processo de prensagem entre placas, em estufa para secar as membranas, provavelmente decorrente de orientação induzida da membrana. Segundo Retegi e colaboradores (2010), a menor compressão no molde de celulose pode levar a um aumento da cristalinidade, e esta variação pode ser atribuída à habilidade dos cristalitos de celulose de se reorientar ou de um aumento no tamanho dos domínios dos cristalitos existentes submetidos à força compressional. Portanto, a diferença no IC e no pico de  $16,5^\circ$  mais evidente na CB-RGDAds pode ser resultante de diferença em compressão durante sua preparação.

As diferenças observadas nos perfis dos difratogramas das amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub> não foram estatisticamente significativas, o que indica que não houve mudanças microestruturais na cristalinidade das amostras após funcionalização com o peptídeo, a partir do teste t-Student ( $p=0,05$ ).

#### 4.3.3. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A Figura 18 apresenta as fotomicrografias da morfologia superficial das amostras de CB pura, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub>. Todas elas exibem estrutura de nanofibras contínuas, arranjadas aleatoriamente, que formam uma rede (CZAJA et al., 2007).

**Figura 18** – Micrografia por MEV das membranas de CB. (A): superfície da CB pura. (B): superfície da membrana de CB-RGDAds. (C): superfície da membrana de CB-RGDIImz.

**A****B****C**

**Fonte:** Elaborado pela autora.

A espessura média das fibras foi determinada através do programa ImageJ, a partir das micrografias das amostras, com resultados de 57,4 nm ( $\pm$  8,23 nm) para a CB pura, 55,5 nm ( $\pm$  8,1 nm) para a CB-RGDAds, e 51,8 nm ( $\pm$  7,6 nm) para a CB-RGDIImz. Foi realizada a



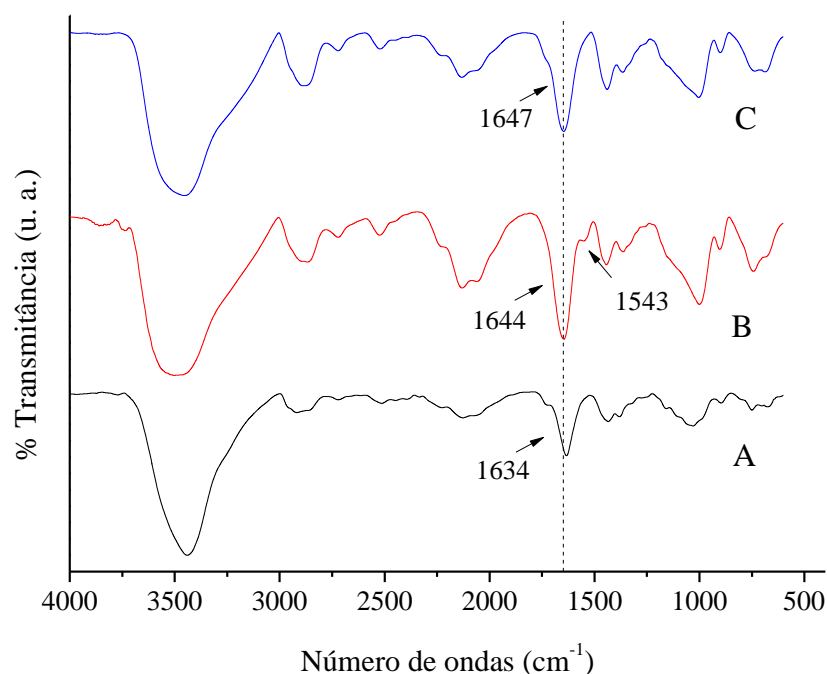
análise estatística pelo método de análise de variâncias (ANOVA), e foi possível inferir que as mensurações obtidas não apresentam diferença significativa entre as espessuras das amostras ( $p=0,1286$ ).

A análise das micrografias por MEV indica que a metodologia utilizada para a funcionalização por incorporação do peptídeo na membrana, tanto por imobilização quanto por adsorção, não resulta em alteração da estrutura das nanofibras, nem da morfologia de superfície das membranas.

#### 4.3.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro vibracional na região de infravermelho para as amostras de CB pura, CB-RGDAd e CB-RGDImz está representado na Figura 19.

**Figura 19** – Espectro de infravermelho para as amostras de (A): CB, (B): CB-RGDAd e (C): CB-RGDImz.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

As principais bandas vibracionais características da celulose são atribuídas em  $\sim 3500$  cm<sup>-1</sup> para estiramento de OH,  $\sim 2900$  cm<sup>-1</sup> para estiramento de alcanos e estiramento

assimétrico de CH<sub>2</sub>, ~2700 cm<sup>-1</sup> para estiramento simétrico de CH<sub>2</sub>, 1645 cm<sup>-1</sup> para deformação H-O-H de água adsorvida na superfície da CB, 1432 cm<sup>-1</sup> para deformação simétrica de CH<sub>2</sub>, ~1370 cm<sup>-1</sup> para deformação de CH<sub>3</sub>, ~1332 cm<sup>-1</sup> para deformação de OH, e, de 1320 a 1030 cm<sup>-1</sup> para deformação de CO ou estiramento C-O e C-C (BARUD et al., 2008; GEA et al., 2011; SASKA et al., 2012).

Na Tabela 7 estão relacionadas as principais bandas vibracionais de infravermelho observadas nas amostras.

**Tabela 7** – Designação das principais bandas vibracionais de absorção de infravermelho da celulose e do peptídeo.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		Vibração
Celulose	Peptídeo	
~3500		Estiramento O-H
	3330 – 3180	Estiramento N-H (amida)
2960 – 2904		Estiramento C-H dos grupos CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>
1660 – 1640		Deformação H-O-H de água adsorvida e/ou estiramento C=O (amida I)
	1550 – 1540	Deformação N-H (amida II)
~1428		Deformação de CH <sub>2</sub> ou deformação no plano de O-H
1425 – 1390 (w)		Estiramento simétrico COO <sup>-</sup>
~1330		Deformação de CH <sub>3</sub> ou deformação no plano O-H
~1160		Estiramento assimétrico nas ligações C-O-C
~1040		Estiramento simétrico de álcool primário C-O
895		Ligações β-glicosídicas entre as unidades de glicose
665-670		Deformação OH fora de fase

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Uma leve diminuição de intensidade na banda vibracional em ~3500 cm<sup>-1</sup> ocorre nas amostras de CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub>, indicando que a funcionalização das membranas fez com que parte das hidroxilas livres da CB interagissem por ligações de hidrogênio, diretamente com o peptídeo ou através da esterificação com a lisina, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Saska e colaboradores (2012), em ensaio de FT-IR para membranas de CB funcionalizadas com resíduo de aminoácido glicina.

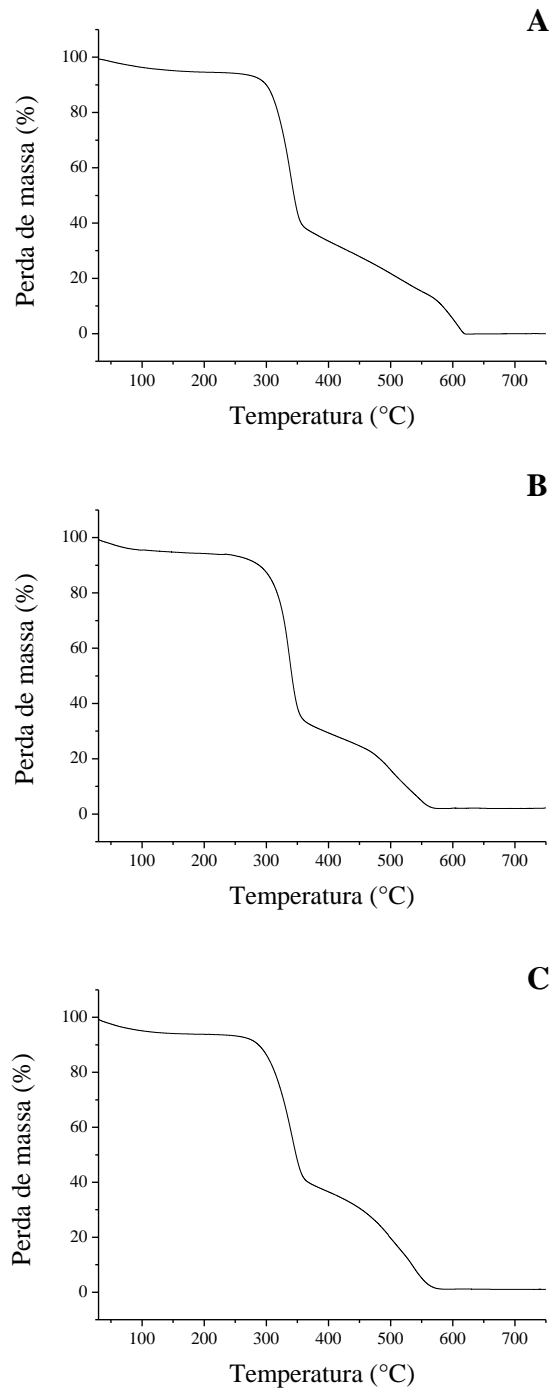
Além desta banda, as bandas observadas em torno de 1660 e 1550  $\text{cm}^{-1}$  também revelaram que ocorreu a funcionalização da CB pelo peptídeo RGD; adicionalmente, a banda na região  $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$  mostrou-se mais intensa para as amostras de CB-RGDAds e CB-RGDImz em relação à CB. Estas bandas são atribuídas ao estiramento C=O para amida I e deformação N-H para amida II em torno de 1660 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. No espectro da amostra CB-RGDAds Figura 19B, as duas bandas estão bem definidas em 1644 e 1543  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, confirmando a presença do peptídeo adsorvido na CB. Além disso, a banda em 1644  $\text{cm}^{-1}$  da CB-RGDAds apresentou deslocamento de 11  $\text{cm}^{-1}$  em relação à CB (1634  $\text{cm}^{-1}$ ), sugerindo que o peptídeo apresenta interação com os grupos OH da CB por ligações de hidrogênio. No espectro da amostra CB-RGDImz não foi observada a banda referente à deformação para amida II, porém observou-se que a banda na região de 1647  $\text{cm}^{-1}$  também apresentou um deslocamento de 13  $\text{cm}^{-1}$  em relação à CB pura, o que, da mesma forma, sugere que o peptídeo está interagindo com grupos OH da CB, por ligação covalente. As bandas observadas na região de 1420 e 1350-1210  $\text{cm}^{-1}$  correspondem à deformação C-O de ácidos carboxílicos ou ao estiramento simétrico de  $\text{COO}^-$  de aminoácidos livres podem ser observadas nas três amostras.

A análise de FT-IR, portanto, confirmou a incorporação do peptídeo nas amostras de CB-RGDAds e CB-RGDImz, pela presença de bandas características e pelo deslocamento de bandas referente aos grupamentos amidas, em comparação com a CB pura, através da interação com os grupos OH da membrana.

#### 4.3.5. *Análise Termogravimétrica (TG)*

A estabilidade térmica de materiais pode ser medida através do perfil de perda de massa sob o efeito de transferência de calor. A partir dos dados de perda de massa em função da temperatura pelo método termogravimétrico foram determinados os parâmetros que descrevem o processo de degradação térmica das membranas de CB. Nesta análise, foi utilizado o gás nitrogênio como atmosfera inerte para evitar a ocorrência de reações de oxidação após a iniciação da degradação das amostras.

Na Figura 20 estão representadas as curvas TG das amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz.

**Figura 20** – Curva TG para as membranas de (A): CB, (B): CB-RGDAds e (C): CB-RGDIImz.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

A estabilidade térmica das amostras pode ser importante para algumas aplicações e pode prover informações sobre as interações entre as fibras da CB. Durante o tratamento térmico, as amostras mostraram uma pequena perda de massa começando da temperatura

ambiente a até aproximadamente 100°C, referente à perda de moléculas de água fisicamente adsorvidas e ligadas por ligação de hidrogênio. Um segundo evento de perda de massa é atribuído ao processo de decomposição térmica na faixa de temperatura entre 260°C a 320°C. Um terceiro evento foi observado para as 3 amostras em torno de 358°C a 363°C, no qual as membranas sofreram uma perda de massa significativa (de 60 a 66%), evento este que pode estar associado com a degradação da celulose a partir da clivagem das ligações glicosídicas, incluindo a despolimerização, desidratação e decomposição das unidades de glicose em gases (H<sub>2</sub>O, CO e CO<sub>2</sub>). As temperaturas *onset* ( $T_{onset}$ ) observadas na curva TG estão listadas na Tabela 8.

**Tabela 8** – Resultados das curvas termogravimétricas para as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub>.

<i>Amostra</i>	$T_{onset}$ (°C)	<i>T de decomposição</i> (°C)	<i>% perda de massa na T de decomposição</i>	<i>% residual de massa</i>
CB	297	360	60,7	0,1
CB-RGDAds	300	358	65,6	2,3
CB-RGDI <sub>mz</sub>	287	363	59,5	1,3

**Fonte:** Elaborado pela autora.

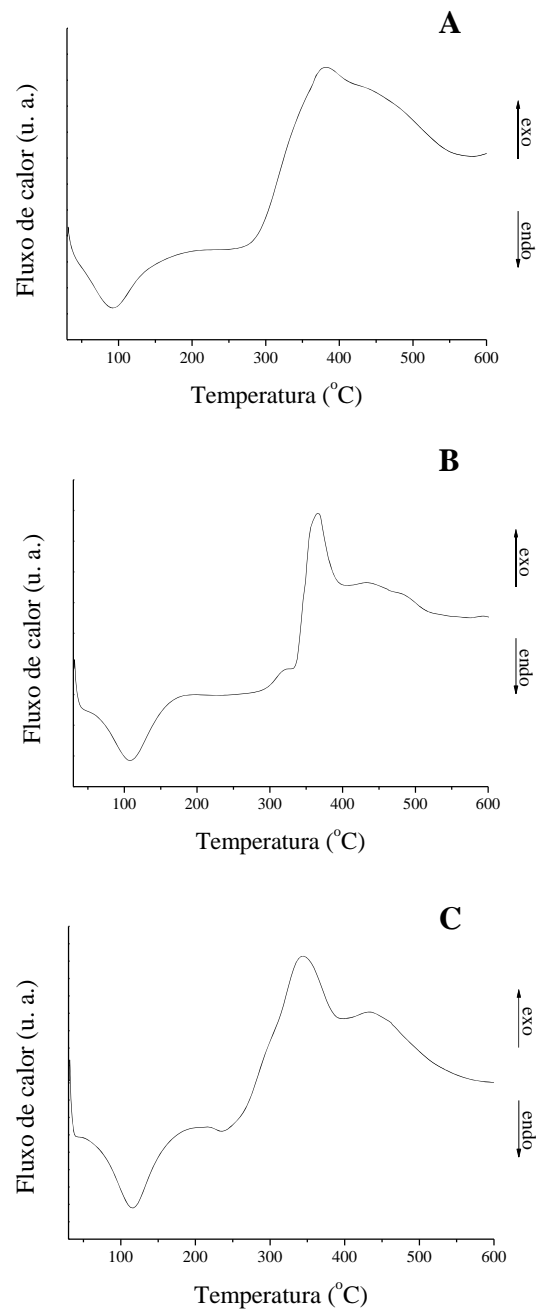
Os resultados de  $T_{onset}$ , temperatura que determina a estabilidade térmica do material, apresentaram um pequeno decréscimo de 10°C da amostra de CB-RGDI<sub>mz</sub> em relação à  $T_{onset}$  da CB. Contudo, a diferença observada entre materiais não é significativa e, portanto, os resultados mostraram que a funcionalização com o péptido RGD não alterou a estabilidade térmica das amostras (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015; POLETTO; PISTOR; ZATTERA, 2013; STUMPF et al., 2013).

George e colaboradores (2005) relataram que em membranas purificadas por tratamento alcalino a temperatura de decomposição aumenta em relação à temperatura *onset* em aproximadamente 40°C. Neste trabalho, esta diferença variou de 58 a 76°C, considerando que as amostras foram submetidas a este tipo de metodologia de purificação, e à funcionalização posteriormente.

#### 4.3.6. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A avaliação da variação do fluxo de calor associado às transições em função da temperatura para as amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub> foi realizada através de DSC, e está representada na Figura 21.

**Figura 21** – Curva de DSC para as amostras de (A): CB, (B): CB-RGDAds e (C): CB-RGDI<sub>mz</sub>.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

As três amostras apresentam um amplo evento endotérmico em comum, sendo que para a amostra de CB está na região de 92°C, para a CB-RGDAds na região de 108°C e para a CB-RGDI<sub>mz</sub> na região de 116°C, referente à dessorção de água da estrutura polissacarídica.

Em temperaturas mais altas, outros eventos endotérmicos foram observados, agora na região de temperatura de 284°C para a CB, para a CB-RGDAds em 292°C e para a CB-RGDI<sub>mz</sub> em 257°C, referentes à decomposição térmica da celulose por pirólise parcial da fragmentação de ligações carbonílicas e carboxílicas das unidades de anidroglicose, fornecendo carbono e monóxido de carbono (BARUD et al., 2007; GEORGE et al., 2005). Todavia, este decréscimo na temperatura de degradação não é significativo, estando de acordo com os resultados encontrados na análise TG, o que demonstra que a estabilidade térmica das amostras de CB-RGDI<sub>mz</sub> e CB-RGDAds não sofreu alteração em decorrência do processo de funcionalização das membranas, quando comparadas à CB pura.

#### 4.4. Análises *in vitro*

##### 4.4.1. Ensaio de Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade das células L929 foi realizada após 3, 7 e 10 dias de incubação com as membranas de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub>, sendo utilizadas como controle negativo as células em meio D-MEM-C e como controle positivo isopropanol. Na Tabela 9 estão as médias dos resultados obtidos para o ensaio de viabilidade celular utilizando MTT.

**Tabela 9** – Valores obtidos de absorvância para o ensaio de viabilidade celular por MTT, tendo como controle negativo (C-) células em meio D-MEM-C e como controle positivo (C+) isopropanol.

<i>Dia</i>	<i>CB</i>	<i>CB-RGDAds</i>	<i>CB-RGDI<sub>mz</sub></i>	<i>C-</i>	<i>C+</i>
3	0,090	0,093	0,102	0,053	0,046
7	0,437	0,366	0,576	0,494	0,053
10	0,510	0,494	0,639	0,797	0,047

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Os cálculos para obtenção dos valores de viabilidade celular foram realizados a partir da seguinte equação:

$$VC (\%) = \frac{(Abs amostra - Abs C+)}{Abs C -} \times 100$$

Sendo, VC (%) = viabilidade celular; Abs amostra = média da absorbância de cada amostra analisada; Abs C+ = média da absorbância dos controles positivos e Abs C- = média da absorbância dos controles negativos, considerando-se como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas celulares realizadas somente em presença de meio D-MEM-C (controle negativo). Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade como média  $\pm$  desvio padrão, e estão demonstrados na Figura 22.

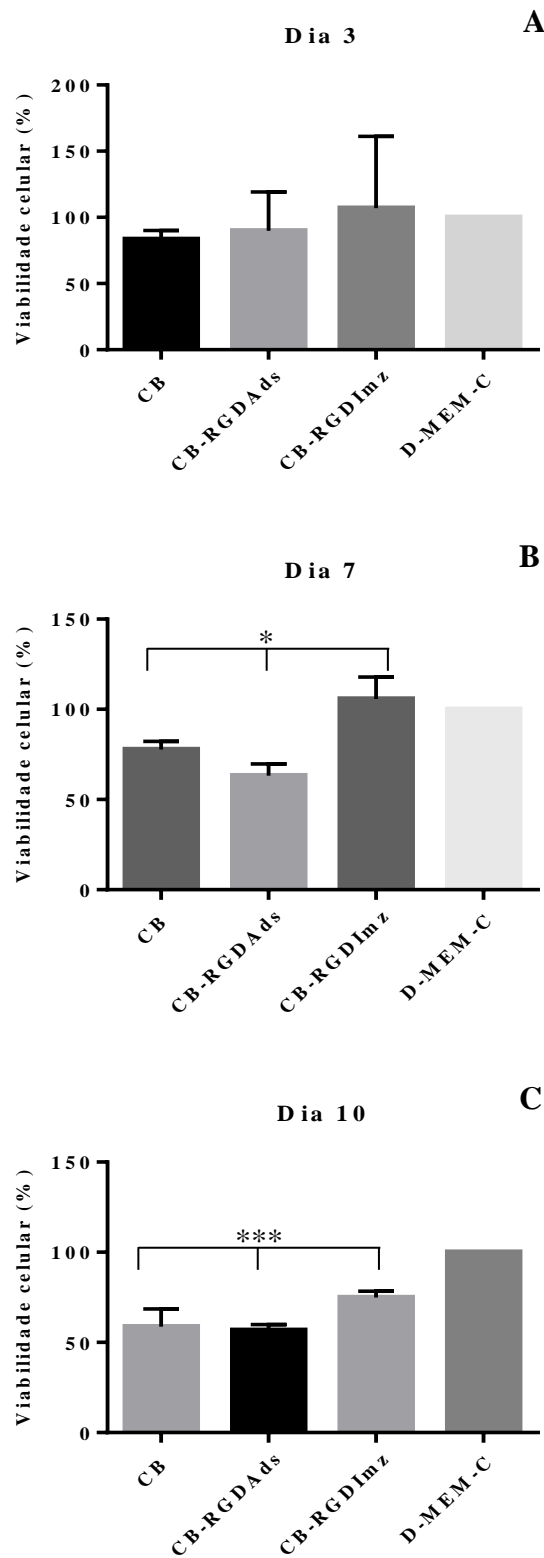
Segundo os resultados obtidos, nenhuma das membranas de CB, CB-RGDAds ou CB-RGDImz apresentou citotoxicidade, de acordo com o padrão da ISO 10993-5:2009 (INTERNATIONAL..., 2009) que preconiza o mínimo de 70% de viabilidade celular para que o material seja considerado não citotóxico, exceto no 7º dia, no qual a membrana de CB-RGDAds apresentou-se levemente citotóxica, com viabilidade celular de 63,3%, e no 10º dia, no qual as membranas de CB pura e CB-RGDAds apresentaram viabilidade de 58,69% e 56,71% respectivamente, ou seja, também apresentaram-se com leve citotoxicidade.

A CB-RGDImz foi a que apresentou melhor desempenho para todos os tempos de incubação testados, com valores de viabilidade celular média de 106,96%, 105,80% e 74,89%, referentes ao 3º, 7º e 10º dias, respectivamente.

No 3º dia, as culturas celulares nas 3 membranas CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz não mostraram diferença estatisticamente significativa entre as elas ( $p = 0,338$ ). Contudo, no 7º dia a membrana CB-RGDImz (105,8%) apresentou viabilidade celular superior em relação à membrana CB-RGDAds (63,3%) < CB (77,7%), cujos valores mensurados foram estatisticamente significantes ( $p < 0,0003$ ). Por fim, para o 10º dia de incubação um decréscimo na taxa de proliferação celular foi observado, cujo fato pode estar relacionado à maturação das culturas celulares; além disso, diferenças significativas foram observadas entre as membranas, sendo que a membrana CB-RGDImz apresentou uma taxa maior de viabilidade (74,89%) em relação às membranas CB (58,69%) e CB-RGDAds (56,71%) ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 22** – Ensaio de viabilidade celular por MTT para as células L929, expresso em %, com tempo de incubação das amostras de 3 dias (A), 7 dias (B) e 10 dias (C) (\*  $p < 0,0003$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Moreira e colaboradores (2009) testaram a viabilidade celular utilizando MTT a partir de fibroblastos de camundongo (3T3) e células de ovário de hamster chinês (CHO: *Chinese Hamster Ovary*) em nanofibras de CB. As medidas foram feitas em 24 h, 48 h e 72 h, e os resultados obtidos demonstraram proliferação celular diminuída para ambas as linhagens celulares, independente da concentração das nanofibras de CB, o que pode ter sido decorrente das características da superfície do material.

Em outro estudo, Bächdahl e colaboradores (2006) realizaram um ensaio de proliferação e viabilidade de células de músculo liso (SMC: *Smooth Muscle Cells*) cultivadas sobre a CB pelo método de Alamar Blue, com poliestireno como material de referência, e obtiveram resultados de taxa de proliferação celular significativamente menor na CB, num período de 7 dias de incubação. Eles discutem que é importante considerar tanto a topografia quanto a química do material analisado, pois em determinados materiais como hidrogeis, por exemplo, fibroblastos e SMC produzem menos colágeno que em plástico de cultura celular. Desta forma, com a síntese proteica e metabolismo celular alterados, podem ocorrer diferenças na adesão entre a superfície da CB e o plástico da microplaca. Outra discussão relevante abordada neste trabalho é a de qual a população celular é desejada no planejamento de um biomaterial, considerando que, inicialmente, um perfil proliferativo de células é necessário; contudo, quando implantado no hospedeiro, é preferível que as células apresentem um fenótipo quiescente, diferenciado e contrátil.

Da mesma forma, considerando a finalidade das membranas desenvolvidas no presente trabalho, como biomaterial para atuar na reparação tecidual de pele em feridas, em um primeiro instante, durante a fase proliferativa, faz-se necessário que a taxa de proliferação celular de fibroblastos seja alta e, conseqüentemente, com alta porcentagem de viabilidade celular e baixa citotoxicidade. Contudo, a partir do momento em que as células se organizam no local da ferida, elas começam a sintetizar colágeno e se transformam em miofibroblastos para permitir a contração da ferida e estes, por sua vez, apresentam taxa de proliferação menor em comparação aos fibroblastos provenientes da periferia da ferida. Esta fase é seguida pela remodelagem e maturação do tecido, que pode ocorrer do dia 8 a até um ano após a instauração da ferida, na qual a deposição de colágeno é feita de forma extremamente organizada, e o aumento da síntese desta proteína ocorre não somente pelo aumento do número de fibroblastos, mas também pelo aumento da síntese de colágeno por célula, todavia o excesso de síntese pode levar a uma cicatriz hipertrófica ou quelóide (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Neste trabalho foi empregado apenas uma linhagem celular (L929) e um método, através de MTT, para a avaliação inicial de citotoxicidade e viabilidade celular dos materiais desenvolvidos, contudo, outras linhagens de fibroblastos e queratinócitos, seriam relevantes para uma análise mais ampla dos materiais. Outros parâmetros, tais como genotoxicidade e mutagenicidade também poderiam ser avaliados.

#### **4.4.2. Morfologia celular**

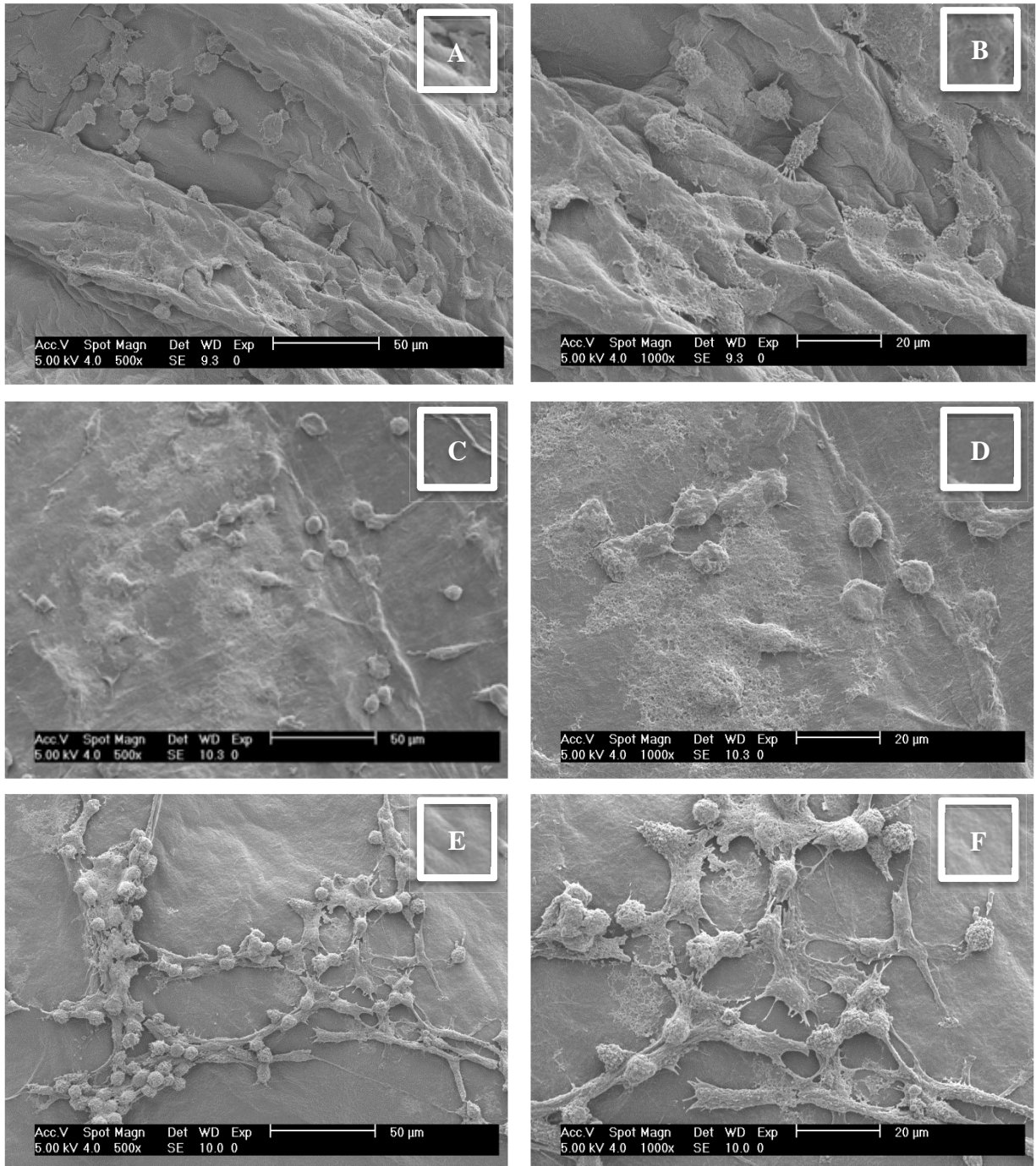
As micrografias das amostras de CB, CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub> após 7 dias de cultivo estão demonstradas na Figura 23, com aumentos de 500× e 1.000× para cada amostra.

Nestas imagens foi possível observar que nas membranas de CB-RGDI<sub>mz</sub> há uma quantidade maior de células aderidas às membranas em comparação à CB pura e à CB-RGDAds, com bom espreadimento celular e diferenciação morfológica a partir da emissão de filopodias, que são prolongamentos que indicam que as células estão aderidas sobre a superfície. Quanto ao aspecto morfológico, é possível observar em todas as amostras a presença de células de forma romboide, de filopodia e de lamelipodia, de acordo com a classificação para morfologia celular descrita na literatura (MONTESINOS et al., 2009), bem como algumas células com o formato mais arredondado, o que indica pouca adesão e tendência à apoptose.

Ainda em relação às características morfológicas e de adesão, é possível visualizar a formação de uma rede entre as células alongadas, principalmente nas amostras CB-RGDI<sub>mz</sub> e CB pura, enquanto que na amostra CB-RGDAds as células encontram-se em sua maioria distantes uma das outras, com poucas células interligadas.

Estes dados sugerem melhor biocompatibilidade da CB-RGDI<sub>mz</sub>, e também da CB pura, em relação à CB-RGDAds, quanto ao parâmetro de adesão e proliferação de fibroblastos L929.

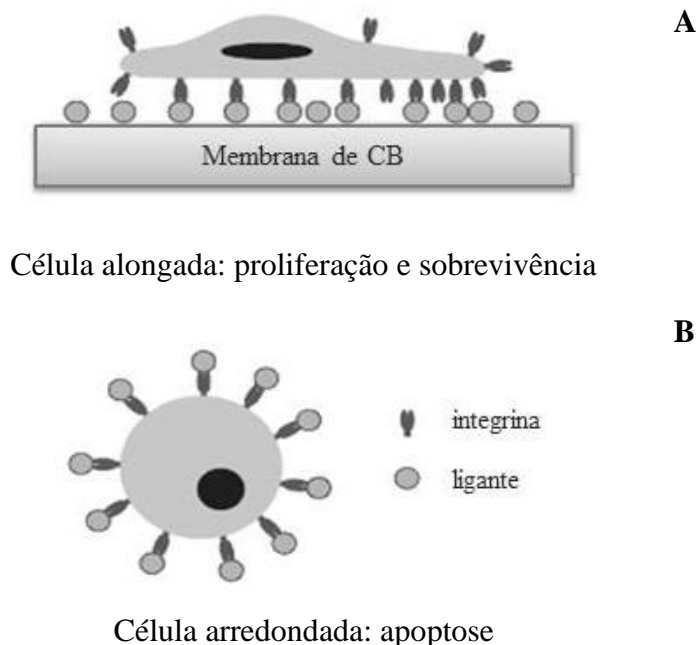
**Figura 23** – Micrografia por MEV das membranas. (A) e (B): superfície da CB pura; (C) e (D): superfície da membrana de CB-RGDAd; (E) e (F): superfície da membrana de CB-RGDI<sub>mz</sub> (A, C, E com aumento de 500×; B, D, F com aumento de 1.000×).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

O processo da adesão celular mediada por integrinas engloba eventos de ligação celular, o espalhamento da célula, a organização do citoesqueleto de actina e a formação de adesão focal. A adesão celular e a formação de adesão focal desencadeiam a sobrevivência e a proliferação de células dependentes de ancoragem (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003), como os fibroblastos L929, e as células apresentam-se alongadas, emitindo prolongamentos, enquanto que a perda da adesão leva à apoptose em vários tipos de células, denominada “anoikis”, com células arredondadas características. Ainda segundo Hersel, Dahmen e Kessler (2003), este tipo de apoptose pode ser induzido quando ligantes solúveis não imobilizados como os peptídeos RGD estão presentes, o que pode justificar a baixa adesão e proliferação celular na amostra CB-RGDAds, cujo peptídeo quando submetido à elevação da força iônica no meio de cultura pode ter sido liberado, e então se ligado às integrinas presentes nas células L929. Um esquema do efeito da interação entre os ligantes de RGD e as integrinas de membrana celular está representado na Figura 24.

**Figura 24** – Esquema do efeito da interação ligante RGD-integrina de membrana celular quando imobilizado em superfície, como na CB-RGDImz (A) e quando em solução, como na CB-RGDAds (B), após liberação do peptídeo no meio de cultura celular.



**Fonte:** Adaptado de Hersel; Dahmen; Kessler, 2003.

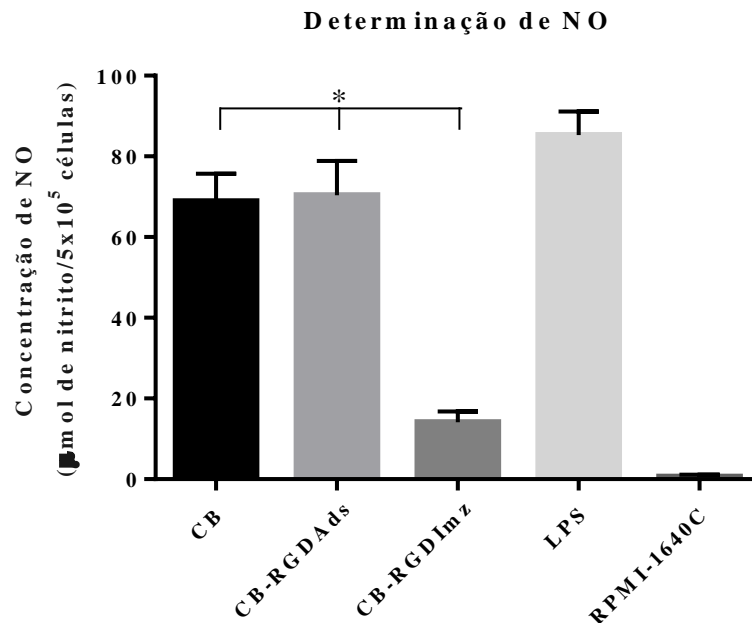
Outros ensaios, como a avaliação morfológica por microscopia de fluorescência e análises de proliferação e adesão celular através de diferentes metodologias poderiam ser realizados em estudos futuros das membranas.

#### 4.4.3. Determinação da produção de NO

A determinação da produção de NO foi realizada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos do exsudato peritoneal, após aderência, obtidas de camundongos Balb/c. As células foram mantidas em placas de cultura de tecidos de 96 poços por 24 horas, sobre as amostras de membrana de CB, CB-RGDAds e CB-RGDImz, do LPS como controle positivo ou somente células em meio RPMI-1640C como controle negativo.

As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e os resultados obtidos foram expressos em concentração de nitrito ( $\mu\text{mols de nitrito}/5 \times 10^5$  células), demonstrados na Figura 25.

**Figura 25** – Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal, após aderência, de camundongos Balb/c. Resultados expressos em  $\mu\text{mols de nitrito}/5 \times 10^5$  células, como média  $\pm$  desvio padrão (\*  $p < 0,0001$ ).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

As membranas CB e CB-RGDAds apresentaram uma concentração de nitrito de 68,87 e 70,40  $\mu\text{mol}/5 \times 10^5$  células respectivamente, o que indica que este material apresentou produção de nitrito relativamente alta. A membrana de CB-RGDI<sub>mz</sub> em contato com as células produziu concentração de nitrito de 14,15  $\mu\text{mol}/5 \times 10^5$  células, o que representa uma quantidade relativamente baixa, sendo estatisticamente significativa em relação às membranas de CB e CB-RGDAds ( $p < 0,0001$ ).

No processo de cicatrização de feridas, imediatamente após a lesão, inicia-se a fase inflamatória com a liberação de substâncias vasoconstritoras e estimulação da cascata de coagulação pelas plaquetas, com liberação de diversas citocinas, e neutrófilos migram para o local por quimiotaxia. Monócitos que se encontram nos tecidos próximos e no sangue também são atraídos e se diferenciam em macrófagos através do estímulo de citocinas como o IFN- $\gamma$  e estes, assim que ativados, medeiam a angiogênese, a fibroplasia e a produção de NO, através da secreção de diversas enzimas e citocinas, dentre elas as collagenases para desbridar a ferida, a TNF- $\alpha$  que estimula fibroblastos a produzir colágeno e promove a angiogênese e a TGF- $\beta$ , que estimula queratinócitos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; ISAAC et al., 2010).

O NO é uma molécula inorgânica utilizada pelas células como agente de sinalização ou de toxicidade, produzida por vários tipos de células em vários tecidos e com diversas funções. Em mamíferos, atua como agente de relaxamento vascular, como neurotransmissor, como inibidor de agregação de plaquetas, e também é sintetizado durante as respostas imune e inflamatória, estando envolvido na imunidade inata como agente tóxico contra organismos infecciosos, mas também induzindo ou regulando a função e a morte das células da imunidade do hospedeiro, desta forma regulando a imunidade específica (COLEMAN, 2001). Um único elétron torna o NO em um radical muito ativo, o qual penetra através de membranas biológicas e facilmente reage com outras substâncias (ARZUMANIAN et al., 2003).

O NO é formado durante uma reação de oxidação complexa, a partir de N-arginina e oxigênio, com a participação da enzima NO sintase (NOS). Várias isoformas desta enzima já foram purificadas e muitas outras já tiveram seus genes clonados. Estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos, podendo ser categorizadas como NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio e de calmodulina, e que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (ARZUMANIAN et al., 2003; COLEMAN, 2001; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). A isoforma constitutiva

compreende a NO sintase neuronal (nNOS), que é encontrada em plaquetas, células  $\beta$  pancreáticas, nos músculos, nos pulmões, no estômago, em células epiteliais do útero e em células endoteliais de arteríolas aferentes e eferentes e a NO sintase endotelial (eNOS), encontrada em plaquetas e células endoteliais; por sua vez, a forma induzível não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas ou por endotoxinas em uma variedade de células, como macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (ARZUMANIAN et al., 2003; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). O NO é a principal molécula reguladora do sistema imune e atua como modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico, principalmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Desta forma, é possível concluir que o NO apresenta um papel duplo na resposta inflamatória, com grande importância na defesa contra micro-organismos e células tumorais, porém também apresentando efeitos pró-inflamatórios, podendo causar doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e choque séptico (KAMINSKI et al., 2002; KILBOURN; GRIFFITH, 1992).

Portanto, a partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que a CB-RGDImz é a membrana com menor efeito de produção de NO, o que corrobora com o resultado para a mesma membrana do ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade, apesar de o tempo de exposição às membranas ser diferente nos dois ensaios, sendo a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos uma resposta mais imediata, medida em apenas 24 h de exposição das células aos materiais.

#### ***4.4.4. Determinação da liberação da citocina TNF- $\alpha$***

A citocina TNF- $\alpha$  foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, utilizando um ensaio imunoenzimático comercial ELISA de captura, e os resultados foram descritos na Figura 26, expressos em concentração da citocina ( $\text{pg.mL}^{-1}$ ), como média  $\pm$  desvio padrão.

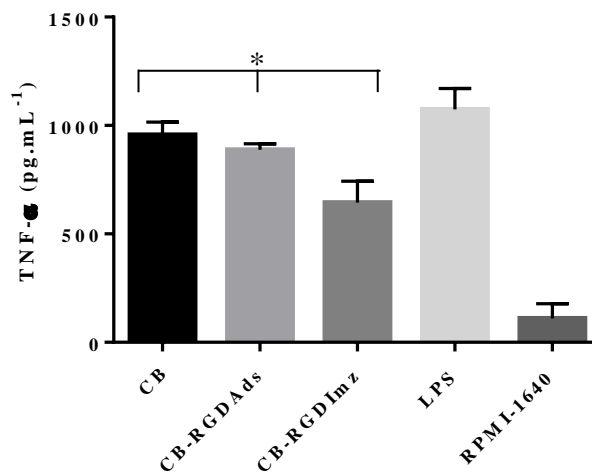
A liberação de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos peritoneais mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0032$ ) entre a membrana de CB em relação à CB-



RGDI<sub>mz</sub> (956,4 e 644,0 pg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente), e a membrana de CB-RGDAds (888,6 pg.mL<sup>-1</sup>) apresentou diferença em relação à CB-RGDI<sub>mz</sub>.

No curso de reações inflamatórias, mecanismos pró-inflamatórios são fundamentais para garantir a eliminação dos agentes tóxicos, infecciosos ou alergênicos. Na regulação da inflamação mediada pela imunidade ou não específica, as células apresentadoras de antígenos como os macrófagos e as células dendríticas exercem um papel principal na manutenção da homeostasia (GOERDT; ORFANOS, 1999). Os macrófagos atuam na resposta imune inata e adquirida (celular e humoral), e são capazes de reconhecer e destruir componentes alterados do hospedeiro, como células apoptóticas e micro-organismos invasores, estando entre as primeiras células a interagir com estes. Dependendo dos receptores de reconhecimento utilizados e do estágio de diferenciação, os macrófagos podem agir de forma direta, pois liberam diversos produtos como radicais de hidrogênio e de nitrogênio, citocinas como TNF- $\alpha$ , quimiocinas, e, dependendo de sua capacidade fagocítica e destrutiva, podem eles mesmos eliminar os invasores; ou então podem, assim como as células dendríticas, agir de forma indireta, e influenciar a resposta Th1/Th2 da imunidade adquirida e, por sua vez, responder a células T ativas e linfócitos B, através de interações celulares e produtos solúveis como IFN- $\gamma$ , IL4 e IL13, e anticorpos que regulam suas atividades fagocíticas e eliminatórias (GORDON, 1998).

**Figura 26** – Determinação da produção de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, incubados na presença de CB, CB-RGDAds, CB-RGDI<sub>mz</sub>, células incubadas em LPS como controle positivo e células em meio de cultura RPMI-1640C como controle negativo (\* p < 0,0032).



**Fonte:** Elaborado pela autora.

As citocinas são proteínas pequenas, cujo agrupamento não é feito por *motif* de sequência de aminoácidos ou por estrutura tridimensional, mas sim por sua função biológica e, na maioria das vezes, estão envolvidas na resposta do hospedeiro à doença ou infecção e em mecanismos homeostáticos, e podem ser produzidas em todos os tecidos e pela maioria das células (DINARELLO, 2000; HOPKINS, 2003). O estímulo clássico para a produção de citocinas pelas células consiste na endotoxina bacteriana, ou lipopolissacarídeo (LPS), apesar de que vários outros componentes patogênicos ativam similarmente os receptores *Toll-like* (TLR) na superfície celular (HOPKINS, 2003).

A citocina TNF- $\alpha$  tem atividade citotóxica tumoral e caráter pró-inflamatório, é capaz de ativar vias inflamatórias semelhantemente ao LPS, como a que leva à produção de mediadores inflamatórios lipídicos e NO, à indução de moléculas de adesão celular particularmente no endotélio, e à indução da produção adicional de citocinas, incluindo a IL-6, a IL-8 e fatores estimuladores de colônias (CSFs) (HOPKINS, 2003).

Desta forma, os ensaios de produção de citocinas deste estudo têm a finalidade de, juntamente com a produção de NO e da avaliação de viabilidade celular, avaliar o caráter citotóxico e inflamatório das membranas de CB-RGDAds e CB-RGDI<sub>mz</sub> em comparação à CB pura, de forma a determinar o potencial como biomaterial para reparação tecidual de pele. Foi possível observar a partir dos resultados obtidos uma relação entre as sínteses de NO e de TNF- $\alpha$ , pois o aumento da produção de NO se deve, dentre outros fatores, à indução de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ . A CB-RGDI<sub>mz</sub> apresentou os melhores resultados, com as menores concentrações de ambos.

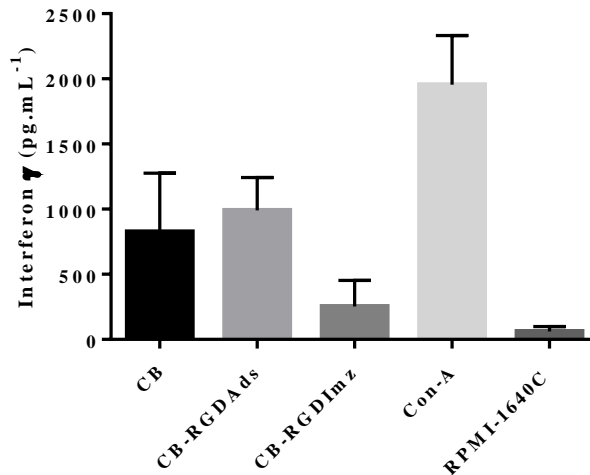
Citocinas podem atuar em sinergismo, como o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$ , na regulação das propriedades e da função dos macrófagos, com vários efeitos conhecidos, inclusive a geração de radicais livres como o NO (TENGGU-MUHAMMAD; CRYER; RAMJI, 1998).

#### **4.4.5. Determinação da liberação da citocina IFN- $\gamma$**

A citocina IFN- $\gamma$  foi quantificada no sobrenadante da cultura de células esplênicas de camundongos Balb/c, através de teste imunoenzimático comercial ELISA de captura, e os resultados foram expressos em concentração de IFN- $\gamma$  (em pg.mL<sup>-1</sup>), como média  $\pm$  desvio padrão, e representados na Figura 27.

A análise da liberação de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0657$ ) entre as membranas de CB ( $826,2 \text{ pg.mL}^{-1}$ ), de CB-RGDAds ( $991,5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) e de CB-RGDImz ( $252,9 \text{ pg.mL}^{-1}$ ).

**Figura 27** – Determinação da produção de IFN- $\gamma$  em cultura de esplenócitos de camundongos Balb/c, cultivados na presença de CB, CB-RGDAds, CB-RGDImz, Con-A: controle positivo e células em meio de cultura RPMI-1640C: controle negativo.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Embora originalmente definido como um agente com atividade antiviral direta, as propriedades do IFN- $\gamma$  incluem a regulação de diversos aspectos na regulação da resposta imune, a estimulação da atividade bactericida em fagócitos, a estimulação da apresentação de antígenos através de moléculas do MHC (*Major Histocompatibility Complex*: complexo de histocompatibilidade principal) de classe I e II, a orquestração de interações entre leucócitos-endotélio, efeitos na proliferação celular e na apoptose, bem como estimulação e repressão de uma variedade de genes cuja significância funcional permanece obscura (BOEHM et al., 1997).

Apesar da diferença entre os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos em resposta ao estímulo da presença das membranas em contato com os esplenócitos não ter sido estatisticamente significativo, é possível observar que, em relação ao controle positivo, estes mesmos níveis foram baixos.

Os ensaios de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em modelo murino oferecem uma boa perspectiva em relação às características de um biomaterial quanto à resposta inflamatória, entretanto, é necessário ressaltar que em situações *in vivo* a resposta imune apresenta um padrão de complexidade muito maior, envolvendo diversas moléculas, citocinas e vias de regulação.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível sugerir que a membrana de CB-RGDI<sub>mz</sub> constitui uma excelente alternativa para a finalidade almejada, para a utilização como biomaterial, curativo temporário ou suporte para reparação tecidual de pele.

Assim sendo, seria interessante para um estudo futuro mais aprofundado, aumentar os parâmetros de análise da CB, em especial da CB-RGDI<sub>mz</sub> que apresentou o melhor desempenho, incluindo, por exemplo, diversas concentrações do peptídeo imobilizado, outras citocinas pró e anti-inflamatórias medidas em períodos diferentes, e com padronização da produção das membranas em todas as suas etapas.

## *V. Conclusões*

---

---

## V. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram desenvolvidas membranas de celulose bacteriana funcionalizadas com um peptídeo contendo a sequência WTGRGDSPA, segundo duas diferentes metodologias, a de adsorção (CB-RGDAds) e a de imobilização por ligação covalente (CB-RGDI<sub>mz</sub>).

Os ensaios de caracterização mostraram que as membranas obtidas apresentam-se hidrofílicas, o que auxilia a interação entre células e superfície das membranas. Da mesma forma, foi possível observar que a funcionalização das membranas não promoveu modificação significativa sobre as propriedades de cristalinidade e morfologia da CB, nem alteração significativa na estabilidade térmica das membranas funcionalizadas.

No ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade com fibroblastos L929, a CB-RGDI<sub>mz</sub> apresentou melhores resultados em relação à quantidade de células viáveis, porém nenhuma das membranas de CB pura, CB-RGDAds ou CB-RGDI<sub>mz</sub> apresentou citotoxicidade considerável para os períodos analisados. O aspecto morfológico das células em contato com a membrana de CB-RGDI<sub>mz</sub> indicou características de boa adesão e proliferação, o que demonstra que a presença do peptídeo imobilizado sobre a superfície da CB apresentou melhores condições de superfície quando comparado às membranas de CB-RGDAds e de CB pura, enquanto que na CB-RGDAds parte das células apresentou características de apoptose.

A membrana CB-RGDI<sub>mz</sub> apresentou melhor desempenho quanto à determinação de citocinas e da produção de óxido nítrico na avaliação da resposta inflamatória pela interação de membranas e células, realizadas com células de camundongo Balb/c.

Conclui-se que a membrana de CB-RGDI<sub>mz</sub> é a mais promissora em relação à potencialidade para utilização como biomaterial, para reparação tecidual de pele, contudo os resultados obtidos para as membranas de CB pura e CB-RGDAds foram também considerados excelentes, indicando que estudos adicionais futuros para aprimoramento destes materiais seriam de grande relevância.

*Perspectivas futuras*

---

---

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Algumas sugestões de estudos futuros para complementar a avaliação dos materiais incluem o desenvolvimento da CB-RGDImz com diferentes concentrações de peptídeo imobilizado, a partir de metodologia padronizada de produção e secagem das membranas. A caracterização físico-química dos materiais envolvendo outras metodologias, bem como um espectro mais amplo de estudos *in vitro*, com culturas celulares de outras linhagens, principalmente de outros tipos de fibroblastos de linhagens não imortalizadas. A possível determinação da viabilidade celular por outras metodologias, juntamente com estudos morfológicos por fluorescência, análises de adesão e de proliferação quantitativas. Estudos *in vivo* para melhor avaliação da resposta imune, incluindo o estudo de cinética do peptídeo em relação à resposta inflamatória.



## *Referências*

---

---

## REFERÊNCIAS

- AL-WARHI, T. I.; AL-HAZIMI, H. M. A.; EL-FAHAM, A. Recent development in peptide coupling reagents. **J. Saudi Chem. Soc.**, v. 16, p. 97-116, 2012.
- AMBLARD, M. J.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods Mol. Biol.**, v. 298, p. 3-24, 2005.
- ANDRADE, F. K.; MOREIRA, S. M. G.; DOMINGUES, L.; GAMA, F. M. P. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 92, n. 1, p. 9-17, Jan. 2010.
- ARZUMANIAN, V.; STANKEVIČIUS, E.; LAUKEVIČIENĖ, A.; KĖVELAITIS, E. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells. **Medicina**, v. 39, n. 6, p. 535-541, 2003.
- BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006.
- BAGLOLE, C. J.; SMITH, T. J.; FOSTER, D.; SIME, P. J.; FELDON, S.; PHIPPS, R. P. Functional assessment of fibroblast heterogeneity by the cell-surface glycoprotein Thy-1. In: MADAME Curie bioscience database [internet]. Austin: Landes Bioscience, 2000. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6131](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6131)>. Acesso em: 27.jan.2015.
- BARCELLOS, G. B.; PAULI, P.; CACERES, R. A.; TIMMERS, L. F. S. M.; DIAS, R.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. Molecular modeling as a tool for drug discovery. **Curr. Drug Targets**, v. 9, p. 1084-1091, 2008.
- BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; MATRINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 87, p. 815-818, 2007.
- BARUD, H. S.; ARAÚJO JUNIOR, A. M.; SANTOS, D. B.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES FILHO, G.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochim. Acta**, v. 471, n. 1/2, p. 61-69, May 2008.

BARUD, H. S.; ARAÚJO JUNIOR, A. M.; SASKA, S.; MESTIERI, L. B.; CAMPOS, J. A. D. B.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, N. U.; NASCIMENTO, A. P.; MIGUEL, F. G.; VAZ, M. M. O. L. L.; BARIZON, E. A.; OLIVEIRA, F. M. de; GASPAR, A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BERRETTA, A. A. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **J. Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

BELLIS, S. L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, n. 18, p. 4205-4210, June 2011.

BODIN, A.; AHRENSTEDT, L.; FINK, H.; BRUMER, H.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Modification of nanocellulose with a xyloglucan-RGD conjugate enhances adhesion and proliferation of endothelial cells: implications for tissue engineering. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 12, p. 3697-3704, 2007.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J. C. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 749-795, 1997.

BRENNER, S. E.; CHOTHIA, C.; HUBBARD, T. J. P. Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, p. 6073-6078, May 1998.

BROUGHTON, G. I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 117, n. 7, p. 1e-S-32e-S, June 2006.

BROWN, R. M. Jr; WILLISON, J. H. M.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 73, n. 12, p. 4565-4569, Dec. 1976.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 20, n. 1, p. 51-58, mar. 2007.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000.

CHANG, H.; WANG, Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. In: EBERLI, D. (Ed.). **Regenerative medicine and tissue engineering: cells and biomaterials**. [Rijeka]: InTech, 2011. p. 569-588.

CLARK, R. A. F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1996.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1397-1406, 2001.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Jr. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3-4, p. 403-411, Sept. 2004.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M. Jr. Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, Jan. 2006.

CZAJA, W.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. Jr. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

DAHL, S. G.; SYLTE, I. Molecular modelling of drug targets: the past, the present and the future. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 96, p. 151-155, 2005.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, p. 9-22, Jan. 2010.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci. Transl. Med.**, v. 6, n. 265, Dec. 2014. doi:10.1126/scitranslmed.3009337.

ENWEREM, I.; WANG, J.; LESZCZYNSKI, J. In search of active RGD peptides: theoretical study of hydrogen bonding in five-member ring cyclic-RGD isomers. **Comp. Theor. Chem.**, v. 998, p. 141-147, Oct. 2012.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydr. Polym.**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, Feb. 2013.

FUJIMURA, T.; MORIWAKI, S.; IMOKAWA, G.; TAKEMA, Y. Crucial role of fibroblast integrins  $\alpha 2$  and  $\beta 1$  in maintaining the structural and mechanical properties of the skin. **J. Dermatol. Sci.**, v. 45, n. 1, p. 45-53, Jan. 2007.

GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 9105-9110, 2011.

GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; JAGANNATH, J. H.; BAWA, A. S. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: some thermo-mechanical properties. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 37, p. 189-194, 2005.

GERSTEIN, M.; LEVITT, M. Comprehensive assessment of automatic structural alignment against a manual standard, the scop classification of proteins. **Protein Sci.**, v. 7, p. 445-456, 1998.

GEYER, U.; HEINZE, T.; KLEMM, D.; MARSCH, S.; SCHUMANN, D.; SCHMAUDER, H. P. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 16, n. 6, p. 343-347, Dec. 1994.

GOERDT, S.; ORFANOS, C. E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 10, p. 137-142, 1999.

GOLDSTEIN, A. S. Cell adhesion. In: FISHER, J. P.; MIKOS, A. G.; BRONZINO, J. D. (Ed.). **Tissue engineering**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 5/1-5/17.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 685-688, 1998.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

HARDIN, C.; POGORELOV, T. V.; LUTHEY-SCHULTEN, Z. *Ab initio* protein structure prediction. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 176-181, Apr. 2002.

HERSEL, U.; DAHMEN, C.; KESSLER, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4385-4415, Nov. 2003.

HIRAI, A.; TSUJI, M.; HORII, F. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4°C. **Cellulose**, v. 9, p. 105-113, 2002.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg. Med.**, v. 5, p. S45-S57, 2003.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **ISO 10993-5**: biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 2009.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev. Med.**, São Paulo, v. 89, n. 3/4, p. 125-131, 2010.

JAMES, S. E.; BOOTH, S.; GILBERT, P.; JONES, I.; SHEVCHENKO, R. Clinical approaches to skin regeneration. In: SANTIN, M. (Ed.). **Strategies in regenerative medicine**: integrating biology with materials design. New York: Springer, 2009.

JIPA, I. M.; STROESCU, M.; STOICA-GUZUN, A.; DOBRE, T.; JINGA, S.; ZAHARESCU, T. Effect of gamma irradiation on biopolymer composite films of poly(vinyl alcohol) and bacterial cellulose. **Nucl. Instrum. Meth. B.**, v. 278, p. 82-87, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Bioch.**, v. 34, n. 2, p. 595-598, Apr. 1970.

KALASKAR, D. M.; GOUGH, J. E.; ULIJN, R. V.; SAMPSON, W. W.; SCURR, D. J.; RUTTEN, F. J.; ALEXANDER, M. R.; MERRY, C. L. R.; EICHHORN, S. L. Controlling cell morphology on amino acid-modified cellulose. **Soft Matter**, v. 4, n. 5, p. 1059-1065, Mar. 2008.

KAMINSKI, K. A.; BONDA, T. A.; KORECKI, J.; MUSIAL, W. J. Oxidative stress and neutrophil activation: the two keystones of ischemia/reperfusion injury. **Int. J. Cardiol.**, v. 86, n. 1, p. 41-59, 2002.

KILBOURN, R. G.; GRIFFITH, O. W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 84, n. 11, p. 827-831, June 1992.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, May 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Ed.). **Robbins e Cotran: patologia - bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LEE, B. H.; KIM, H. J.; YANG, H. S. Polymerization of aniline on bacterial cellulose and characterization of bacterial cellulose/polyaniline nanocomposite films. **Curr. Appl. Phys.**, v. 12, p. 75-80, 2012.

LUZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C. Artigo revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica**, v. 54, n. 330, p. 174-183, jun. 2008.

MANDELBAUM, S. R.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARCHETTO, R. **A química de peptídeos e o mecanismo de ação da DNA girase**. 2006. 94 f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

- MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr. Comput. Aided Drug Des.**, v. 7, n. 2, p. 146-157, June 2011.
- MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.
- MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydr. Polym.**, v. 117, p. 518-523, 2015.
- MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. **Carbohydr. Polym.**, v. 106, p. 132-141, 2014.
- MONTESINOS, J. J.; FLORES-FIGUEROA, E.; CASTILLO-MEDINA, S.; FLORES-GUZMÁN, P.; HERNÁNDEZ-ESTÉVEZ, E.; FAJARDO-ORDUÑA, G.; OROZCO, S.; MAYANI, H. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. **Cytotherapy**, v. 11, n. 2, p. 163-176, 2009.
- MOREIRA, S.; SILVA, N. B.; ALMEIDA-LIMA, J.; ROCHA, H. A. O.; MEDEIROS, S. R. B.; ALVES JUNIOR, C.; GAMA, F. M. BC nanofibres: *in vitro* study of genotoxicity and cell proliferation. **Toxicol. Lett.**, v. 189, n. 3, p. 235-241, Sept. 2009.
- PALOMO, J. M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. **RSC Adv.**, v. 4, n. 62, p. 32658-32672, 2014.
- PHISALAPHONG, M.; JATUPAIBOON, N. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film. **Carbohydr. Polym.**, v. 78, n. 3, p. 482-488, Nov. 2008.
- PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, n. 5963, p. 30-33, May 1984.
- POLETTI, M.; PISTOR, V.; ZATTERA, A. J. Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. In: van de VEN, T.; GODBOUT, L. (Ed.). **Cellulose: fundamental aspects**. Rijeka: InTech, 2013. Chap. 2, p. 45-68.
- PTAFF, E. Recognition sites of RGD-dependent integrins. In: EBLE, J. A.; KUHN, K. (Ed.) **Integrin-ligand interactions**. Austin: R.G. Landes, 1997.
- RETEGI, A.; GABILONDO, N.; PEÑA, C.; ZULUAGA, R.; CASTRO, C.; GAÑAN, P.; CABA, K.; MONDRAGON, I. Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships. **Cellulose**, v. 17, p. 661-669, 2010.

ROY, S.; DAS, A.; GANESH, K.; SEN, C. K. Wound inflammation: from initiation to resolution. In: AGGARWAL, B. B.; KRISHNAN, S.; GUHA, S. (Ed.). **Inflammation, lifestyle and chronic diseases: the silent link**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 183-201.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 12, n. 1, p. 697-715, 1996.

SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; QUINTANA, E.; IBARRA, D.; GOMEZ, N.; LADERO, M.; EUGENIO, M. E.; VILLAR, J. C. Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. **Carbohydr. Polym.**, v. 116, p. 173-181, Feb. 2015.

SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Int. J. Biomater.**, v. 2011, 2011. doi: 10.1155/2011/175362.

SASKA, S.; TEIXEIRA, L. N.; OLIVEIRA, P. T.; GASPAR, A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y.; MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. **J. Mater. Chem.**, v. 22, n. 41, p. 22102-22112, Sept. 2012.

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN, A.; CONRAD, C. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Text. Res. J.**, v. 29, p. 786-794, 1959.

SEOW, K. T.; XIONG, J. P.; ARNAOUT, M. A.; WELGE, J.; RIPPMANN, F.; GOODMAN, S. L. Divalent cations and the relationship between  $\alpha$ A and  $\beta$ A domains in integrins. **Biochem. Pharmacol.**, v. 64, n. 5/6, p. 805-812, 2002.

SHAW, D. J. **Introdução à química de colóides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

SHEYKHNAZARI, S.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers: effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydr. Polym.**, v. 86, n. 3, p. 1187-1191, 2011.

SHU, X. Z.; GHOSH, K.; LIU, Y.; PALUMBO, F. S.; LUO, Y.; CLARK, R. A.; PRESTWICH, G. D. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 68, n. 2, p. 365-375, Feb. 2004.

SONNEMANN, K. J.; BEMENT, W. M. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 27, p. 237-263, 2011.

STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M.; JIPA, I.; DOBRE, L.; ZAHARESCU, T. Effect of  $\gamma$  irradiation on poly(vinyl alcohol) and bacterial cellulose composites used as packaging materials. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 84, p. 200-204, 2013.



STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Mater. Sci. Eng., C**, v. 33, p. 4739-4745, 2013.

TENGGU-MUHAMMAD, T. S.; CRYER, A.; RAMJI, D. P. Synergism between interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in the regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line. **Cytokine**, v. 10, n. 1, p. 38-48, 1998.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput. Chem.**, v. 31, n. 2, p. 455-461, Jan. 2010.

UNIVERSITY OF CHICAGO MEDICINE. **Skin cancer screening (PDQ®)**. Chicago, 2015. Disponível em: <<http://www.uchospitals.edu/online-library/content=CDR258037>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

van der FLIER, A.; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. **Cell Tissue Res.**, v. 305, n. 3, p. 285-298, Sept. 2001.

VENTRE, M.; NETTI, P. A.; URCIUOLO, F.; AMBROSIO, L. Soft tissues characteristics and strategies for their replacement and regeneration. In: SANTIN, M. (Ed.) **Strategies in regenerative medicine: integrating biology with materials design**. New York: Springer, 2009.

WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. The structure and function of skin. In: WALTERS, K. A. (Ed.) **Dermatological and transdermal formulations**. New York: Marcel Dekker, 2002.

WAN, Y. Z.; HONG, L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y. L.; JIANG, H. J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites. **Compos. Sci. Technol.**, v. 66, p. 1825-1832, 2006.

ZHANG, Z.; LAI, Y.; YU, L.; DING, J. Effects of immobilizing sites of RGD peptides in amphiphilic block copolymers on efficacy of cell adhesion. **Biomaterials**, v. 31, n. 31, p. 7873-7882, Nov. 2010.

*Anexo*



## ANEXO

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais nº 09/2015.

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 48/2014

Interessada: RUTE LOPES

Orientadora: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Projeto: Funcionalização de celulose bacteriana com peptídeo RGD para reparação tecidual de pele

### **Parecer nº 09/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 12 de fevereiro de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Funcionalização de celulose bacteriana com peptídeo RGD para reparação tecidual de pele", apresentado pela pós-graduanda RUTE LOPES, sob orientação do Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Clínica do Instituto de Química(IQ/Ar), está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MAIO de 2015 em formulário para este fim.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2015.



Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> CARLOS CESAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA