

JOSÉ GREGORIO MARTÍN BEDOYA

Biomaterial a base de celulose bacteriana com aplicação na regeneração de tecido cutâneo

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara - SP  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

M381b      Martín Bedoya, José Gregorio  
              Biomaterial a base de celulose bacteriana com aplicação  
              na regeneração de tecido cutâneo / José Gregorio Martín  
              Bedoya. – Araraquara: [s.n.], 2019  
              77 p.: il.

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

              1. Materiais biomédicos. 2. Celulose. 3. Peptídeos.  
              4. Cicatrização de ferimentos. 5. Citotoxicidade. I. Título



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Biomaterial a base de celulose bacteriana com aplicação na regeneração de tecido cutâneo"

**AUTOR: JOSÉ GREGORIO MARTÍN BEDOYA**

**ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. LUIS GERALDO VAZ  
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia - UNESP - Araraquara

Araraquara, 08 de março de 2019

## DADOS CURRICULARES

### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** José Gregorio Martín Bedoya

**Nome em citação Bibliográfica:** Martín J. G. B.

**Filiação:** María Rubiela Bedoya

**Data de nascimento:** 03/08/1985, Bogotá-Co

**Estado civil:** Solteiro

**Telefone:** (16) 996459658

**E-mail:** martins385@gmail.com

- 2. Resumo das Qualificações:** Mestrando em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho- UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase no desenvolvimento de biomateriais. Químico industrial pela Universidade Tecnológica de Pereira (2012).

### 3. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2017 – 2019      Mestrado em Biotecnologia.  
Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho,  
Instituto de Química-Araraquara.  
Título: Biomaterial a base de celulose bacteriana com  
aplicação na regeneração de tecido cutâneo  
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.  
Bolsista Capes: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
de Nível Superior.
- 2009 – 2012      Químico industrial  
Universidade Tecnológica de Pereira  
Título: Evaluación de las actividades antibacteriana y  
alelopática del extracto en acetato de etilo y de algunas  
fracciones de Miconia caudata (Bonpl.) DC.  
Orientador: Luz Stella Ramírez Aristizabal  
Co-orientador: Francisco Javier Jiménez

#### 4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1º Encontro Brasileiro de Biocelulose, Araraquara, SP, 4 e 5 de junho de 2018.

- Bacterial Cellulose Membranes Modified with RGD Peptides for Skin Tissue Repair.

46ª Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, SP, 27 a 30 de junho de 2017.

- Bacterial Cellulose Membranes Modified with RGD Peptides for Skin Tissue Repair

#### 5. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

##### 5.1. Artigos completos publicados em periódicos

RAMÍREZ, L.S.A., MONTES, A.M.O., MARTÍN, J.G.B., JIMÉNEZ, F.J.G. Allelopathic activity evaluation of ethyl acetate extract from *Miconia caudata* (BONPL.) DC. **Cienc. Básicas.**, v. 13(2), p. 100-104, 2017.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares que me incentivaram e apoiaram imensamente para eu alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Reinaldo Marchetto pela atenção, paciência, ensinamentos e pela oportunidade de realizar o presente trabalho e Edson Crusca por toda a ajuda com o projeto e amizade.

Aos meus companheiros de “salinha de estudos”, Beatriz Sanchez, Bianca Marques, Milena Barbosa, Rodolfo Carrijo, Camila Aguiar, Jonatas Angelo, Lorrane Davi, Jesseline Silva, Aline Buda, Carolina Zambom, Caio Proft, Leonardo Santos, Fauller Henrique, Sara Zenatti, Zaida Bazzo e Prof. Dr. Saulo Santesso pela convivência diária, pela à amizade, por todo seu apoio e colaboração.

À Profa. Dra. Débora Terezia Balogh, por ceder o laboratório do Grupo de polímeros do IFSC na utilização do Goniômetro.

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, pela orientação nos ensaios e pela à amizade.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Instituto de Química - UNESP pela atenção.

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

E a todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram na realização desta pesquisa.

## Resumo

A celulose bacteriana (CB) é sintetizada por vários tipos de bactérias, com maior eficiência pela *Gluconacetobacter xylinus*. A CB é um biomaterial que têm uma estrutura de rede de nano fibras tridimensional com propriedades como biocompatibilidade, não toxicidade, estabilidade mecânica e alto teor de umidade, que a torna promissora para diversas aplicações, sendo que na engenharia de tecidos sua multifuncionalidade abrange a substituição temporária de tecido epitelial em casos de queimaduras, úlceras, lesões, carreador de fármacos, dentre outros propósitos. Apesar da CB apresentar potencial para ser utilizado como curativo, faz-se necessário a realização de modificações de sua superfície, com a incorporação de moléculas de adesão celular, para ajustar as deficiências da CB nativa, a fim de melhorar a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, tornando-se promissora para aplicações biomédicas. Deste modo, este trabalho objetivou desenvolver um curativo à base de CB contendo peptídeo promotor de adesão celular RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico), sequência encontrada em várias proteínas da matriz extracelular (MEC), e avaliar *in vitro* sua viabilidade e proliferação de fibroblastos, com a finalidade de aplicação em regeneração tecidual de pele. O peptídeo RGD utilizado (JGB2) foi escolhido por meio de estudos computacionais, sendo sintetizado pelo método da fase sólida (estratégia Fmoc), purificado por CLAE e caracterizado por espectrometria de massas. Membranas de CB foram produzidas por *G. xylinus*, purificadas e funcionalizadas pela esterificação de dois resíduos de lisina, para incorporação do peptídeo JGB2. Diferentes amostras da CB foram caracterizadas a partir de análises de liberação prolongada do peptídeo JGB2, medidas de ângulo de contato, resistência à tração, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG), difração de raios-X (DRX) e espectroscopia de absorção na região de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). Os resultados obtidos mostraram que a funcionalização da membrana com lisina não resultou em alterações significativas na estrutura e morfologia nas membranas. Comparativamente à CB pura, a funcionalização da CB, aumentou a quantidade de peptídeo adsorvido e quadruplicou o tempo de liberação do peptídeo da membrana, características desejáveis para aplicação em processos de regeneração tecidual. Também foi possível constatar que a membrana funcionalizada com o aminoácido lisina contendo o peptídeo JGB2, apresentou desempenho superior nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade, e, por conseguinte, possui grande potencial para ser estudada mais detalhadamente e eventualmente ser aplicada como biomaterial na reparação tecidual de pele.

**Palavras-chave:** Materiais biomédicos, celulose, peptídeos, cicatrização de ferimentos, citotoxicidade.





## Abstract

Bacterial cellulose (BC) is synthesized by some bacteria, with greater efficiency by *Gluconacetobacter xylinus*. BC is a biomaterial that has a network 3-D structure of nanofibers with properties like biocompatibility, non-toxicity, mechanical stability, and high moisture content, which makes it promising for a wide range of applications, being that in the engineering of tissue its multifunctionality includes the temporary substitution of epithelial tissue in cases of burns, ulcers, injuries, drug carriers, among other purposes. Although CB present potential to be used as a dressing, it is necessary to perform modifications of its surface with the incorporation of cell adhesion molecules to adjust the deficiencies of the native CB, in order to improve cell adhesion, migration, proliferation and differentiation, making it a promising material for biomedical applications. In this way, this work aimed to develop a dressing based on BC containing peptide promoter of cell adhesion RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid), sequence found in several extracellular matrix proteins (ECM) and to evaluate *in vitro* its viability and proliferation of fibroblasts, with the purpose of application in skin tissue regeneration. The RGD peptide used (JGB2) was chosen by means of computational studies, synthesized by the solid phase method (Fmoc strategy), purified by HPLC and characterized by mass spectrometry. CB membranes were produced by *G. xylinus*, purified and functionalized by the esterification of two lysine residues, for incorporation of the JGB2 peptide. Different CB samples were characterized from analyzes of prolonged release of the JGB2 peptide, measurements of contact angle, tensile strength, scanning electron microscopy (SEM-FEG), X-ray diffraction (XRD) and spectroscopy absorption in the infrared region with Fourier Transform (FT-IR). The results showed that membrane functionalization with lysine did not result in significant changes in membrane structure and morphology. Compared to pure CB, CB functionalization increased the amount of adsorbed peptide and quadrupled membrane peptide release time, desirable characteristics for application in tissue regeneration processes. It was also possible to verify that the functionalized membrane containing the JGB2 peptide presented superior performance in the *in vitro* cytotoxicity assays, and therefore has great potential to be studied in more detail and eventually be applied as biomaterial in skin tissue repair.

**Keywords:** Biomedical materials, cellulose, peptides, wound healing, cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da pele. ....	15
Figura 2. Estrutura da celulose, com detalhe para a estrutura monomérica da $\beta$ -D-glicopirranose.....	23
Figura 3. Sequência RGD, fórmula molecular e nomenclatura.....	26
Figura 4. Estrutura primária da região 1511-1540 da fibronectina humana (A) e das sequências peptídicas escolhidas para síntese (B e C).....	33
Figura 5. Estrutura primária dos peptídeos RGD sintetizados.....	34
Figura 6. Esquema da funcionalização dos grupos -OH da superfície da membrana de CB. A. Reação de esterificação das hidroxilas da CB e acoplamento do Fmoc-Lys(Fmoc). B. Reação de desproteção dos grupamentos amino.....	37
Figura 7. Ângulos de contato da intercepção do líquido com a superfície sólida: (a) não molhante; (b) molhamento parcial; (c) espalhamento total. ....	39
Figura 8. Modelo tridimensional dos peptídeos RGD analisados, sendo L1 (A) utilizado como referência, L2 (B) e L3 (C) as duas sequências de interesse para comparação.....	46
Figura 9. Diagrama de interação de ligante do Maestro entre PA e L1 (A), L2 (B) e L3 (C). 47	
Figura 10. Esquema da formação de uma ligação peptídica entre um aminoácido C-terminal (ligado a uma resina R) e um aminoácido adjacente na sequência .....	49
Figura 11. Estrutura molecular parcial de uma Rink Amida MBHA Resina .....	50
Figura 12. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo JGB1 antes (A) e após purificação (B). Coluna de fase reversa C <sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm. ....	51
Figura 13. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo JGB2 antes (A) e após purificação (B). Coluna de fase reversa C <sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm. ....	51
Figura 14. Espectro de massas do peptídeo JGB1. Condições de ESI-MS: capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES+.....	52
Figura 15. Espectro de massas do peptídeo JGB2. Condições de ESI-MS: capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES+.....	53
Figura 16. Imagens capturadas pela câmera CCD, no ensaio de ângulo de contato para a membrana secas de CB pura (A); membrana de CB-JGB2 (B); membrana de CBKK (C) e membrana de CBKK-JGB2 (D).....	56

Figura 17. Micrografias de MEV mostrando a superfície das membranas liofilizadas de CB pura (A), CBK-JGB2 (B) e CBKK-JGB2 (C).....	58
Figura 18. Padrão de difração de raios X para CB pura (A), CB-JGB2 (B), CBK-JGB2 (C) e CBKK-JGB2 (D), com bandas assinaladas. ....	60
Figura 19. Espectro FT-IR das membranas: (A) CB, (B) CB-JGB2, (C) CBK-JGB2 e (D) CBKK-JGB2. ....	62
Figura 20. (A) Espectro de fluorescência do peptídeo JGB2 ( $\lambda_{exc} = 280$ nm), (B) curva padrão da intensidade de fluorescência mostrando a equação da reta e o coeficiente de determinação. ....	64
Figura 21. Curva de liberação com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em duplicata para A) CB-JGB2; B) para a CBK-JGB2 e C) para a CBKK-JGB2 e C) Curvas de liberação do peptídeo JGB2 adsorvido das membranas de CB; CBK-JGB2 e CBKK-JGB2.....	65
Figura 22. Teste de citotoxicidade celular pelo método de MTT para as células L929, expresso em %Viabilidade, com tempo de incubação das amostras de 24, 48 e 72 h. ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citocinas expressadas na ferida durante o processo de cicatrização.....	18
Tabela 2. Classificação geral de heterodímero de integrina constituídas por 24 receptores de integrinas e seus respectivos ligantes. ....	25
Tabela 3. Identificação de estruturas de ligantes e receptores modelados tridimensionalmente por bioinformática. ....	32
Tabela 4. Resultado da análise de espectrometria de massas. Razão massa molecular/carga (g.mol <sup>-1</sup> ) teórica calculada .....	53
Tabela 5. Valores mensurados do ensaio de ângulo de contato para as amostras de CB, CB-JGB2, CBKK e CBKK-JGB2. T=5 s, n=3.....	56
Tabela 6. Designação das principais bandas vibracionais de absorção de infravermelho das amostras de CB.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### 1. Aminoácidos

Ala (A) - alanina  
Arg (R) - arginina  
Asn (N) - asparagina  
Asp (D) - ácido aspártico  
Gly (G) - glicina  
Ile (I) - isoleucina  
Lys (K) - lisina  
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)  
bFGF Crescimento de fibroblastos básico  
bFF: Fator fibroblástico básico  
Boc: terc-Butiloxicarbonila  
CB: Celulose bacteriana  
CCD: *Charge Coupled Device*  
CDI: 1,1'-carbonildiimidazol  
CLAE: Cromatografia líquida de Alta Eficiência  
DCM: Diclorometano  
DIC: N,N'-Diisopropilcarbodiimida  
DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium  
DMF: N,N-Dimetilformamida  
DRX: Difractometria de raios-X  
EC: Células endoteliais  
EGF: Fator de crescimento epidérmico  
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos  
Fmoc: 9-Fluorenilmetiloxicarbonila

FN:	Fibronectina
FT-IR:	Infravermelho com Transformada de Fourier
GI:	Grau de incorporação
HOBt:	N-Hidroxibenzotriazol
HPLC:	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IFN- $\gamma$ :	Interferon gama
IGF-1:	Fator de crescimento insulínico-1
KGF:	Fator de crescimento derivado de queratinócito
IL:	Interleucina
LOMETS:	<i>Local Meta-Threading-Server</i>
MEC:	Matriz extracelular
MEV-FEG:	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução de emissão de campo
MMP:	Metaloproteinases de matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NMI:	N-metilimidazol
PBS:	Solução salina tamponada de fosfatos
PDGF:	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Phyre2:	<i>Protein Homology / AnalogY Recognition Engine</i>
RGD:	Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
SBF:	<i>Simulated body fluid</i>
SPFS:	Síntese de peptídeos em fase sólida
tBu:	terc-Butila
TFA:	Ácido trifluoroacético
TGF- $\alpha$ :	Fator de transformação de crescimento alfa
TGF- $\beta$ :	Fator de transformação de crescimento beta
TIS:	Triisopropilsilano
TNF- $\alpha$ :	Fator de necrose tumoral alfa
UniProtKB:	<i>UniProt Knowledgebase</i>
UV-Vis:	Ultravioleta-visível
VN:	Vitronectina
vWF:	Fator von Willebrand
YPD:	Yeast extract – Peptone – Dextrose

## Sumário

1.	Introdução .....	15
1.1.	O tecido cutâneo .....	15
1.2.	Processo de cicatrização .....	17
1.3.	Celulose Bacteriana (CB).....	22
1.4.	Peptídeos RGD no processo de regeneração tecidual .....	25
2.	Objetivos	29
3.	Materiais e Métodos.....	30
3.1.	Análise computacional do peptídeo RGD como ligante e <i>docking</i> a proteínas receptoras.....	30
3.2.	Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana.....	33
3.3.	Síntese Química dos peptídeos RGD.....	34
3.4.	Purificação e caracterização .....	35
3.5.	Funcionalização da celulose bacteriana.....	36
3.6.	Caracterização das membranas .....	38
3.6.1.	Ângulo de contato.....	38
3.6.2.	Microscopia Eletrônica de varredura de Alta Resolução de emissão de campo (MEV-FEG).....	40
3.6.3.	Difratometria de Raios-X (DRX) .....	40
3.6.4.	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	42
3.7.	Liberação do peptídeo da membrana de celulose .....	42
3.8.	Análises <i>in vitro</i> .....	43
4.	Resultados e Discussão .....	46
4.1.	Análise computacional do peptídeo RGD como ligante e <i>docking</i> a proteínas receptoras.....	46
4.2.	Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos RGD.....	48
4.3.	Funcionalização e incorporação do peptídeo JGB2 ao suporte de celulose bacteriana.....	54
4.4.	Caracterização das membranas .....	55

4.4.1.	Ângulo de contato.....	55
4.4.2.	Microscopia Eletrônica de varredura de Alta Resolução de emissão de campo (MEV-FEG).....	57
4.4.3.	Difratometria de Raios-X (DRX) .....	60
4.4.4.	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ....	61
4.5.	Liberação do peptídeo.....	63
4.6.	Análises <i>in vitro</i> .....	65
5.	Conclusões.....	70
6.	Perspectivas.....	71
7.	Referências .....	72

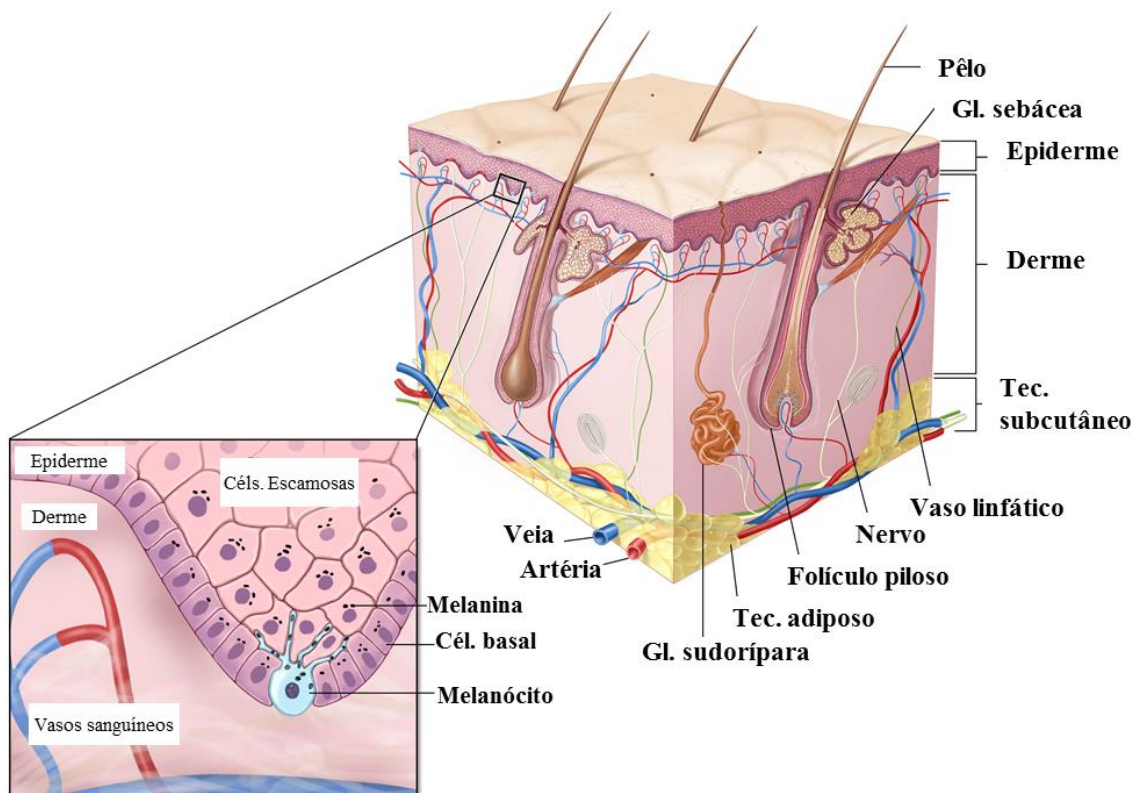


## 1. Introdução

### 1.1. O tecido cutâneo

A pele é uma estrutura multicamadas, considerada o maior órgão do corpo humano que corresponde aproximadamente 15% de massa corporal de uma pessoa adulta. É constituída anatomicamente e funcionalmente por duas camadas, a epiderme e a derme, ilustradas na Figura 1. Apresenta estruturas anexas como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A derme contém fibras de colágeno e fibras elásticas, além de gordura subcutânea subjacente. A pele contribui muito para a barreira imunológica física, química/bioquímica e adaptativa (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

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



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

A pele funciona criticamente na manutenção da homeostase interna enquanto protege do ambiente externo (MURPHREE, 2017). Atua na proteção do organismo contra atritos, impedindo a penetração de materiais estranhos e perda de fluidos essenciais ao funcionamento do organismo, além da sua atuação como barreira contra perigos ambientais, como microrganismos, radiação e alérgenos. Ela detecta estímulos externos como pressão, dor, calor, frio e outros estímulos através das terminações nervosas sensitivas e contribui com a síntese de vitamina D e com a regulação térmica do organismo (WALTERS; ROBERTS, 2002; JAMES et al., 2009; VENTRE et al., 2009). Em seu estado ideal, a pele é macia, seca, flexível e intacta, além da natureza ácida com um pH entre 4 e 6,8 (MURPHREE, 2017).

A epiderme é a camada mais externa da pele que fornece proteção contra o ambiente externo. A principal célula é o queratinócito (95% das células), enquanto os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel compõem os 5% restante. Os queratinócitos produzem lipídios na pele e ajudam a manter a hidratação da pele, preenchendo os espaços entre as células da pele criando uma pele intacta.

Subjacente à epiderme está a derme, vascularizada, que fornece suporte e nutrição para as células em divisão na epiderme. É formada por componentes intersticiais (fibras colágenas, tecido elástico, substância fundamental) e componentes celulares (fibroblastos, mastócitos, plasmócitos, linfócitos, células dendríticas dérmicas, histiócitos). Ademais, contém nervos e apêndices: glândulas sudoríparas, folículos capilares e glândulas sebáceas (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

Os fibroblastos são células mesenquimais que depositam fibras de colágeno e elastina. Diferentes subpopulações de fibroblastos diferencialmente contribuem para a homeostase da pele, cicatrização de feridas, cicatrização e formação de folículos pilosos. Os histiócitos são células que apresentam antígenos que fagocitam e degradam substâncias estranhas e apresentam antígenos para as células T. Os mastócitos, são distribuídos próximos aos vasos sanguíneos dérmicos e são responsáveis por secretar quimiotransmissores, como histamina durante uma reação alérgica (MURPHREE, 2017).

A hipoderme ou tecido subcutâneo é a camada mais interna da pele que une a erme aos tecidos e órgãos subjacentes. Composta por adipócitos que estão organizados em lóbulos de gordura, separados por septos fibrosos. Esses feixes de

---

fibras se originam da derme e se estendem para o tecido subcutâneo e fortalecem a conexão entre esses dois compartimentos (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

## 1.2. Processo de cicatrização

Estímulos danosos à estrutura e fisiologia da pele, como a interrupção da continuidade de um tecido corpóreo podem ser provocados por um amplo espectro de fatores, tais como traumas físicos, queimaduras, cortes, ressecções cirúrgicas, úlceras que podem ainda ser agudas ou crônicas. A partir destes estímulos, desencadeia-se a cicatrização 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, tais como inflamação e hemostasia, quimiotaxia, migração celular, fagocitose, síntese e degradação de colágeno, angiogênese, remodelação da MEC, contração e reepitelização (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Tradicionalmente, estes processos são divididos em três fases conhecidas como hemostasia e inflamação, proliferação e remodelação tecidual. 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 (REINKE; SORG, 2012).

Na hemostasia a pele lesada libera fatores de coagulação e colágeno. As plaquetas se ativam por ligação ao colágeno, o que resulta em desgranulação (grânulos liberados pelas plaquetas) liberando citocinas (antimicrobianas e quimiocinas) e fatores de crescimento (Tabela 1), como o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), tromboxanas e outros fatores liberados, para mediar o processo formação de coágulo de fibrina. Ao mesmo tempo, os vasos lesados seguem uma vasoconstrição desencadeada pelas plaquetas para reduzir a perda de sangue e preencher os espaços entre os tecidos com um coágulo sanguíneo composto por citocinas e fatores de crescimento. Ademais, as plaquetas também liberam moléculas de fibrina, fibronectina (FN), vitronectina (VN), fator de Von Willebrand (vWF) e trombospondina, que promovem a agregação plaquetária e formam parte do coágulo que serve como matriz provisória para a migração de

leucócitos, queratinocitos, fibroblastos e células endoteliais, bem como reservatório de fatores de crescimento (REINKE; SORG, 2012).

**Tabela 1.** Citocinas expressadas na ferida durante o processo de cicatrização.

Citocinas	Células protetoras	Ação biológica
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Macrófagos, mastócitos, linfócitos T	Quimiotaxia para macrófagos e outros fatores de crescimento, mitogênicos para fibroblastos, estimula a angiogênese, regula/induz síntese e degradação de colágeno, induz marginalização e citotoxicidade das células polimorfonucleares.
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Macrófagos, linfócitos T, queratinocitos	Mitogênica para queratinocitos e fibroblastos, estimula a migração de queratinocitos.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Plaquetas, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos	Quimiotaxia, Transdiferenciação de fibroblastos a miofibroblastos, construção de matriz de colágeno, estimula a angiogênese, contração da ferida, liberação de outros fatores de crescimento Estimulação de MMP
<b>ILs (1, 6)</b>	Macrófagos, mastócitos, queratinocitos, linfócitos	IL-1: aumenta TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ , induz quimiotaxia de queratinocitos, neutrófilos e fibroblastos, bem como ativação de neutrófilos IL-6: Induz proliferação de fibroblastos
<b>PDGF</b>	Plaquetas, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos,	A quimiotaxia celular, mitogênica para fibroblastos e macrófagos, estimula a angiogênese, induz síntese de colágeno e proteoglicano estimulando a contração da ferida
<b>EGF</b>	Plaquetas, macrófagos	Mitogênica para queratinócitos e fibroblastos, estimula a migração de queratinocitos
<b>VEGF</b>	Plaquetas neutrófilos queratinocitos	Estimular a angiogênese, Neovascularização
<b>Prostaglandina E<sub>2</sub></b>	Queratinócitos, macrófagos Células endoteliais	Vasodilatação, Desagregação de plaquetas, Aumento da permeabilidade vascular
<b>Tromboxano A<sub>2</sub></b>	Plaquetas Células destruídas	Agregação de plaquetas, vasoconstrição
<b>KGF</b>	Fibroblastos	Estimula a migração, diferenciação e proliferação de queratinocitos
<b>FGF</b>	Macrófagos, mastócitos, linfócitos T, Células endoteliais	Quimiotático e mitogênico para fibroblastos e queratinócitos, estimula a angiogênese, induz o remodelamento do colágeno e previne a contração da ferida

**Fonte.** EFRON; MOLDAWER, 2004; BROUGHTON et al., 2006.

Na inflamação, as plaquetas influenciam na infiltração de leucócitos pela liberação de citocinas e fatores de crescimento por quimiotaxia às células endoteliais e promovem a fase inflamatória. Mediadores, como grânulos de enzimas, histaminas, prostaglandinas e outras aminas ativas liberadas por mastócitos são responsáveis pelos sinais inflamatórios e produzem a vasodilatação e permeabilidade capilar para permitir o influxo de leucócitos, glóbulos vermelhos e proteínas plasmáticas (REINKE; SORG, 2012).

O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos e dos macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos. O TGF- $\beta$  também atrai os macrófagos e junto com o PDGF estimula a produção de citocinas adicionais, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o DPGF, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL). Além disso, o TGF- $\beta$  aumenta ainda mais a quimiotaxia de fibroblastos e do músculo liso e modula a expressão de colágeno e colagenase. A finalidade de PDGF e TGF- $\beta$  é estimular a proliferação celular e a produção de moléculas da MEC para uma rápida deposição de um novo tecido conjuntivo (REINKE; SORG, 2012).

Neutrófilos são os primeiros leucócitos no local e, uma vez que são as células mais abundantes, formam uma barreira contra a invasão de microrganismos por fagocitose e promovem o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados. Além disso, também liberam IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  para iniciar a ativação de fibroblastos e células epiteliais. Os neutrófilos são seguidos por monócitos que migram para o local da ferida e tornam-se os macrófagos que são atraídos pelos subprodutos da apoptose dos neutrófilos (REINKE; SORG, 2012).

Os macrófagos são altamente fagocíticos e removem todas as células não viáveis, neutrófilos cheios de bactérias, MEC danificada, detritos e quaisquer bactérias do local da ferida. Uma função adicional é a da produção de óxido nítrico que tem um efeito antimicrobiano, reforçado pelo ambiente da ferida hipóxica. Os macrófagos também atraem as células endoteliais vasculares para o leito da ferida em preparação para a angiogênese (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010). Além disso, secretam uma infinidade de fatores de crescimento e citocinas, como PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IL-1 e IL-6, que recrutam fibroblastos e células endoteliais na ferida e promovem a proliferação e síntese de moléculas da MEC (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

Esses macrófagos infiltram-se em aproximadamente 48 horas após a lesão e permanecem até a conclusão da fase inflamatória. O resultado da fase inflamatória é o controle do sangramento e o estabelecimento de um leito limpo da ferida. Esta fase deve durar aproximadamente 3 dias (REINKE; SORG, 2012).

Na fase proliferativa a ferida é preenchida com tecido conjuntivo altamente vascularizado, comumente referido como "tecido de granulação" (Rede densa de vasos sanguíneos e capilares, fibroblastos, macrófagos, granulócitos e fibras de colágeno organizados aleatoriamente). O principal componente deste tecido são os fibroblastos, que migram das margens da ferida para seu centro em resposta a mediadores liberados das plaquetas e macrófagos, como PDGF, FGF, VEGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , fator de crescimento derivado de queratinócito (KGF), etc., através da MEC pela ligação de FN, VN e fibrina. Uma vez na ferida, os fibroblastos ativados por PDGF e TGF- $\beta$  começam a proliferar e produzir componentes da MEC junto com os macrófagos, tais como FN, glucosaminoglicanos (como o ácido hialurônico), proteoglicanos, e colágeno para iniciar a reepitelização das bordas da ferida (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010; QING, 2017). Ademais, o processo de reepitelização é assegurado por queratinócitos nas bordas da ferida e por células-tronco epiteliais de folículos pilosos ou glândulas sudoríparas. Este processo é ativado por vias de sinalização de células epiteliais e não epiteliais nos bordos da ferida, que libertam uma quantidade de diferentes citocinas e fatores de crescimento, em geral EGF, KGF, IGF-1 e NGF (REINKE; SORG, 2012).

Simultaneamente, acontece a formação de novos vasos sanguíneos por células endoteliais que é ativada pela perda da vascularização no leito da ferida, redução do pH, baixa tensão de oxigênio e aumento de lactato, que iniciam a liberação de TNF- $\alpha$ , VEGF, fator fibroblástico básico (bFF) e TGF- $\beta$ , todos os quais ativam a angiogênese. Os fibroblastos também secretam KGF, que estimula a epitelização dos queratinócitos e as células endoteliais produzem VEGF e fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) para promover o crescimento dos vasos sanguíneos (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

As células endoteliais nas vênulas adjacentes à ferida secretam enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) que dissolvem a lâmina basal. Assim, as células endoteliais são agora capazes de proliferar e migrar, num

processo conhecido como "brotamento". As células endoteliais orientam-se por moléculas de adesão superficiais, principalmente integrinas ( $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_5$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ), também liberam MMPs lisando o tecido circundante pela proliferação endotelial em andamento. Além disso, as células epiteliais interagem com uma matriz provisória de fibrina reticulada à FN e ao colágeno. Em particular, a FN parece promover a adesão de queratinócitos para guiar estas células através da superfície da ferida. Os brotos recém-construídos formam pequenos canais tubulares que se interconectam a outros formando um circuito de vasos. Posteriormente, os novos vasos se diferenciam em artérias e vênulas e amadurecem por uma estabilização adicional de sua parede vascular através do recrutamento de pericitos e células musculares lisas. Ao final desta fase, a proliferação de fibroblastos em maturação decai pela diferenciação de miofibroblastos e é terminada por apoptose consecutiva, ajustando o equilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC (REINKE; SORG, 2012; GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

A fase de remodelação acontece a partir do dia 21 até um ano após a lesão. O tecido de granulação amadurece em uma cicatriz, onde os capilares pequenos se agregam em vasos sanguíneos maiores e há uma diminuição no teor de água da ferida e a formação de tecido de granulação se detém através da apoptoses das células, diminuindo a atividade metabólica da ferida. A mudança mais característica ocorre quando o colágeno III, que foi produzido na fase proliferativa, é agora substituído pelo colágeno I mais forte. Esse tipo de colágeno é orientado em pequenos feixes paralelos e é, portanto, diferente do colágeno-tecido na derme saudável. Mais tarde, os miofibroblastos causam contrações nas bordas da ferida por sua múltipla ligação ao colágeno para contrair o tecido conjuntivo e diminuir a superfície da cicatriz em desenvolvimento. Esse processo de remodelação lento aumenta a resistência à tração da ferida num máximo de 80 % do tecido normal (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

O processo de cicatrização 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, de tal forma que o uso de biomateriais que atuem como suportes ou substitutos temporais da pele para auxiliar ou acelerar o processo de

reparação e cura torna-se necessário (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Nestes casos, o emprego de polímeros naturais ou sintéticos, aprimorados pela incorporação de compostos terapêuticos, necessários para melhorar a biocompatibilidade, reduzir o tempo estimado ou para melhorar a taxa de sucesso da reparação ou reconstrução de um tecido danificado está entre as principais linhas de pesquisa na área de engenharia de tecidos (JAMES et al., 2009; BOATENG; CATANZANO, 2015).

Uma estrutura polimérica que tem demonstrado ser proveitosa em uma ampla gama de aplicações, é a celulose, especificamente a de origem bacteriana, particularmente sendo muito atraente na biomedicina, porque é um dos materiais mais completos em termos de qualidades requeridas para um curativo na reparação tecidual, exibindo alta resistência à tração, flexibilidade e capacidade de retenção de água, permeabilidade a gases e líquidos, isolamento térmico, prevenção de infecções, além de permitir a introdução ou transferência e liberação de fármacos e tem grande compatibilidade com tecidos vivos (SULAEVA et al., 2015).

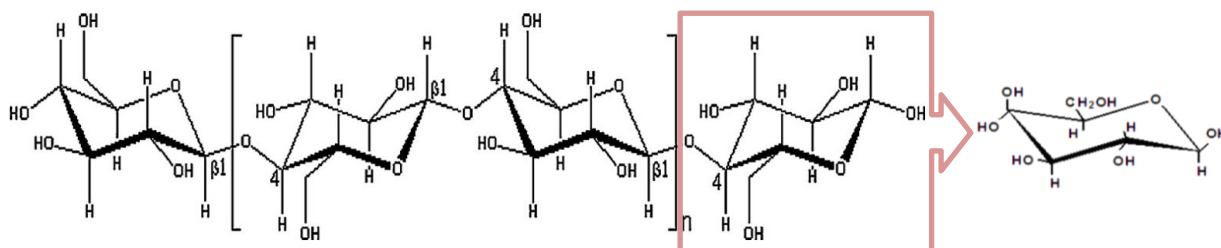
### 1.3. Celulose Bacteriana (CB)

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, encontrada principalmente em plantas superiores, geralmente associada a hemicelulose, lignina e outros materiais. Também pode ser encontrada em algas e fungos, além de ser produzida extracelularmente por vários tipos de bactérias (KLEMM et al., 2005).

A celulose bacteriana (CB) é produzida extracelularmente por bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter* (previamente denominada *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*. Em particular, a espécie *G. xylinus* é uma das mais produtivas, demonstrando ser uma das espécies mais eficientes e estudadas por assimilar vários tipos de açúcares e produzir alto nível de celulose em meio líquido (ULLAHA et al., 2016).



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



**Fonte:** SHEYKHNAZARI et al., 2011 (adaptado)

*Gluconacetobacter 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 (KLEMM et al., 2005).

As bactérias produtoras de celulose secretam primeiro agregados de 10-15 cadeias de poliglicanas. Ademais, cada subunidade de D-glucose interage por ligações de hidrogênio intra-moleculares com monômeros adjacentes de D-glucose dentro de sua cadeia. As cadeias que estão próximas em paralelo, também formam interações de hidrogênio inter-cadeias entre os grupos hidroxila expostos formando ligações de hidrogênio inter-moleculares que se reúnem em nanofibras cristalinas. A linearidade destas fibras de celulose agrega-se em feixes maiores reticulados produzindo microfibras que contêm regiões cristalinas e amorfas. Essas microfibras se associam livremente para formar uma fita de celulose que se estende a partir de cada bactéria até criar uma densa rede entrelaçada em forma de teia de CB que constitui uma matriz altamente porosa (BODIN et al., 2011).

Esta estrutura de rede fibrilada altamente pura e hidratada, apresentando até 99% de água (BODIN et al., 2011; BARUD, et al., 2013), resulta em características não encontradas na celulose vegetal, apresentando um alto grau de cristalinidade (60–80%) e ausência de lignina, hemiceluloses ou outros produtos biogênicos, além de alta resistência mecânica com um módulo de Young de 15–30 GPa, o mais alto de todos os materiais orgânicos bidimensionais (SHODA; SUGANO, 2005).

Quando a celulose é formada em condições de cultura estática, resulta em uma estrutura tridimensional constituída de um sistema ultrafino de nano e microfibras. Em

contraste a outros tipos de membranas sintéticas, a membrana de CB exibe uma alta estabilidade química, uma nanoporosidade característica que favorece a permeabilidade de nutrientes e a proliferação celular, baixa toxicidade e biocompatibilidade (HUANG et al., 2014).

Nos últimos anos, o interesse no desenvolvimento de novos biomateriais biodegradáveis e biocompatíveis tem aumentado na engenharia de tecidos, especialmente pela necessidade de melhorar o processo de restauração de tecidos danificados ou doentes, bem como suas funções. Neste sentido, sistemas de liberação de fármacos, inserções vasculares e *scaffolds*, têm sido desenvolvidos, sempre com o objetivo de aumentar a qualidade de vida das pessoas (OLIVEIRA BARUD et al., 2016). Algumas das pesquisas neste campo estão focadas no desenvolvimento de novos tipos de curativos, uma vez que, nos dias de hoje, os curativos funcionam como componentes ativos do processo de cicatrização, controlando a infecção e fornecendo um microambiente propício para a cura, ao invés de atuar como um simples meio de proteção (SULAEVA et al., 2015).

O uso de CB nestes casos pode ser justificado por auxiliar no processo de regeneração tecidual e cicatrização, como curativo de ferimentos e como sistema carreador de fármacos (*drug delivery*), além de funcionar como barreira contra microrganismos em feridas e queimaduras, o que auxilia no processo de cura. Também ameniza a dor e reduz a formação de cicatrizes (SASKA et al., 2011; BARUD et al., 2013).

A CB pode sofrer modificações, que conferem propriedades que atendem todos os requisitos para funcionar como um material curativo, pela incorporação de compostos terapêuticos durante ou após sua síntese, sem causar qualquer alteração das suas propriedades físicas e químicas (CZAJA et al., 2006). Ademais, a CB pode ser infundida com células e fatores de crescimento, cultivada e implantada para induzir e direcionar o crescimento de um tecido novo e sadio. Nestes casos, peptídeos contendo o “*motif*” de reconhecimento celular RGD podem ser empregados como um meio de desencadear a adesão de células bem como para direcionar seletivamente determinados tipos celulares e provocar respostas celulares específicas, favorecendo o processo de regeneração do tecido (ANDRADE et al., 2010).

#### 1.4. Peptídeos RGD no processo de regeneração tecidual

Em organismos multicelulares, as interações célula-célula assim como as interações das células com moléculas 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, embriogênese, diferenciação celular, resposta imune, e outros processos biológicos (VAN DER FLIER; SONNENBERG, 2001; HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003; FUJIMURA et al., 2007).

As integrinas são glicoproteínas receptores transmembranais, heterodiméricas mediadoras da ligação celular à MEC, que consistem de duas subunidades associadas não-covalentemente, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ . Até o momento 18 subunidades  $\alpha$  e 8  $\beta$  são conhecidas, cuja combinação resulta em 24 tipos de receptores de adesão que têm especificidade por diferentes ligantes (VAN DER FLIER; SONNENBERG, 2001). Muitas integrinas podem se ligar a múltiplos ligantes, enquanto outras parecem restritas a um único ligante. As integrinas podem ser classificadas de acordo com seus ligantes mais específicos, como consta na Tabela 2 (SCHNITTERT et al., 2018).

**Tabela 2.** Classificação geral de heterodímero de integrina constituídas por 24 receptores de integrinas e seus respectivos ligantes.

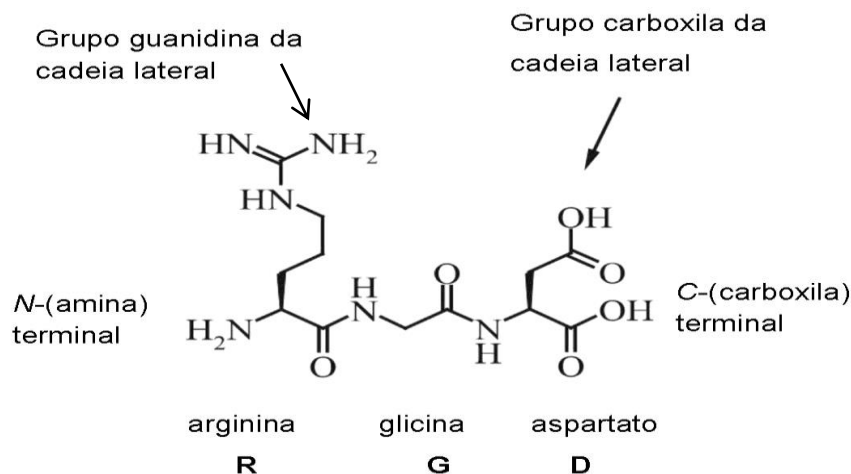
Principal ligante	Tipo de Integrinas
<b>Colágeno</b>	$\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 10\beta 1$ e $\alpha 11\beta 1$
<b>Fibronectina</b>	$\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$ ligação sem RGD
<b>Receptores de fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e trombospondina</b>	$\alpha 5\beta 1$ , $\alpha 8\beta 1$ , $\alpha v\beta 1$ , $\alpha v\beta 3$ , $\alpha v\beta 5$ , $\alpha v\beta 6$ , $\alpha v\beta 8$ e $\alpha 11b\beta 3$ . Dependentes-RGD
<b>Laminina</b>	$\alpha 3\beta 1$ , $\alpha 6\beta 1$ , $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 7\beta 1$
<b>Subgrupo leucócitos</b>	$\alpha D\beta 2$ , $\alpha L\beta 2$ , $\alpha M\beta 2$ , $\alpha X\beta 2$ , $\alpha E\beta 1$ , $\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 4\beta 7$

Fonte. SCHNITTERT et al., 2018.

As integrinas são expressas por vários tipos de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos, osteócitos, células endoteliais, queratinócitos, leucócitos e plaquetas, e a presença de ambas as subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , é necessária para garantir a normalidade da interação das integrinas com a MEC e intracelularmente com o citoesqueleto. A tarefa mais importante da maioria das integrinas é ancorar as células aos tecidos. No entanto, esses receptores também participam com frequência de outros processos, incluindo a imunidade inata e a regulação celular por fatores de crescimento (SCHNITTERT et al., 2018).

A sequência tripeptídica Arg-Gly-Asp (RGD) (Figura 3), encontrada em 8 proteínas da MEC, incluindo fibrinogênio, vibronectina (VN), fibronectina (FN), trombospondina, osteopontina e vWF, foi identificada em 1984 (PIERSCHBACHER; RUOSLAHTI, 1984; RUOSLAHTI, 1996) como a sequência mínima essencial para a adesão celular em FN, em um esforço para reduzir o tamanho dos ligantes macromoleculares para sequências de reconhecimento menores (SCHNITTERT et al., 2018).

**Figura 3.** Sequência RGD, fórmula molecular e nomenclatura



**Fonte:** HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003, adaptado.

As FN são proteínas de adesão da MEC a qual é fundamental na ligação às integrinas, como a outras moléculas da MEC, incluindo colágeno, fibrina, proteoglicanos, etc. Fibroblastos em feridas produzem fibronectina celular (JAKHUA

et al., 2018). Esta, 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). Além disso, a FN também se liga fortemente à fibrina e fibrinogênio logo após a lesão tecidual e juntamente com as plaquetas ativadas, compõe a maior parte da matriz provisional e permite a migração celular reparativa. Ademais, dentro da matriz a FN pode se reticular com o colágeno, proteoglicanos de sulfato de heparano e ele próprio, para fornecer um suporte mais estável para que as células se hospedem (WHITE et al., 2008).

A integrina  $\alpha 5\beta 1$  é o principal receptor da FN que reconhece o *motif* RGD. Os fibroblastos aumentam a expressão de integrinas de ligação  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 3\beta 1$  para interagir com FN e facilitar a migração dos fibroblastos e queratinócitos, à matriz de Fibrina-FN, sendo importante para a produção de componentes da MEC, no tecido de granulação e na etapa de formação de vasos sanguíneos (angiogênese). A integrina  $\alpha 5\beta 1$  também detém a adesão de fibroblastos a FN à matriz do tecido de granulação por diferenciação a miofibroblastos estimulada pelo TGF-B1 na etapa de cicatrização, o que parece que aumenta a capacidade de migração de fibroblastos. Nesse contexto, a integrina  $\alpha 5\beta 1$  serve como um mecanoreceptor mediando a montagem da matriz de FN e os sinais a adesão, proliferação celular e a detenção da migração de fibroblastos (JAKHUA et al., 2018).

O uso de proteínas nativas como a FN apresenta desvantagens em relação a *motifs* de reconhecimento celular como o tripeptídeo RGD, no que tange à aplicação médica. Entre elas, aumentam o risco de reação imune, de infecções e de transferência de patógenos, particularmente no caso de proteínas de fontes cadavéricas ou enxertos “xenos” (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003; BELLIS, 2011). 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 (PTAFF, 1997; ANDRADE et al., 2010). 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. A conformação do *loop* contendo RGD e seus aminoácidos flanqueados, nas respectivas proteínas, são os principais responsáveis pela afinidade diferenciada para as integrinas (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003).

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  $\alpha V$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  e  $\alpha 11\beta 3$ , e 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; ZHANG et al., 2010; ENWEREM; WANG; LESZCZYNSKI, 2012).

A eficiência dos biomateriais, seja como substituintes de tecidos danificados, como suportes para regeneração tecidual ou mesmo como curativos, baseia-se na habilidade da superfície do material de regular a adesão celular (GOLDSTEIN, 2007). Assim sendo, a incorporação de sítios de adesão biomiméticos, tais como peptídeos RGD, poderia ser feita para promover a adesão de tipos celulares selecionados, a migração, a distribuição e a disposição celular em material bioativo, incluindo a celulose bacteriana (ANDRADE et al., 2010).

## 2. Objetivos

O objetivo principal é avaliar *in vitro* a potencialidade de utilização de membranas de celulose bacteriana (CB) modificadas com a introdução de peptídeos contendo a sequência RGD para aplicações futuras em processos de regeneração tecidual.

Os objetivos específicos incluem:

1. Obtenção de membranas de CB sintetizadas a partir da cepa *Gluconacetobacter xylinus*;
2. Realização de estudos de bioinformática para levantamento de dados estruturais sobre os peptídeos a serem sintetizados e suas interações com proteínas de interesse;
3. Síntese química de peptídeos contendo a sequência RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico);
4. Obtenção de membranas de celulose bacteriana contendo peptídeos RGD incorporados por adsorção;
5. Caracterização físico-química para melhor entendimento da interação do peptídeo com a membrana de CB;
6. Avaliação *in vitro* da potencialidade das membranas de CB modificadas, quanto à capacidade de adesão e proliferação de fibroblastos.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. 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, et al. 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).

No estudo computacional realizado, três peptídeos (L1, L2 e L3) foram tridimensionalmente modelados como possíveis ligantes empregando o servidor LOMETS (Local Meta-Threading-Server), um serviço *online* 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 duas estruturas proteicas (PA e PB) da base de dados *Protein Data Bank*, junto com outras três integrinas humanas (PC, PD e PE), da base de dados *UniProt Knowledgebase* (UniProt KB) que foram utilizadas como receptor padrão. Estes foram modelados utilizando o servidor Phyre2 (***Protein Homology/AnalogY Recognition Engine***), um serviço *online* de predição de estrutura tridimensional proteica que usa princípios e técnicas de modelagem por reconhecimento de homologia. Estas estruturas estão descritas e identificadas na Tabela 3.

Moléculas de água foram removidas das estruturas cristalizadas e todas as estruturas tridimensionais foram então refinadas através do Chiron, servidor que

executa minimização de energia de moléculas proteicas por meio de dinâmica molecular discreta com representação de todos os átomos de cada resíduo da molécula.

Os cinco modelos proteicos minimizados finais foram usados como receptores de entrada para o programa de docagem molecular Autodock Vina, configurado para prover as 9 melhores pontuações de afinidade entre ligantes e receptores.

As interações intermoleculares das melhores poses 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.

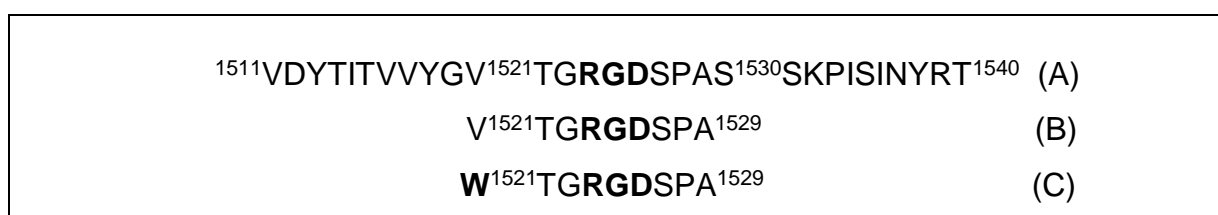
**Tabela 3.** Identificação de estruturas de ligantes e receptores modelados tridimensionalmente por bioinformática.

Estrutura modelada	Sequência peptídica/ Base de Dados	Descrição
L1	VTGRGDSPA	Utilizada como ligante padrão; presente na sequência nativa da fibronectina humana (FN)
L2	VWTGRGDSPA	Sequência analisada comparativamente para síntese
L3	WTGRGDSPA	Sequência analisada comparativamente para síntese
PA	PDB ID 3M7P	Fragmento de FN
PB	PDB ID 3VI3	Parte da integrina $\alpha 5\beta 1$
PC	UniProtKB ID O14713	Proteína de ligação à fração $\beta 1$ de integrina humana
PD	UniProtKB ID P05556	Receptor de FN, subunidade $\beta$ (integrina $\beta 1$ )
PE	UniProtKB ID P08648	Receptor de FN, subunidade $\alpha$ (integrina $\alpha 5$ )

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados obtidos a sequência derivada da fibronectina humana (FN), especificamente os resíduos 1521 a 1529 (Figura 4), contendo o “*motif*” GRGDSP da FN, bem como a substituição do resíduo de valina 1521, por um resíduo de triptofano, foram as sequências escolhidas para a síntese.

**Figura 4.** Estrutura primária da região 1511-1540 da fibronectina humana (A) e das sequências peptídicas escolhidas para síntese (B e C).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.2. Preparação das Membranas de Celulose Bacteriana

As mantas (membranas) de CB foram preparadas em cultivo estático das bactérias *G. xylinus* (ATCC 23760) em frascos erlenmeyers de 500 mL e em tubos descartáveis de 2 mL (tipo eppendorfs) com tempo de cultivo de 120 h a 28°C. O meio de cultura utilizado foi composto por 0,4% (m/v) de extrato de levedura, 5% (m/v) de glicose, 0,2% (m/v) de fosfato de potássio monobásico, 0,073% (m/v) sulfato de magnésio e 2% (v/v) de etanol absoluto e ácido acético glacial. Após atingir a espessura de 5 mm, as membranas foram purificadas quimicamente para remoção das células bacterianas das redes de celulose, utilizando-se solução aquosa de hidróxido de sódio 1% (m/v) a 80°C por 1 h; posteriormente as membranas foram submetidas a lavagens com água destilada até atingir neutralidade, medida em pHmetro, em seguida foram acondicionadas em água deionizada ou liofilizadas.

As membranas assim obtidas, especialmente as hidratadas, 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.

### 3.3. Síntese Química dos peptídeos RGD

Dois peptídeos, JGB1 e JGB2, contendo a sequência RGD (Figura 5), foram sintetizados quimicamente 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 t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN; WHITE, 2000), em seringas de polipropileno de 5 mL, munidas de filtros de polietileno porosos, conectadas a um sistema à vácuo com frasco coletor de resíduos.

**Figura 5.** Estrutura primária dos peptídeos RGD sintetizados.

Acetil-VTGRGDSPA-NH <sub>2</sub> <b>JGB1</b>	Acetil-WTGRGDSPA-NH <sub>2</sub> <b>JGB2</b>
---	---

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Utilizou-se 1,2 g de uma resina Rink Amida MBHA (grau de substituição de 0,5 mmol/g), como polímero de partida. O resíduo de triptofano foi introduzido na sequência de JGB2, em substituição à valina para que, em caso de estudos de identificação e quantificação, o peptídeo possa ser detectado por técnicas espectroscópicas.

Empregou-se Diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar de 3 vezes em relação à escala inicial de síntese (0,6 mmols), tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação, inicialmente em 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 4-metil-piperidina 20% (v/v) em DMF.

A eficiência de entrada de cada Fmoc-aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (condensação incompleta), o processo foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

Após o acoplamento dos primeiros oito aminoácidos, a massa de peptidil-resina obtida foi dividida em duas partes, para que fosse acoplado outro aminoácido de cada sequência, valina (JGB1) ou triptofano (JGB2), respectivamente.

A acetilação final foi realizada empregando 10 equivalentes de anidrido acético, em DMF, por 60 min. A clivagem final dos peptídeos das resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (95%), água deionizada (2,5%) e triisopropilsilano-TIS (2,5%), em temperatura ambiente não controlada, por 2 h.

Peptídeos, denominados bruto, foram precipitados, lavados com éter dietílico gelado (cinco vezes) e dissolvidos em água deionizada contendo ácido acético 15%. Após essas etapas, os extratos brutos de cada peptídeo foram liofilizados e submetidos a purificação e caracterização.

### 3.4. Purificação e caracterização

No geral, 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 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em escala analítica. A partir dos cromatogramas obtidos, a análise do tempo de retenção e a porcentagem de solvente necessária para eluição, determinaram as condições relativas aos percentuais de solventes a serem utilizados para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de ambos os peptídeos sintetizados foi realizada utilizando as seguintes condições:

- Analítica: UPLC Shimadzu Prominense, coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Phenomenex Jupiter (250 x 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 (água contendo 0,045% de TFA) e B (acetonitrila (ACN)) contendo 0,036% de TFA, em gradiente de 5 a 95% de B em 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda do detector de 220 nm.

- Semi-preparativa: HPLC Shimadzu, coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C<sub>18</sub> (250 x 10 mm), diâmetro da partícula de 10 µm e porosidade de 300 Å. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e água ultrapura. As condições cromatográficas gerais incluíram um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), em 90 min, com fluxo de 3,0 mL/min e detecção a 220 nm, para ambos peptídeos.

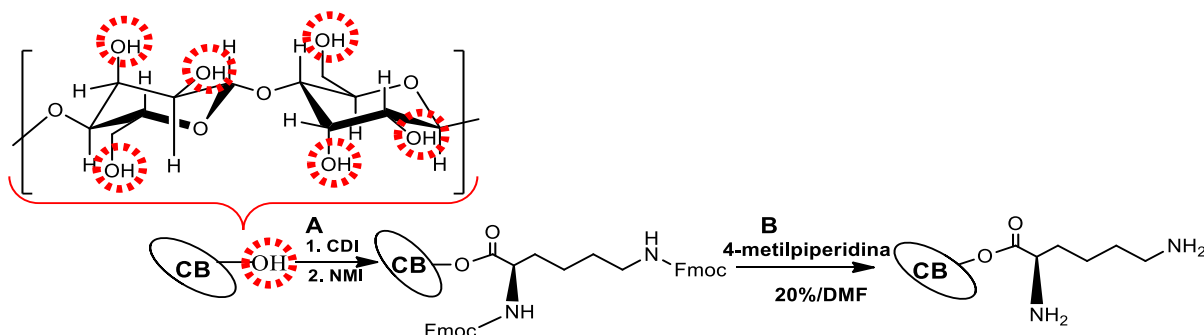
A caracterização dos produtos após purificação foi feita através da determinação da massa molecular, pela identificação e a confirmação do pico com massa molecular correspondente ao valor teórico do peptídeo puro, empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/ESI-MS), utilizando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

### 3.5. Funcionalização da celulose bacteriana

A incorporação do peptídeo JGB2 na CB foi realizada pelo processo de adsorção. Para incrementar o número de sítios com possibilidade de interagir com o peptídeo, a membrana de CB foi funcionalizada inicialmente, pela incorporação de um resíduo do aminoácido lisina (K).

Para isso, inicialmente, o excesso de água da CB foi removido por meio de filtração à vácuo em filtro de placa porosa. 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 de Fmoc-Lys(Fmoc) às hidroxilas livres da celulose. Foram utilizados 0,4 equivalentes de Fmoc-Lys(Fmoc), e 0,4 equivalentes dos agentes de condensação 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (Sigma), e N-metilimidazol (NMI) (Fluka) em DMF (Figura 6 - reação A). O tempo de acoplamento foi de 2 h à temperatura ambiente não controlada. Após a reação foram realizadas várias lavagens com DMF para remoção completa do excesso de reagente.

**Figura 6.** Esquema da funcionalização dos grupos -OH da superfície da membrana de CB. A. Reação de esterificação das hidroxilas da CB e acoplamento do Fmoc-Lys(Fmoc). B. Reação de desproteção dos grupamentos amino.



**Fonte.** Elaborado pelo autor.

A incorporação da Fmoc-Lys(Fmoc) às membranas de CB foi quantificada empregando análise espectrofotométrica na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) pela liberação do grupo cromóforo Fmoc em solução de 4-metil-piperidina por 1 h à temperatura ambiente (Figura 6 – reação B). Para tal, fez-se uso um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1601PC duplo feixe, em comprimento de onda fixo de 290 nm, região de máxima absorção do grupo Fmoc, além de cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm e solução recém-preparada de 4-metil-piperidina 20% (v/v) em DMF (SASKA et al., 2012a).

As membranas de CB com massa conhecida (aproximadamente 1 mg) foram colocadas no interior de uma cubeta, seguido da adição de 3 mL da solução de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF. Após agitação constante efetuou-se a leitura espectrofotométrica, contra um branco onde a amostra é omitida. O processo de agitação e leitura foi repetido até a constância do valor de absorbância final, e utilizando para o cálculo do grau de incorporação (GI) da lisina às amostras de celulose, a equação 1 (CHAN; WHITE, 2000).

$$GI \left( \frac{mmol}{g} \right) = \left( \frac{A_{amostra}}{1,75 \times m_{amostra}} \right) \quad \text{(Equação 1)}$$

GI = Grau de incorporação (mmol.g<sup>-1</sup>), A<sub>amostra</sub> = Absorbância da amostra, m<sub>amostra</sub> = Massa da amostra (mg).

Para se aumentar o GI, um novo processo de incorporação de resíduo de lisina foi realizado, empregando-se novamente o derivado Fmoc-Lys(Fmoc). Neste caso, foram utilizados DIC (diisopropil-carbodiimida), na presença de HOBt (1-Hidroxibenzotriazol), como agentes de condensação, sendo DMF e DCM (1:1) como mistura de solventes. O excesso molar de Fmoc-Lys(Fmoc) e dos agentes acilantes foi de aproximadamente 3 vezes em relação à quantidade de Lisina incorporada previamente. Ao final do período de acoplamento (aproximadamente 12 h) foi realizada nova quantificação do teor de lisina total incorporada.

Após a incorporação da lisina, as membranas foram lavadas exaustivamente com água ultrapura e liofilizadas para seguir com a adsorção do peptídeo JGB2.

Para isso, preparou-se uma solução aquosa ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) do peptídeo JGB2, quantificada em um 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 (coeficiente de extinção 5.680). As membranas foram imersas em 1 mL desta solução, por 72 h, a 4 °C (SASKA et al., 2012a). Ao final deste período, as membranas foram lavadas duas vezes, com um volume de 150 mL de água deionizada para remoção do excesso de peptídeo não adsorvido e depois foram liofilizadas por 24 h. A diferença entre a concentração inicial do peptídeo em solução e a concentração na água recuperada após lavagens da membrana resultou em uma concentração estimada de peptídeo adsorvido.

### 3.6. Caracterização das membranas

#### 3.6.1. Ângulo de contato

A manifestação mais visível da interação de um dado sólido com a água é a molhabilidade da superfície do mesmo, que é definida como a adsorção de moléculas de água na interface sólido/água (GLEMBOTSKII et al., 1972). A condição essencial para que a água flua sobre a superfície de um dado sólido é que a força de adesão entre a água e o sólido exceda o trabalho de coesão da água.

A chamada energia de **coesão** (específica) é decorrente da atração mútua entre as moléculas da mesma substância (água, por exemplo), oriunda de ligações



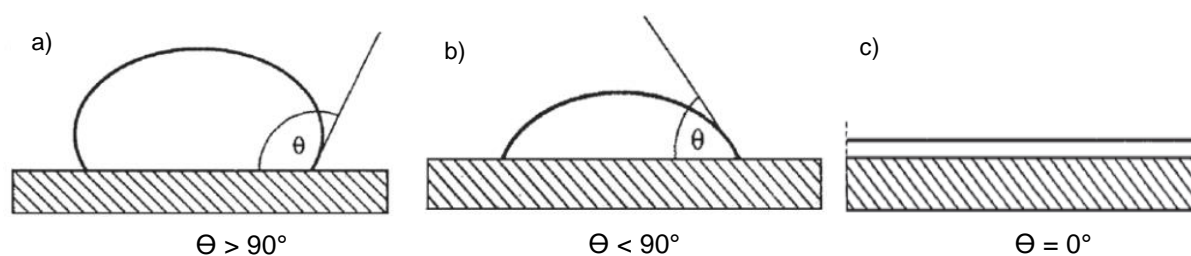
químicas diversas, incluindo as de dipolos instantâneos de London-van der Waals (LEJA, 1982). A **adesão** é a interação mútua exercida por moléculas em duas fases distintas (água e sólido). Assim, quando ocorre o espalhamento da gota do líquido ou molhabilidade em grau variado, a força de adesão entre as moléculas das duas fases supera a força de coesão. Por outro lado, quando a força de atração entre as moléculas é superior a força de coesão entre as fases, não há molhabilidade ou espalhamento da gota (SHAW., 1975).

O grau de molhabilidade de uma superfície sólida é expresso qualitativamente pela magnitude do ângulo de contato ( $\theta$ ) que é o ângulo formado entre a gota do líquido e a superfície do sólido.

O valor do ângulo de contato entre o líquido (no caso, a gota de água deionizada dispensada) e o sólido, que é a amostra analisada, varia entre  $0^\circ$  e  $180^\circ$ . Este ângulo formado entre superfícies caracteriza a propriedade de molhamento do material. Quando um sólido é completamente molhável pela água ou solução aquosa é caracterizado como hidrofílico, enquanto o termo sólido hidrofóbico denota uma molhabilidade parcial do mesmo pela fase aquosa.

A hidrofobicidade é caracterizada quando há formação de um ângulo de contato acima de  $90^\circ$ , não havendo o molhamento do sólido pelo líquido, pois o líquido não se espalha (Figura 7a). 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 7b). O ângulo de aproximadamente  $0^\circ$  é atribuído ao material com molhabilidade total, pelo espalhamento completo do líquido (Figura 7c).

**Figura 7.** Ângulos de contato da intercepção do líquido com a superfície sólida: (a) não molhante; (b) molhamento parcial; (c) espalhamento total.



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

As medidas de ângulo de contato foram realizadas no Laboratório do Grupo de Polímeros do Instituto de Física de São Carlos, USP, utilizando um equipamento Goniômetro KSV CAM200 composto por uma câmera CCD (*Charge Coupled Device*) firewire (512x480) com zoom ótico telecêntrico, um porta amostras e um suporte de fixação de microseringas.

O método utilizado foi o de gota séssil, utilizando água deionizada (tensão superficial: 72,30 mN/m). A gota foi dispensada com auxílio de uma microseringa, com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, com um volume de gota de 3  $\mu\text{L}$ , numa velocidade de gotejamento de 1  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  sobre as superfícies das membranas. O ângulo de contato estático foi medido 10 s após a dispensação da gota ( $T=10$  s), em diferentes pontos da superfície das membranas secas. As imagens das gotas sésseis foram analisadas utilizando o software CAM 200.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.6.2. *Microscopia Eletrônica de varredura de Alta Resolução de emissão de campo (MEV-FEG)*

As micrografias das amostras foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução de emissão de campo JSM-7500 (software de operação PC-SEM v 2.1.0.3) equipado com detectores de elétrons secundário, retroespalhados e análise química (energy dispersive spectroscopy - EDS) da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry (software de operação NSS 2.3).

Cada amostra foi colocada em uma porta amostra de cobre, sendo recobertas por uma camada de ouro de espessura de 6 nm (20s, tensão de 3 kV e corrente de 15 mA) para posterior análise de sua superfície e secção transversal das amostras de CB pura, funcionalizadas com lisina e contendo o peptídeo JGB2.

### 3.6.3. *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 de CB pura ou CB funcionalizada com uma ou duas lisinas (K), contendo o peptídeo JGB2 adsorvido (CB, CB-JGB2, CBK-JGB2 e CBKK-JGB2) 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.

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.

Membranas de CB são materiais semi-cristalinos e produzem amplos picos de difração. CB é uma estrutura composta de celulose,  $I\alpha$  e  $I\beta$ , que podem ser encontrados lado a lado. O polimorfo  $I\alpha$  predomina na CB (MOON et al., 2011) embora após tratamento alcalino ou hidrotérmico  $I\alpha$  transforma-se, pelo menos parcialmente, para  $I\beta$ . Também celulose I pode ser convertida na forma cristalina mais estável, celulose II (MANSIKKAMAKI et al., 2007).

O índice de cristalinidade relativa ( $IC_r$ ) das membranas de CB foi calculado segundo métodos descritos (POLETTI; PISTOR; ZATTERA, 2013; SEGAL, et al., 1959) a partir das bandas de intensidade do difratograma, de acordo com a equação 2:

$$IC_r = \left( \frac{I_{(200)} - I_{am}}{I_{(200)}} \right) \cdot 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Na equação 2,  $I_{(200)}$  é a intensidade máxima de difração no plano (2 0 0) em  $2\theta=22,8^\circ$  e a intensidade entre (2 0 0) e (1 1 0) é o pico da parte amorfa ( $I_{am}$ ) em  $2\theta=18^\circ$ .

### 3.6.4. *Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)*

Os espectros de FT-IR foram obtidos em um equipamento VERTEX70 da BRUKER, com fonte de Laser de HeNe (emite radiação na região do infravermelho médio), detector DLaTGS e faixa de espectral: 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  modelo ATR, resultando em % de transmitância com resolução de 0,4  $\text{cm}^{-1}$ . Foi utilizado o acessório de ATR (Attenuated Total Reflectance) em janelas de KBr, para a obtenção do espectro diretamente das amostras de membranas de CB pura, ou contendo o peptídeo ou modificadas contendo o peptídeo.

### 3.7. Liberação do peptídeo da membrana de celulose

A liberação do peptídeo JGB2 das membranas de CB liofilizadas foi avaliado por espectroscopia de fluorescência, sendo traçados inicialmente os espectros de absorção e fluorescência do peptídeo livre a fim de determinar as condições de excitação e emissão. Com isso, traçou-se uma curva padrão de fluorescência do peptídeo JGB2, a 37 °C, para auxiliar na quantificação do peptídeo liberado das respectivas membranas de CB.

As membranas foram imersas em 14 mL de solução PBS (tampão fosfato pH 7,40), volume este suficiente para preencher todo sistema de liberação. As amostras foram mantidas sob agitação constante à temperatura ambiente, durante todo período de análise.

As aquisições dos dados da concentração de peptídeo liberado foram monitoradas em um sistema fechado, acoplado a um espectrofotômetro de fluorescência VARIAN CARY ECLIPSE (Analysis Package Software) por meio de mangueiras de silicone ajustadas a uma cubeta de fluxo de 450  $\mu\text{L}$  (Helma QS 10 x 4 mm), sendo o fluxo de solução mantido constante por uma bomba peristáltica Miniplus. O tempo total de aquisição dos dados foi de 72 h, monitorado da seguinte maneira: a primeira medida foi feita no tempo inicial ( $t = 0$  min), seguido de medidas realizadas a cada 1 min durante 60 min, depois a cada 30 min até completar 8 h e, por fim, medidas feitas a cada uma hora até completar as 72 h de análise. As medidas foram realizadas em duplicata.

### 3.8. Análises *in vitro*

As membranas utilizadas nos ensaios *in vitro* foram preparadas na forma de discos com 6 mm de diâmetro, esterilizadas com raios- $\gamma$  25 kGy, imergindo-as no meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Sigma) por 10 min e colocadas no fundo de poços individualizados (n=4) de placas de 96 poços esterilizadas.

#### 3.8.1. 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 de fibroblastos da linhagem tumoral de fibrossarcoma de tecido conjuntivo murino (clone L929).

As células de fibroblastos L929 foram cultivadas em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma), gentamicina a 40 mg.L<sup>-1</sup>, penicilina a 1  $\mu$ L.mL<sup>-1</sup> e estreptomicina a 1  $\mu$ L.mL<sup>-1</sup>. As células foram cultivadas em garrafas de cultura estéril (Corning, Inc.) a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% umidade. Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novas garrafas até atingirem cerca de 80% de confluência, avaliando a progressão da cultura por microscopia. Após o crescimento das células o meio foi descartado, a suspensão celular lavada com solução PBS e as células desprendidas das garrafas utilizando uma solução padrão de tripsina 10%.

A suspensão celular tratada com tripsina foi centrifugada a 300xg por 10 min a 4 °C. Posteriormente, o pellet de células foi ressuspenso em 1 mL de meio DMEM. A 10  $\mu$ L desta suspensão celular foi adicionado 90  $\mu$ L de azul de Trypan 0,04%. Desta, 10  $\mu$ L foram transferidos para uma câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany), onde as células viáveis foram contadas em microscópio óptico. A partir da contagem celular, a suspensão celular foi ajustada para obter uma densidade celular de 5x10<sup>4</sup> células/poço.

O número de células correspondente calculado em relação ao grupo controle positivo (células viáveis), considerado como 100%.

### 3.8.2. Viabilidade Celular

A análise de viabilidade celular foi realizado empregando o método colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio, Sigma) que sinaliza a atividade metabólica das células, baseado na reação de redução do MTT por proteinases mitocondriais ativas, apenas em células viáveis, produzindo cristais de formazana (cor purpura).

Neste ensaio, as células foram semeadas em placa de cultura estéril de 96 poços contendo as amostras de CB, CB liofilizada, CB-JGB2, CB-JGB2 liofilizada, CBKK-JGB2, CBKK-JGB2 liofilizada. Foi utilizada uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço em 200  $\mu$ L de meio de cultura. O controle positivo foi preparado contendo apenas as células em meio de cultura e o controle negativo (branco), apenas o meio de cultura DMEM e isopropanol.

As placas foram incubadas por períodos de 24, 48 e 72 h em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific), com troca do meio de cultura após dois dias, para a amostra de 72 h. Após cada respectivo período de incubação, o sobrenadante era descartado e as células lavadas com 100  $\mu$ L de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) estéril. Logo após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 200  $\mu$ L de uma solução de MTT 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> diluída em solução PBS e meio de cultura DMEM (sem vermelho de fenol), na proporção 1:4, por 4 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Decorrido este período, os sobrenadantes foram descartados e as membranas foram lavadas com 100  $\mu$ L de solução PBS estéril. Posteriormente, foram adicionados a cada poço 100  $\mu$ L de álcool isopropílico e incubado durante 15 min sob agitação para dissolver os cristais formados. Em seguida, o volume de cada poço foi transferido para uma nova placa de 96 poços e a densidade ótica foi medida em um leitor de microplacas (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems) com um filtro de 570 nm.

Os testes foram realizados em quadruplicata, em períodos diferentes.

#### *Análise estatística*

A análise estatística dos resultados foi realizada empregando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.), no qual aplicou-se a

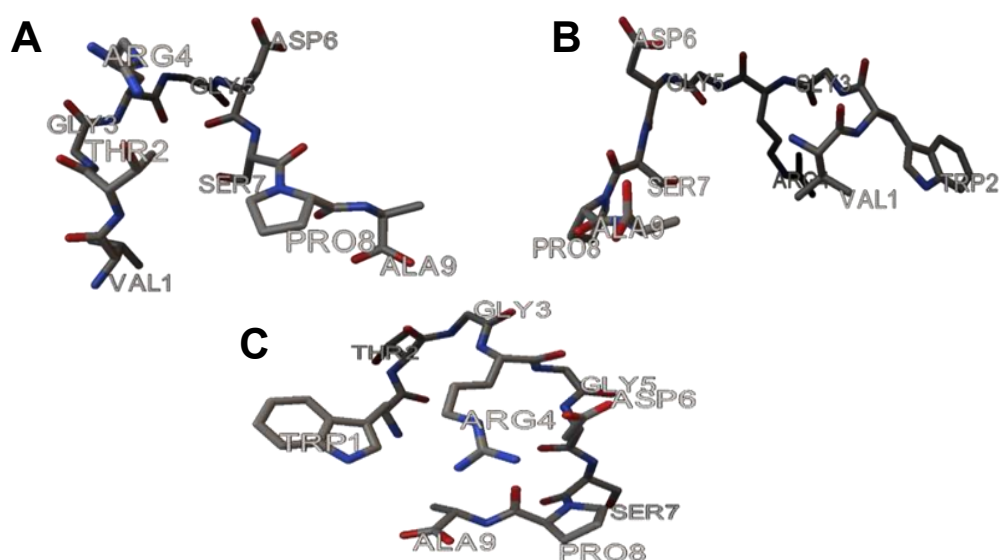
análise de variância (ANOVA) fator único, com teste de Tukey como pós-teste e determinação do nível de significância para  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados e Discussão

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

A partir do estudo computacional descrito no item 3.1, foi possível modelar tridimensionalmente os três peptídeos para análise de ligantes, cujos exemplos estão apresentados nos modelos da Figura 8 (A, B e C).

**Figura 8.** 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 pelo autor.

Quanto à análise comparativa das interações intermoleculares das melhores conformações tridimensionais dos complexos docados, três exemplos estão ilustrados na Figura 9, 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.





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 e demais ensaios.

#### 4.2. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos RGD

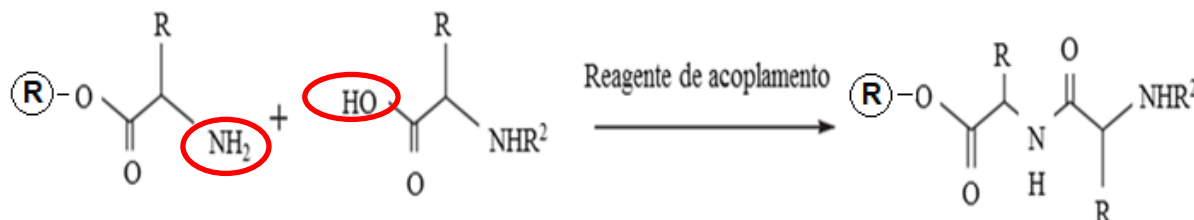
A síntese de peptídeos poderia ser explicada, em nível bastante básico, como a formação química repetida de ligações amida com a finalidade de conectar funções amina e carboxílica de aminoácidos adjacentes (MARCHETTO, 2006).

Os métodos de síntese química de peptídeos se dividem em duas categorias: em fase sólida ou em solução. Classicamente, como a maioria das reações orgânicas, todo processo associado à síntese de um peptídeo ocorria em solução. Há mais de cinco décadas, uma inovadora metodologia introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte para o crescimento das cadeias peptídicas. Neste método, denominado síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), o grupo carboxílico do aminoácido terminal está 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).

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) e o ataque nucleofílico pelo grupo amina do aminoácido que permanece ligado à resina, processo este que está esquematizado na Figura 10 (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, de forma a evitar a perda de quiralidade do resíduo associado ao grupo carboxílico que está acoplado.

**Figura 10.** Esquema da formação de uma ligação peptídica entre um aminoácido C-terminal (ligado a uma resina R) e um aminoácido adjacente na sequência



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

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 do aminoácido que está sendo acoplado, e os permanentes, que protegem os grupos funcionais reativos das cadeias laterais de todos aminoácidos da sequência, que continuam estáveis durante todos os ciclos e que são removidos apenas no final da síntese (MARCHETTO, 2006).

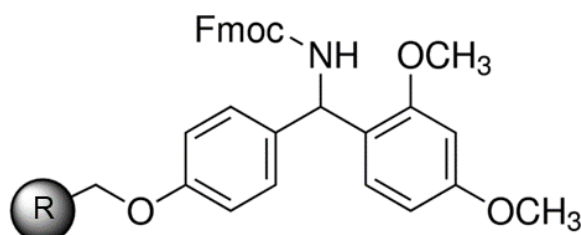
A estratégia adotada neste trabalho foi a Fmoc/tBu, que emprega o grupo 9-fluorenil-metiloxycarbonila (Fmoc) como grupo protetor temporário da função  $\alpha$ -amina, que é eliminado a cada etapa pelo uso de uma base de força moderada e, como protetor das cadeias laterais, o grupo *terc*-butila (tBu) 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 carbodiimidias, que são eficientes e de custo relativamente baixo.

A síntese dos peptídeos, JGB1 e JGB2, foi desenvolvida pela metodologia da fase sólida (SPFS) e a resina de partida foi uma Rink Amida MBHA (Figura 11). O uso desta resina, justifica-se pelo fato de que, ao final da síntese, os peptídeos produzidos apresentam 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 FN. A mesma justificativa

se aplica no caso da acetilação, ao final da síntese, do resíduo N-terminal. O objetivo, é obter uma sequência peptídica, sem carga efetiva nos resíduos terminais, assim como ocorre na proteína de origem.

**Figura 11.** Estrutura molecular parcial de uma Rink Amida MBHA Resina



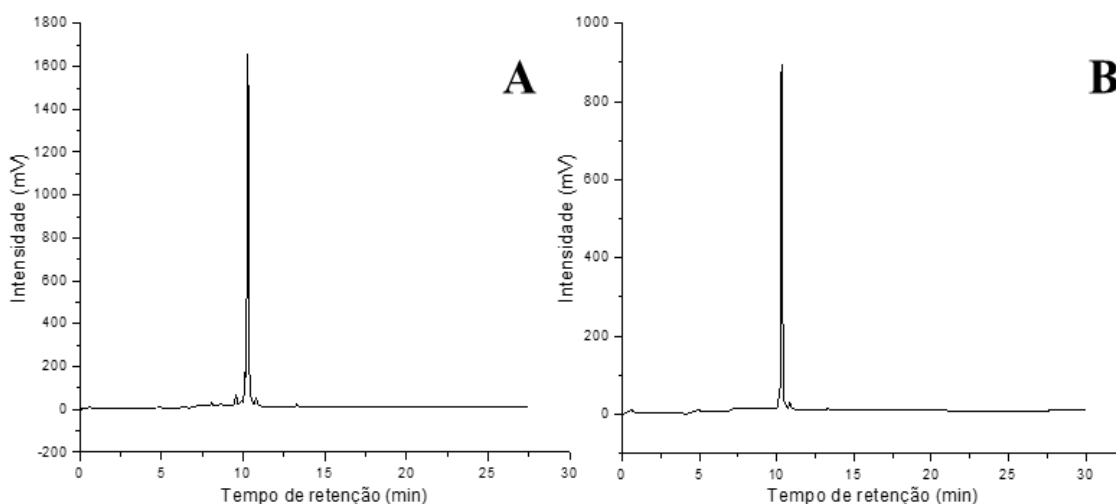
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Após os acoplamentos dos primeiros oito aminoácidos, a massa de peptidil-resina obtida na síntese foi de 1439 mg, a qual foi dividida em duas frações. Com a primeira fração, de 764 mg, prosseguiu-se com o acoplamento da valina (JGB1) e com a segunda, de 675 mg, o acoplamento de triptofano (JGB2), seguindo o protocolo descrito no item 3.3.

Cada uma das peptidil-resinas (300 mg) resultante do processo sintético foi submetida ao processo de clivagem utilizando 1 mL de solução de clivagem (TFA 95%, água deionizada 2,5% e TIS 2,5%) para cada 100 mg de peptidil-resina, à temperatura ambiente por 2 h sob agitação. Após o procedimento de clivagem, foi realizada a extração dos respectivos peptídeos JGB1 e JGB2 com ácido acético 15% em sistemas de seringas de polipropileno de 5 mL, equipadas com um filtro de polietileno poroso acopladas a um sistema de vácuo com frasco coletor para cada um dos peptídeos extraídos. O extrato bruto de cada peptídeo foi liofilizado e o valor da massa obtida para JGB1 e JGB2 foram 60 mg e 62 mg, respectivamente.

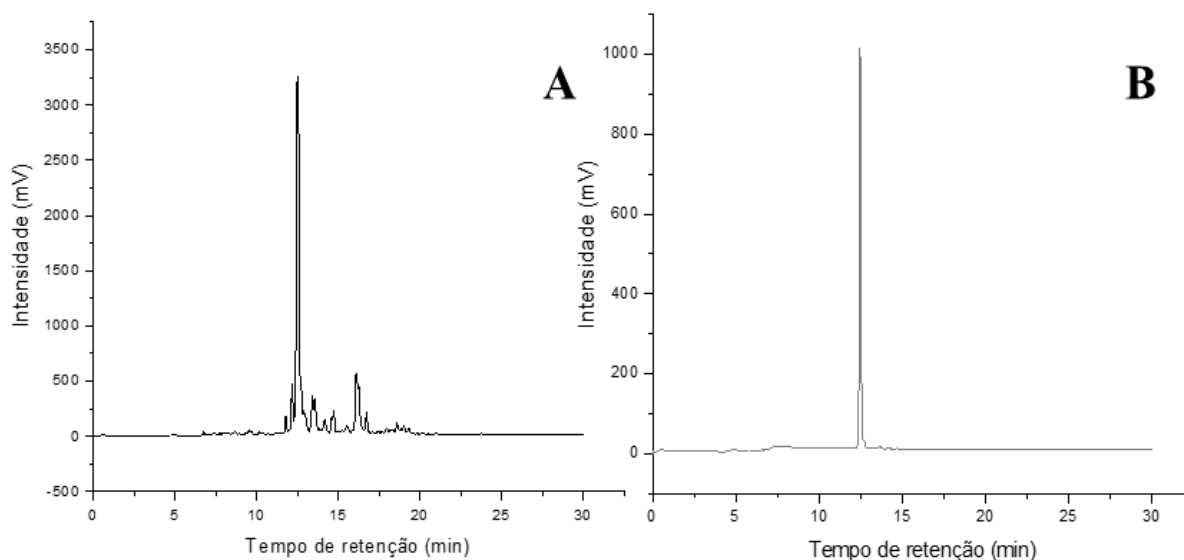
Após a clivagem final dos peptídeos das resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi realizada a análise e a purificação dos peptídeos brutos, de acordo com as condições descritas no item 3.4, e os perfis cromatográficos obtidos estão representados nas Figuras 12 e 13, antes e após a purificação, para fins comparativos.

**Figura 12.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo JGB1 antes (A) e após purificação (B). Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 13.** Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo JGB2 antes (A) e após purificação (B). Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O parâmetro tempo de retenção dos peptídeos purificados foi mantido em relação ao cromatograma correspondente na análise do extrato bruto, e a pureza relativa foi de 99,9% para ambos peptídeos, indicando que o método aplicado para o processo de purificação foi adequado.

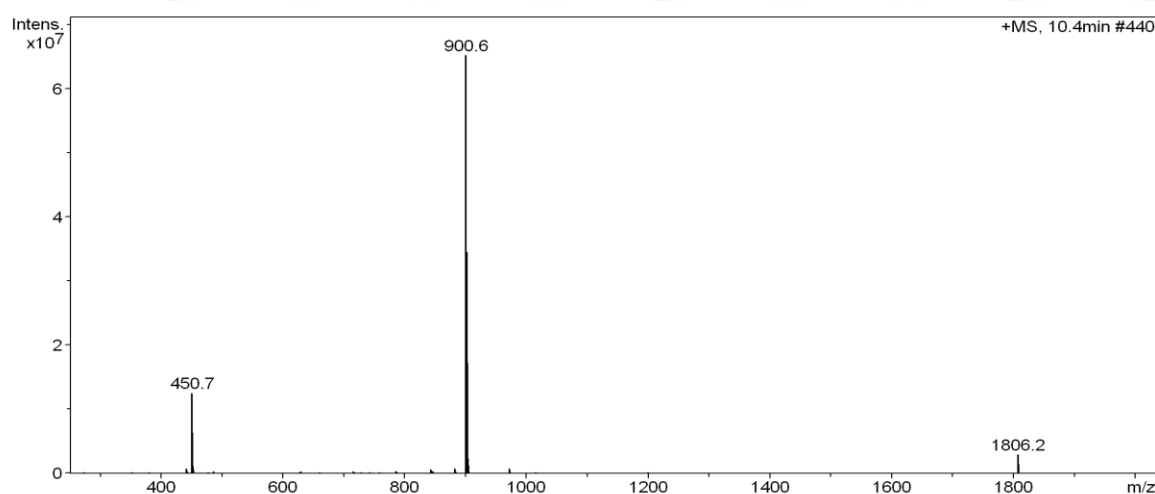
A confirmação da identidade dos produtos obtidos foi efetuada empregando um espectrômetro de massas *Bruker Amazon SL* acoplado a um cromatógrafo de fase líquida *Shimadzu* no modo de ionização positivo. O espectro de massas apresenta a razão massa molecular/carga ( $MM/z$ ), em que as massas moleculares obtidas experimentalmente podem ser calculadas empregando a equação 3:

$$MM_{\text{polipept}} = (MM \cdot z) - (z \cdot MM_{H^+}) \quad \text{(Equação 3)}$$

$MM_{\text{polipept}}$  = a massa molecular do polipeptídeo em análise;  $MM$  = a razão massa molecular/carga obtida pela espectrometria de massas;  $z$  = número de cargas que contém o polipeptídeo ( $z = 1, 2, \dots$ ) e  $MM_{H^+}$  = massa molecular do hidrogênio protonado, de valor  $1,008 \text{ g.mol}^{-1}$ .

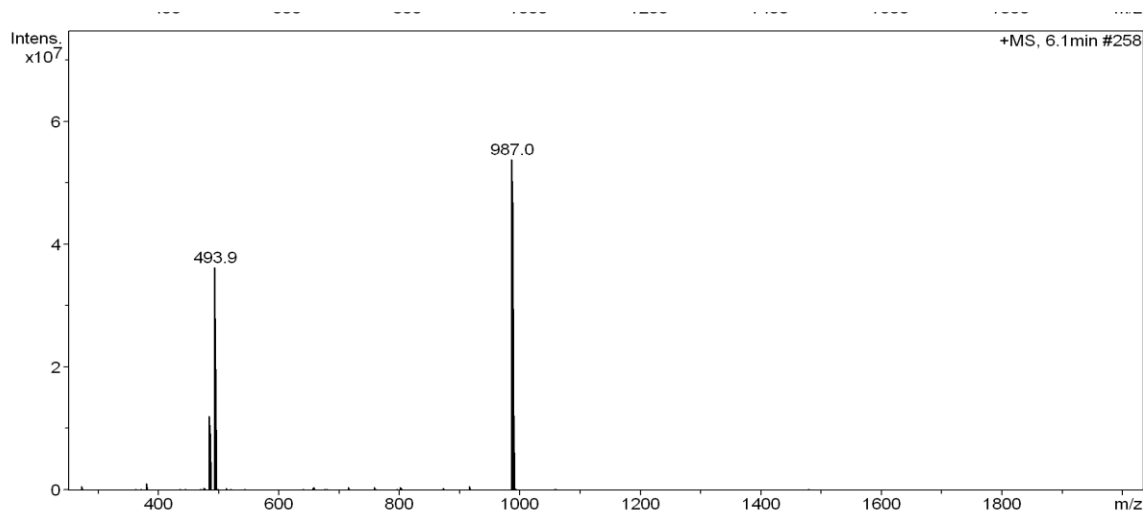
Os espectros de massas obtidos pelo método *electrospray* positivo [ES  $m/z$ : ( $M + H$ )<sup>+</sup>] são apresentados nas Figuras 14 e 15.

**Figura 14.** Espectro de massas do peptídeo JGB1. Condições de ESI-MS: capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES+.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 15.** Espectro de massas do peptídeo JGB2. Condições de ESI-MS: capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES+.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Com base nos espectros de massas anteriores constatou-se que os valores MM/z obtidos para os peptídeos JGB1 e JGB2 estão de acordo com os valores teóricos calculados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado da análise de espectrometria de massas. Razão massa molecular/carga (g.mol<sup>-1</sup>) teórica calculada

Peptídeo	Massa molecular teórica (g.mol <sup>-1</sup> )	Massa Molecular Obtida [ES m/z(M+H) <sup>+</sup> ] (g.mol <sup>-1</sup> )	Massa Molecular Obtida [ES m/z(M+2H) <sup>+2</sup> ] (g.mol <sup>-1</sup> )
JGB1	899,45	899,59	899,38
JGB2	986,46	985,99	985,78

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos foram compatíveis com os valores teóricos calculados, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas, o que evidencia que os procedimentos adotados para síntese, desproteção, clivagem e purificação foram

realizados com êxito. O rendimento após o processo de purificação foi de 35 mg para os dois peptídeos (JGB1 e JGB2).

O peptídeo JGB2 foi o escolhido para os estudos de funcionalização da CB, pelo fato da modificação do resíduo de valina por um triptofano, não ter provocado alterações substanciais na molécula, segundo resultados de *docking*, e permitir quantificações espectroscópicas pela presença deste aminoácido aromático.

#### 4.3. Funcionalização e incorporação do peptídeo JGB2 ao suporte de celulose bacteriana

Anteriormente à incorporação do peptídeo JGB2, a CB foi funcionalizada com um resíduo de lisina, para elevar o número de sítios com possibilidade de interação com o peptídeo. Para isso, empregou-se lisina com os dois grupos amina ( $\alpha$  e  $\epsilon$ ) protegidos com o grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc).

A quantificação ou o Grau de Incorporação (GI) do aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc) na membrana de CB foi realizado por medidas espectrofotométricas, em triplicata ( $n=3$ ). Os valores obtidos inicialmente resultaram em uma média de  $0,035 \text{ mmol.g}^{-1}$ . Este GI foi considerado baixo, e por esta razão, um segundo resíduo de lisina foi incorporado, nas mesmas condições descritas no item 3.5 empregando, neste caso, DIC como agente de acilação, na presença de HOBt. Ao final do período de acoplamento (aproximadamente 12 h) e respectivas lavagens, foi realizada nova quantificação do teor de lisina total incorporada.

Assim sendo, o GI médio final de Fmoc-Lys(Fmoc) às membranas de CB foi equivalente a  $0,157 \text{ mmol.g}^{-1}$ , quatro vezes maior que na primeira reação, resultado considerado adequado, de tal forma que, procedeu-se em seguida com a desproteção dos grupos amina da lisina recém-incorporada. Em seguida, as membranas foram lavadas exaustivamente com água ultrapura e liofilizadas para posterior incorporação do peptídeo JGB2.

Assim, a incorporação do peptídeo JGB2 foi realizada pelo processo de adsorção, onde intervêm interações moleculares por ligações de hidrogênio, cuja liberação posterior deve ocorrer com a elevação da força iônica do meio (condições biológicas) (SASKA, et al. 2011).



A concentração inicial real da solução do peptídeo JGB2 foi determinada experimentalmente como sendo de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , e o volume utilizado para imersão das membranas foi de 1 mL, ou seja foi utilizada uma quantidade máxima de 100 nmols do peptídeo.

Posteriormente, após as devidas lavagens, as membranas liofilizadas foram acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 25 kGy. Este processo de esterilização foi adotado de acordo com trabalhos anteriores 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 (SASKA, et al. 2012b; STOIC-GUZUN, 2013).

#### 4.4. Caracterização das membranas

##### 4.4.1. Ângulo de contato

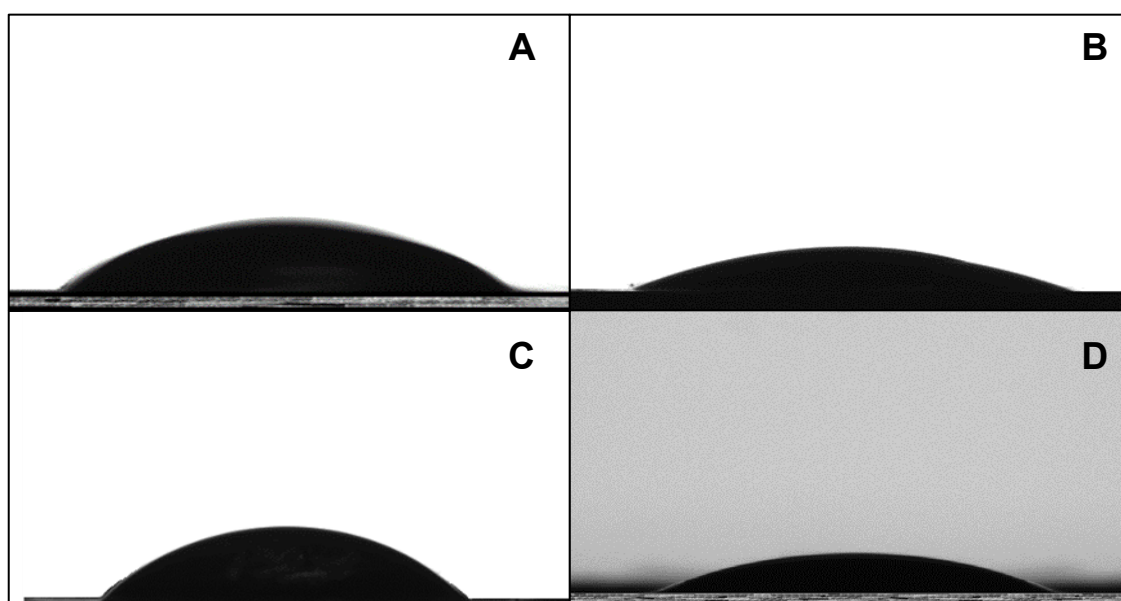
Na Figura 16 estão representadas as imagens capturadas através da câmera acoplada, durante as medidas de ângulo de contato, e mostram a interface líquido-superfície para as amostras de CB pura, CB-JGB2, CBKK e CBKK-JGB2, imediatamente após 5 s da dispensação da gota de água deionizada.

As medidas de ângulo de contato evidenciam que a funcionalização da CB com resíduos de Lisina diminui ligeiramente a molhabilidade da membrana (Tabela 5), basicamente devido a uma pequena redução na energia superficial da CB, provocada pela heterogeneidade química da CB modificada comparada à CB pura. A esterificação das hidroxilas reativas da CB com a Lisina pode ter provocado um aumento nas interações intermoleculares, especificamente entre as hidroxilas não reativas e os grupos amina recém introduzidos, refletindo em uma diminuição na rugosidade da CB e conseqüentemente na sua molhabilidade (aumento no valor do ângulo de contato).

Por outro lado, a adsorção do peptídeo JGB2, independentemente da membrana, funcionalizada com Lisina ou não, resultou em uma diminuição na medida do ângulo de contato. Neste caso, a adsorção do peptídeo JGB2 aumentou a quantidade de grupos hidrofílicos livres (ligações amida, grupos carboxílicos e aminas), diminuindo o ângulo de contato e conseqüentemente aumentando a

molhabilidade, pelo fato de que a energia de superfície das membranas contendo o peptídeo adsorvido é maior que as membranas sem o peptídeo. 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 16.** Imagens capturadas pela câmera CCD, no ensaio de ângulo de contato para a membrana secas de CB pura (A); membrana de CB-JGB2 (B); membrana de CBKK (C) e membrana de CBKK-JGB2 (D).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Tabela 5.** Valores mensurados do ensaio de ângulo de contato para as amostras de CB, CB-JGB2, CBKK e CBKK-JGB2. T=5 s, n=3.

Amostra	Média (°)	Desvio padrão (°)
CB	33,74	2,45
CB-JGB2	21,86	1,48
CBKK	41,15	0,37
CBKK-JGB2	26,53	2,58

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A adesão e a proliferação celular são processos complexos, que não dependem apenas da hidrofiliicidade, 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 todas 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 se comparada à CB pura.

Estudos anteriores mostraram que a superfície mais hidrofílica de alguns filmes de diferentes materiais resulta em uma adesão celular muito maior na superfície (GODDARD; HOTCHKISS, 2007). Por exemplo, a adesão de osteoblastos foi diminuída quando o ângulo de contato da superfície de um material aumentou de  $0^\circ$  para  $106^\circ$ . Em outro estudo, foram encontrados fibroblastos com adesão máxima, quando ângulos de contato foram entre  $60^\circ$  e  $80^\circ$  (WEI et al, 2009).

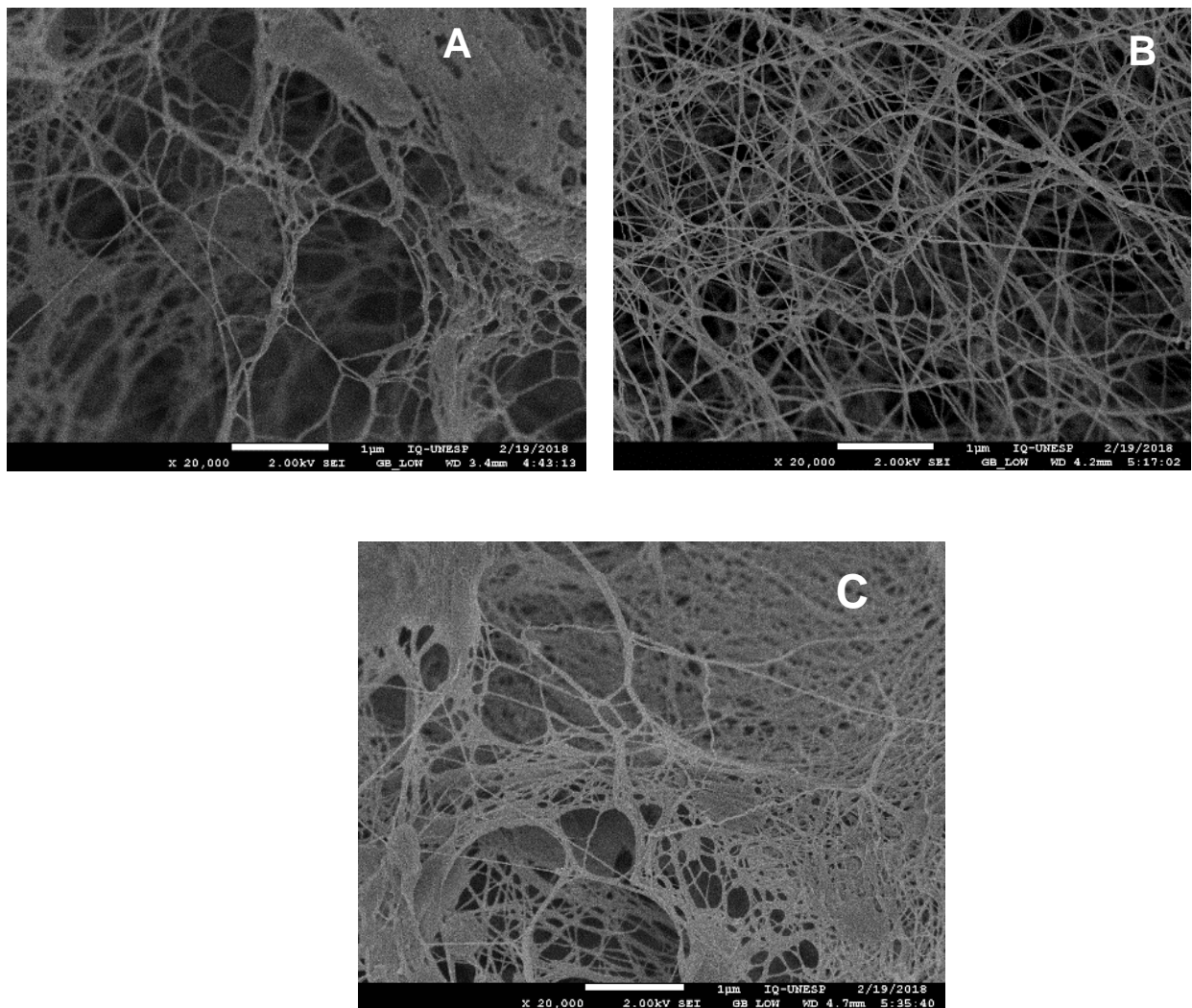
Além disso, a hidrofobicidade da superfície está relacionada com a taxa de disseminação e diferenciação celular. Nas superfícies hidrofílicas, as células mostraram boa disseminação, proliferação e diferenciação. Osteoblastos de ratos 7F2, em superfície hidrofílica (ângulo de contato =  $24 - 31^\circ$ ) demonstraram atividade metabólica acelerada e osteodiferenciação, quando comparadas com as contrapartes não modificadas e mais hidrofóbicas (ângulo de contato =  $72^\circ$ ) (YILDIRIM et al., 2010).

#### 4.4.2. *Microscopia Eletrônica de varredura de Alta Resolução de emissão de campo (MEV-FEG)*

A Figura 17 mostra as fotomicrografias das membranas de CB pura e modificadas, todas liofilizadas. Estas exibem nanofibras de rede tridimensional de tamanhos e espessuras aleatórias interconectadas em forma de uma estrutura porosa heterogênea, provavelmente devido ao processo de liofilização. As imagens não mostram alterações das fibras ou algum tipo de material inserido nos poros da

estrutura após funcionalização das membranas com lisina. No entanto, a espessura das fibras diminui ligeiramente com o processo de funcionalização com Lisina, o que pode indicar que a funcionalização consiste principalmente em camadas finas que envolvem as fibras individuais. Estes resultados são comparáveis aos relatados por SASKA e colaboradores (2012b) e ROUABHIA e colaboradores (2014), mostrando que a funcionalização das membranas não altera a morfologia das nanofibras da CB.

**Figura 17.** Micrografias de MEV mostrando a superfície das membranas liofilizadas de CB pura (A), CBK-JGB2 (B) e CBKK-JGB2 (C).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A análise da espessura das fibras da superfície das membranas de CB, realizado com o programa ImageJ, revelou que a amostra de CB apresentou fibras na ordem de 15 a 25 nm (média de 23 nm), a CB funcionalizada com uma lisina contendo o peptídeo (CBK-JGB2) entre 9 e 25 nm (média de 20 nm) e a CB funcionalizada com duas lisinas contendo o peptídeo (CBKK-JGB2), na ordem de 8 a 21 nm (média de 17 nm). Observa-se que a funcionalização com lisina, reduziu a espessura das fibras, o que pode estar refletindo em uma diminuição da rugosidade e conseqüentemente em uma ligeira redução na porosidade, o que pode explicar a diminuição da molhabilidade observada nestas amostras, durante as medidas de ângulo de contato em água.

É importante ressaltar que *G. xylinum* sintetiza nanofibrilas primárias com tamanhos laterais na faixa de 7-13 nm, que podem se agregar em faixas finas e planas ou fitas com larguras variáveis de até 70 nm (FARIA-TISCHER et al., 2010) e estas após funcionalização permitem o aumento nas interações intermoleculares, podendo promover uma ligeira diminuição na porosidade da CB. Por outro lado, poros menores podem impedir que as bactérias migrem através da membrana, o qual pode ser benéfico nas aplicações em cuidados de feridas. A presença de poros é, no entanto, crítica para permitir a troca de fluidos e gases através das membranas (FÜRSATZ et al., 2017).

A rugosidade da superfície do material é um fator importante que também influencia a adesão e o comportamento celular. Porém, há controvérsias em relação a resposta das células à porosidade, que é diferente dependendo do tipo celular. A rugosidade da superfície do material tem uma influência direta *in vitro* e *in vivo* na morfologia celular, na proliferação e na expressão fenotípica. Células maiores, como osteoblastos e neurônios, cultivadas em superfícies microporosas, foram estimuladas em direção à diferenciação, em comparação com células em crescimento em superfícies lisas ou nanoporosas (LEE et al., 2004; BARTOLO et al., 2008; AGASKÁ et al., 2010). Por outro lado, para células menores, como células endoteliais de veias humanas, o aumento da rugosidade superficial de biomateriais em escala nanométrica (10-102 nm) pode aumentar a adesão e o crescimento celular (CHUNG et al., 2003).

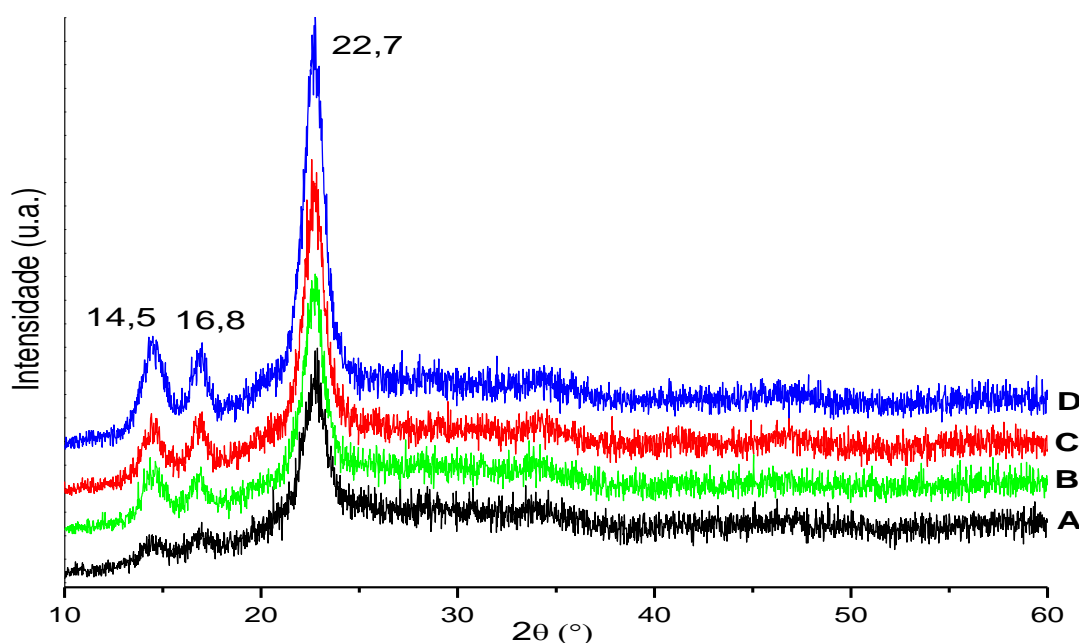
Neste aspecto, as membranas de CB modificadas e liofilizadas contendo o peptídeo, apresentando superfícies rugosas e boa porosidade, poderiam promover boa adesão e proliferação celular, dependente do tipo de célula.

A análise das micrografias por MEV indica que a metodologia utilizada para a funcionalização com Lisina e incorporação do peptídeo JGB2 na membrana, por adsorção, não resulta em alteração da estrutura das nanofibras, nem da morfologia de superfície das membranas.

#### 4.4.3. Difratomia de Raios-X (DRX)

Os difratogramas de DRX da membrana de CB pura e das membranas de CB-JGB2, CBK-JGB2 e CBKK-JGB2 estão representados na Figura 18. Todas as membranas de CB exibiram sinais de difração amplas em  $2\theta = 14,5$ ,  $16,8$  e  $22,7^\circ$ . Esses picos podem ser relacionados aos planos de projeção (1 0 0) e (0 1 0) e (1 1 0), respectivamente, que estão atribuídos ao espaçamento interplanar da celulose nativa tipo I $\alpha$  ou aos planos (1 -1 0), (1 1 0) e (2 0 0) da celulose I $\beta$ , respectivamente. O pico em  $22,7^\circ$  também está relacionado com o plano (0 2 0) da celulose II (ZENG; et al., 2014).

**Figura 18.** Padrão de difração de raios X para CB pura (A), CB-JGB2 (B), CBK-JGB2 (C) e CBKK-JGB2 (D), com bandas assinaladas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os difratogramas de cada membrana de CB modificada não mostraram alterações significativas em relação à membrana CB pura, indicando que a modificação da celulose não alterou o padrão de cristalinidade da matriz de CB. No entanto, o pico mais alto e mais largo a  $22,7^\circ$  mostrado no padrão DRX, para as amostras funcionalizadas, sugere que uma maior estrutura cristalina foi alcançada após funcionalização (HU; et al. 2014).

Foram obtidos um  $IC_r$  de 82,85% para a CBKK-JGB2, de 79,49% para a CBK-JGB2 e de 77,57% para a CB-JGB2 e CB pura, confirmando que a funcionalização resulta em um aumento na cristalinidade da CB.

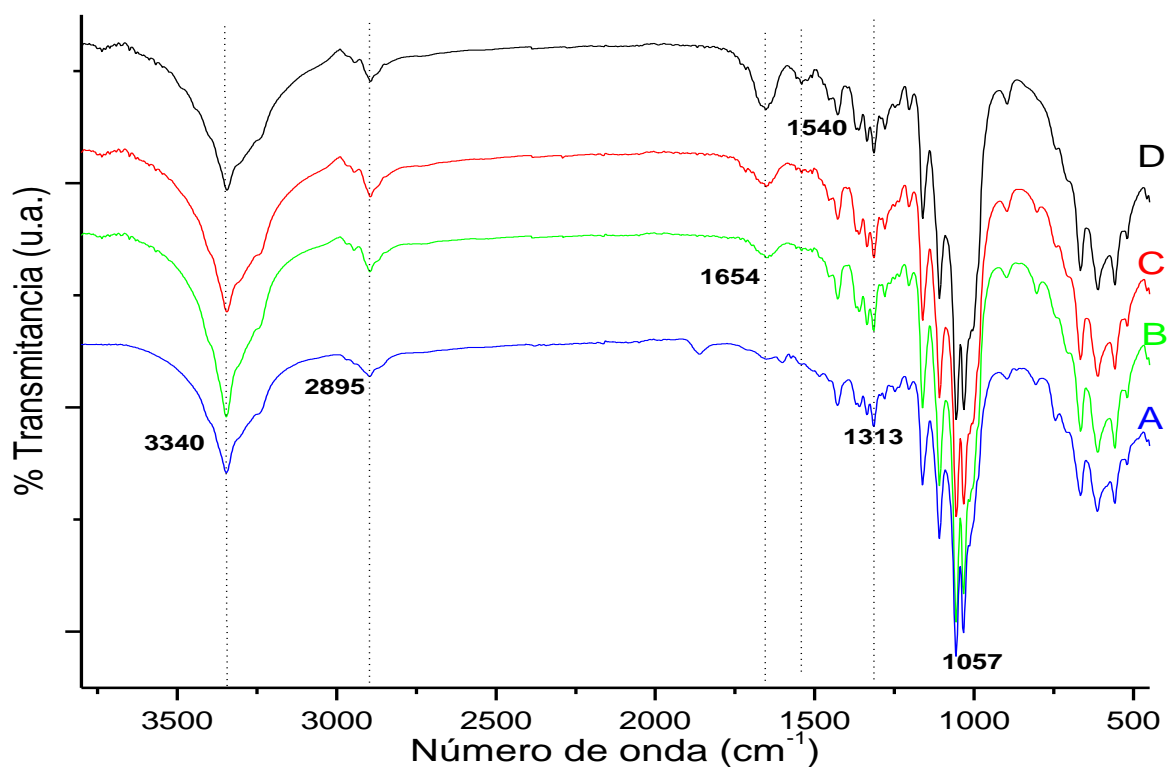
#### 4.4.4. *Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)*

Os resultados do espectro FT-IR para as amostras de membranas de CB liofilizadas estão representados na Figura 19. As principais bandas vibracionais características da celulose e comum a todas amostras, são atribuídas em  $3340\text{ cm}^{-1}$ , para estiramento de OH,  $2895\text{ cm}^{-1}$  para estiramento de CH para alcanos e estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$ , em  $1432\text{ cm}^{-1}$  para deformação simétrica de  $\text{CH}_2$ , em  $1313\text{ cm}^{-1}$  para deformação de OH e em  $1057\text{ cm}^{-1}$  para deformação para C-O (SASKA et al., 2012b).

A incorporação do peptídeo por adsorção resultou em bandas adicionais a  $1654\text{ cm}^{-1}$  (alongamento de C=O de amida I) e  $1540\text{ cm}^{-1}$  (deformação N-H para amida II), ambos com incremento de intensidade nas amostras funcionalizadas com uma ou duas lisinas (Figuras 19 C e D). Estas duas bandas estão bem definidas o que sugere a presença do peptídeo adsorvido na CB.

Em  $1540\text{ cm}^{-1}$  é observada uma banda de flexão (deformação) N-H ou alongamento de C-N para amida II, o que sugere a funcionalização e incorporação do peptídeo nas fibras da CB. Além disso, a banda em  $1654\text{ cm}^{-1}$  da CB funcionalizada apresentou deslocamento de  $14\text{ cm}^{-1}$  em relação à CB ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ), sugerindo que o peptídeo apresenta interação com os grupos OH da CB por ligações de hidrogênio.

**Figura 19.** Espectro FT-IR das membranas: (A) CB, (B) CB-JGB2, (C) CBK-JGB2 e (D) CBKK-JGB2.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Na Tabela 6 estão relacionadas as principais bandas vibracionais de infravermelho observadas nas amostras.

A análise de FT-IR, portanto, sugere a incorporação do peptídeo JGB2 nas amostras de CB, pela presença de bandas características e incremento de intensidade nas amostras funcionalizadas e pequenos deslocamentos de bandas referente aos grupamentos amidas, evidenciando interações intermoleculares do peptídeo com a membrana funcionalizada com lisina.



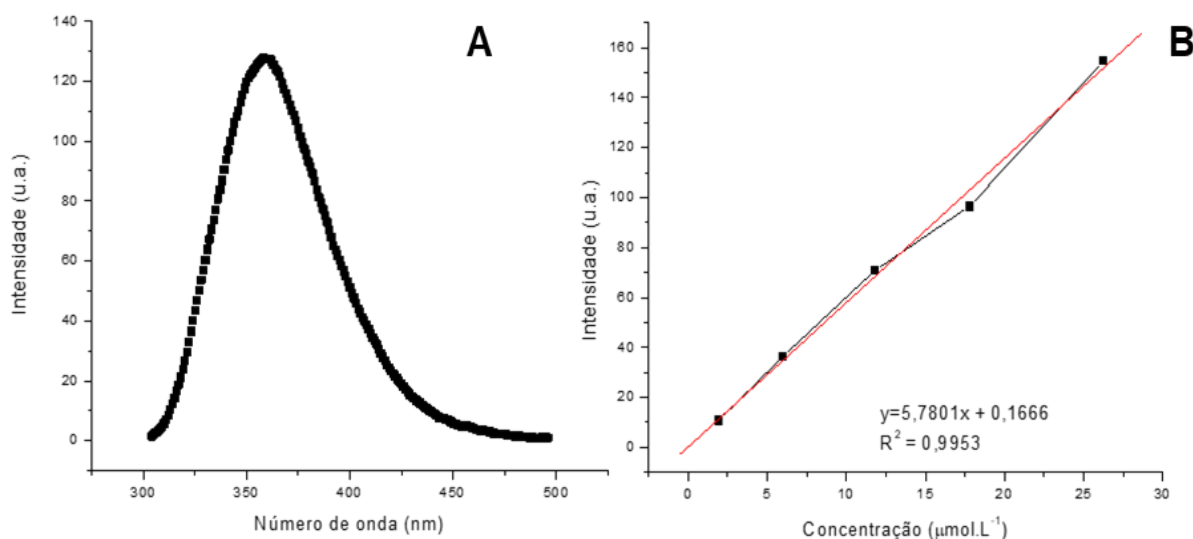
**Tabela 6.** Designação das principais bandas vibracionais de absorção de infravermelho das amostras de CB.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		Vibração
Celulose	Peptídeo	
3500-3300		Estiramento O-H
	3330 – 3180	Estiramento N-H (amida)
	2960 – 2890	Estiramento C-H dos grupos CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub>
	1660 – 1640	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	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
1057		Estiramento simétrico de álcool primário C-O
895		Ligações β-glicosídicas entre as unidades de glicose
665-670		Deformação OH fora de fase

#### 4.5. Liberação do peptídeo

A liberação do peptídeo JGB2 das membranas de CB liofilizadas foi avaliado por espectroscopia de fluorescência. Um espectro de fluorescência do peptídeo livre (Figura 20A) foi traçado, com excitação a 280 nm (obtido por espectrofotometria de absorção) e varredura de 300 a 500 nm, a fim de se determinar o comprimento de onda máximo de emissão de JGB2, que foi de 353 nm. Em seguida traçou-se uma curva padrão de fluorescência do peptídeo JGB2 (2 a 26 μmol.L<sup>-1</sup>), a 37° C (Figura 20B) para auxiliar na quantificação do peptídeo liberado das respectivas membranas de CB.

**Figura 20.** (A) Espectro de fluorescência do peptídeo JGB2 ( $\lambda_{exc} = 280$  nm), (B) curva padrão da intensidade de fluorescência mostrando a equação da reta e o coeficiente de determinação.



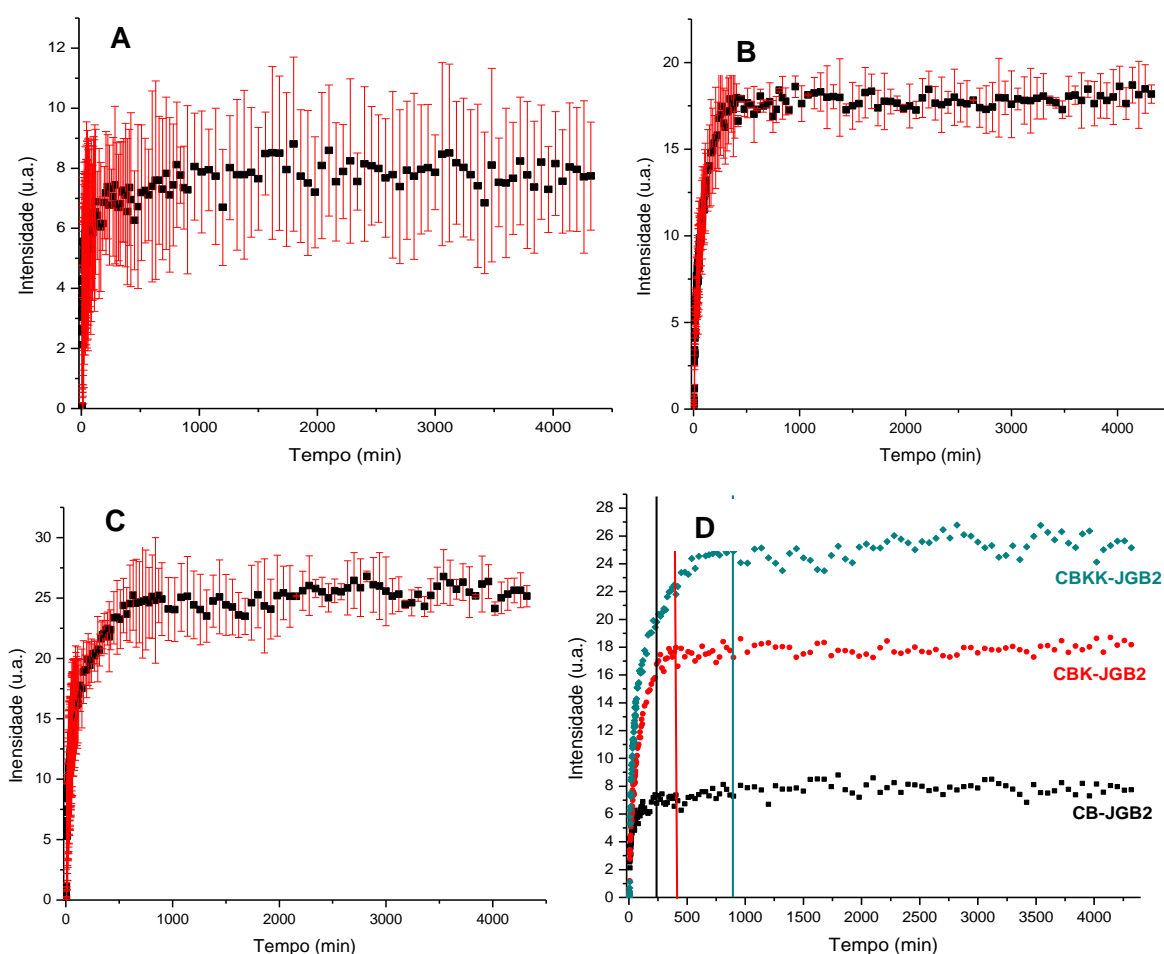
**Fonte.** Elaborado pelo autor.

Deste modo, o comportamento de liberação *in vitro* do JGB2 da membrana CB foi monitorado e mensurado por espectroscopia de fluorescência, com excitação em 280 nm e emissão em 353 nm a 37° C por um período de 72 h em circuito fechado com fluxo contínuo em solução PBS (pH 7,40). A Figura 21 mostra que a quantidade do peptídeo JGB2 foi liberada gradualmente da CB, em 4 h, com cerca de 17,8% (1,27  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou 17,8 nmols) do valor teórico a ser incorporado (100 nmols), a partir deste período a concentração do peptídeo liberado manteve-se constante. Para a CB modificada, os valores foram superiores: liberação de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (70%) em 7 h para CB contendo uma lisina (CBK) e 7,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (100 %) em 15 h para CB contendo duas lisinas (CBKK).

Desta forma, sugere-se que a quantidade do peptídeo incorporado nas membranas de CB, CBK e CBKK foi respectivamente de 17,8; 70 e 100% da solução padrão em que as membranas foram imersas, e que em 4, 7 e 15 h, respectivamente, 100% da quantidade adsorvida foi liberada para o sistema. A modificação da CB com resíduos de Lisina não só promoveu o aumento na quantidade de peptídeo adsorvido, como também o tempo de liberação do mesmo, ambos proporcionais ao número de

resíduos de lisina incorporado. Este aumento na capacidade de adsorção acompanhado pelo retardamento no tempo de liberação, podem ser consideradas características que confirmam à membrana de CB modificada, desejáveis para aplicações em processos de regeneração tecidual.

**Figura 21.** Curva de liberação com valores das médias e as barras indicando erro padrão para experimento em duplicata para A) CB-JGB2; B) para a CBK-JGB2 e C) para a CBKK-JGB2 e C) Curvas de liberação do peptídeo JGB2 adsorvido das membranas de CB; CBK-JGB2 e CBKK-JGB2.



Fonte. Elaborado pelo autor.

#### 4.6. Análises *in vitro*

A determinação da viabilidade das células L929 foi realizada após 24, 48 e 72 h de incubação com as membranas de CB seca (CBd), CB liofilizada (CBf), CBd-

JGB2, CBf-JGB2, CBKKd-JGB2 e CBKKf-JGB, sendo utilizado como controle positivo as células em meio DMEM e como controle negativo o meio DMEM e isopropanol.

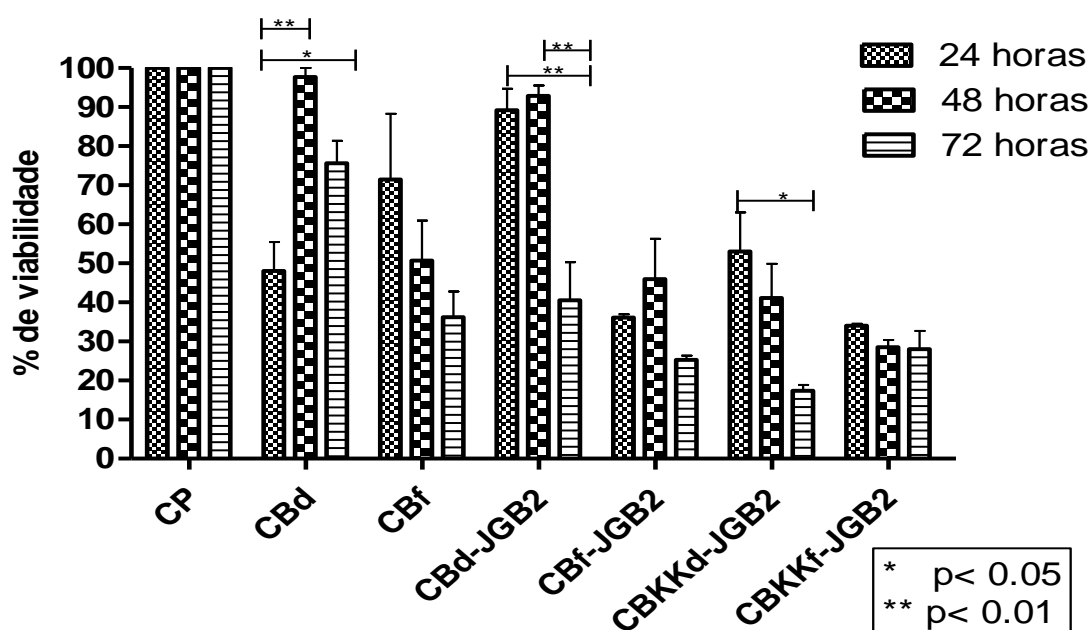
Os cálculos para obtenção dos valores de viabilidade celular foram realizados a partir da equação 4:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{Branco})}{Abs_{CP}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo;  $Abs_{amostra}$ , média da absorbância de cada amostra analisada;  $Abs_{branco}$ , média da absorbância do controle negativo (ou branco) e  $Abs_{CP}$ , média da absorbância do controle positivo, considerando-se como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas celulares realizadas somente em presença de meio DMEM (controle positivo).

Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade como média  $\pm$  desvio padrão, e estão demonstrados na Figura 22.

**Figura 22.** Teste de citotoxicidade celular pelo método de MTT para as células L929, expresso em %Viabilidade, com tempo de incubação das amostras de 24, 48 e 72 h. CP, control positivo; CB<sub>d</sub>, CB seca; CB<sub>f</sub>, CB liofilizada; CB<sub>d</sub>KK, CB funcionalizada seca; CB<sub>f</sub>KK, CB funcionalizada liofilizada.



Fonte. Elaborado pelo autor.

Na Figura 22 é possível observar que a membrana de CBd mostrou uma viabilidade crescente, alcançando valores superiores a 70%, após 48 e 72 h de incubação, ou seja, sem toxicidade, de acordo com o padrão da ISO 10993-5:2009 (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009) que preconiza o mínimo de 70% de viabilidade celular para que um material seja considerado não citotóxico. A adsorção do peptídeo JGB2, aumentou a viabilidade da CBd, porém após 72h de incubação, observou-se um decréscimo na taxa de viabilidade, um fato que pode estar relacionado à maturação das culturas celulares, já que este foi um resultado comum a todas as amostras ensaiadas.

A funcionalização da celulose com Lisina, de modo geral e independentemente da adsorção do peptídeo, resultou em uma amostra com menor taxa de viabilidade. De fato, ensaios anteriores mostraram que a funcionalização reduziu a espessura das fibras de celulose, o que pode estar refletindo na diminuição da rugosidade da CB, resultando na diminuição da molhabilidade observada para estas membranas. Neste caso, parece que a adesão e a proliferação celular foram inibidas à medida que as membranas apresentaram redução na porosidade, de acordo, portanto com os resultados de Chung e colaboradores, que relacionou o aumento da adesão e proliferação celular com o aumento da rugosidade da superfície do biomaterial (CHUNG et al., 2003).

Soma-se a isso, o fato de que a funcionalização com lisina, aumentou o número de cargas positivas na CB, no pH de ensaio, e conseqüentemente uma redução no número de grupos OH livres, o que também pode ter influenciado na diminuição da viabilidade e aumento da toxicidade observadas para a CB funcionalizada. Sobre este ponto de vista, Keselowsky e colaboradores já haviam relatado que superfícies com diferentes grupos funcionais carregáveis (grupos -CH<sub>3</sub>, -OH, -COOH e -NH<sub>2</sub>) modulavam a adsorção de FN e direcionavam a integração e especificidade da integrina para controlar a adesão celular de osteoblastos MC3T3 a superfícies revestidas com FN seguindo a tendência: **OH** > COOH = **NH<sub>2</sub>** > CH<sub>3</sub> (KESELOWSKY et al., 2003). Diferentemente, a incorporação de cargas negativas, e não positivas como no caso, pode facilitar a adsorção de proteínas que promovem adesão e respostas celulares (THEVENOT et al., 2008).

Ensaio com amostras liofilizadas, funcionalizadas ou não, contendo ou não o peptídeo JGB2 adsorvido, foram tóxicas (viabilidade celular abaixo de 70%) para as células testadas. Células específicas requerem diferentes tamanhos de poro para fixação, crescimento e motilidade ideais (RANUCCI et al, 2000). Estudos sobre gel de colágeno de tamanho de poro variável mostrou que a migração celular é dificultada pelo pequeno tamanho dos poros, especialmente pela alta densidade de ligantes no gel que contribui para a invasão celular limitada (YANG et al., 2010). Por outro lado, tamanho muito grande de poros resulta em ligações insuficientes para gerar tração o que também limita a migração celular (ULRICH et al., 2010).

O processo de liofilização teoricamente leva à formação de amostras mais porosas. Neste caso, a elevada porosidade foi determinante na limitação da proliferação celular, evidenciada pelos valores de viabilidade celular abaixo de 70%.

Roubhia e colaboradores (2014) testaram a viabilidade de membranas de CB secas e modificadas na superfície com peptídeos RGD em fibroblastos de pele humana por meio do ensaio de MTT por 24 e 48 h. Os resultados obtidos por meio dessas membranas de CB, contendo o peptídeo RGD promoveram uma maior viabilidade em comparação com as membranas de CB puras, além de apresentarem uma maior densidade celular para os ensaios realizados em 48 h, quando comparados aos ensaios realizados em 24 h. Moreira e colaboradores (2009) também testaram a viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT com fibroblastos de camundongo 3T3 e células de ovário de hamster chinês (CHO: *Chinese Hamster Ovary*) em nanofibras de CB por 24, 48 e 72 h mostrando uma ligeira diminuição na taxa de proliferação, presumindo que pequenas mudanças no material provavelmente provocou alterações entre as interações material-célula. Esses resultados são comparáveis com os obtidos neste trabalho com as membranas de CBd e CBd-JGB2.

Em outra pesquisa com membranas de CB, Andrade e colaboradores (2010) utilizaram proteínas e peptídeos RGD e GRGDY para promover melhorias na adesão de células endoteliais microvasculares humanas. Nos ensaios de proliferação por 24, 48 h e 7 dias com MTS, após cada período de incubação, obtiveram resultados onde alguns peptídeos RGD melhoraram a adesão celular à CB, embora outros peptídeos contendo RGD diminuíssem o crescimento das células com o tempo de incubação. Por meio deste resultado, acredita-se que a migração celular foi afetada negativamente,

---

dados que a presença de RGD fez com que as células se ligassem fortemente à superfície do material, impedindo o movimento das células.

No ensaio de MTT se observou que membranas secas (sem funcionalização) conseguiram uma maior viabilidade celular em comparação com as membranas liofilizadas contendo RGD, isso provavelmente aconteceu porque sua hidratação foi mais rápida em comparação com as membranas liofilizadas. Embora, CBf e CBKKf se mostrem tóxicas para as células pela dificuldade de mobilização na rede de fibras desidratadas e a alta afinidade das células com o peptídeo RGD diminuiu ainda mais a migração celular. Então, provavelmente para obter melhores resultados se deve aumentar o tempo de hidratação das membranas CBf e CBKKf para permitir migração com maior eficiência para as células, diminuindo assim, a densidade celular.

## 5. Conclusões

- O protocolo desenvolvido para esterificação dos grupos hidroxilas da CB com resíduo de aminoácido Lisina foi eficaz para posterior incorporação do peptídeo JGB2;
- Os ensaios de caracterização mostraram que as membranas, funcionalizadas adequadamente, se apresentam 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;
- As membranas de CB funcionalizadas foram capazes de adsorver maior quantidade de peptídeo quando comparada com a CB nativa e a liberação do peptídeo JGB2 foi mais prolongada, ocorrendo em um período de 15 h;
- A funcionalização da celulose com Lisina, de modo geral resultou em uma amostra com menor taxa de viabilidade celular, devido à alta densidade de cargas positivas, menor molhabilidade e possível baixa rugosidade;
- A adsorção do peptídeo JGB2, aumentou a viabilidade das membranas, porém em períodos superiores a 72 h de incubação, observou-se um decréscimo na taxa de viabilidade, um fato que pode estar relacionado à maturação das culturas celulares;
- O processo de liofilização levou à produção de membranas com baixa viabilidade, evidenciando que, no caso das células utilizadas, o aumento da porosidade é determinante na limitação da proliferação celular;



## 6. Perspectivas

Como proposta para estudos futuros, pode-se citar:

- Realizar medidas de rugosidade e porosidade das diferentes membranas, para uma avaliação quantitativa da relação viabilidade celular e tamanho dos poros e rugosidade da superfície das membranas;
- Funcionalizar as membranas de CB, com outro aminoácido, que venha a conferir uma carga líquida negativa às membranas e realizar estudos comparativos com aquelas funcionalizadas com Lisina;
- Realizar estudos *in vivo* com as membranas secas e liofilizadas para avaliação da resposta imune, incluindo o estudo de cinética do peptídeo em relação à resposta inflamatória
- Mudar a metodologia do ensaio de viabilidade de MTT utilizado neste trabalho e realizar outros tipos de ensaios de viabilidade. Ademais, realizar ensaios para avaliar a proliferação celular por microscopia de fluorescência e estudos de morfologia celular para obter melhores resultados da avaliação da resposta imune.

## 7. Referências

- AGASKÁ, B.; BAČÁKOVÁ, L.; FILOVÁ, E.; BALÍK, K. Osteogenic Cells on BioInspired Materials for Bone Tissue Engineering. **Physiological Research**, 59, 309-322, 2010.
- 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(1), p. 9-17, 2010.
- 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.
- BARTOLO, L. D.; RENDE, M.; MORELLI, S.; SALERNO, S., A, P.; GORDANO, A.; et al. Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. **Journal of Membrane Science**, v. 325, p. 139-149, 2008.
- BARUD, H. S.; ARAÚJO JR., 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.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; 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. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, 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, 2011.
- BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing-A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 104, p. 3653-3680, 2015.
- 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(12), p. 3697-3704, 2007.
- BODIN, A.; BACKDAHL, H.; PETERSEN, N.; GATENHOLM, P.; Bacterial Cellulose as Biomaterial. **Materials of Biological Origin.**, v. 2.223, p. 405-410, 2011.
- 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, 1998.
- BROUGHTON, G., JANIS, J.E., ATTINGER, C.E. Wound Healing: An Overview. **Plastic and Reconstructive Surgery.**, v. 117(7S), p. 1e-S-32e-S, 2006.

- BROWN JR, R. M.; 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. USA**, v. 73, p. 4565-4569, 1976.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 20(1), p. 51-58, 2007.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 2000.
- CHUNG, T.-W.; LIU, D.-Z.; WANG, S.-Y.; WANG, S.-S. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. **Biomaterials**, v. 24, p. 4655-4661, 2003.
- CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R. M. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145-151, 2006.
- 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.
- EFRON, P.A., MOLDAWER, L.L. Cytokines and Wound Healing: The Role of Cytokine and Anticytokine **Therapy in the Repair Response. Journal of Burn Care & Rehabilitation.**, v. 25(2), p. 149-160, 2004.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci. Transl. Med.**, v. 6, n. sr265. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337, 2014.
- FARIA-TISCHER, P. C. S.; SIERAKOWSKI, M.R.; WESTFAHL, H. Jr.; TISCHER, C. A. Nanostructural Reorganization of Bacterial Cellulose by Ultrasonic Treatment. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 1217-1224, 2010.
- 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. **Journal of Dermatological Science**, v. 45, p. 45-53, 2007.
- FÜRSATZ, M.; SKOG, M.; SIVLÉR, P.; PALM, E.; ARONSSON C. SKALLBERG, A.; GRECZYNSKI, G.; KHALAF, H.; BENGTSSON, T.; AILI, D. Functionalization of Bacterial Cellulose Wound Dressings with the Antimicrobial Peptide  $\epsilon$ -poly-L-Lysine. **Biomedical Materials**, v. 13, n. 2, p. 1-11, 2017.
- GLEMBOTSKII, V. A.; KLASSEN, V. I.; PLAKSIN, I. N. Flotation. Translated by Hammond, R. E. (editor). Metally, T. (editor in American translation). New York, 1972.
- GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 698-725, 2007.
- GOLDSTEIN, A. S. Cell Adhesion. In: FISHER, J. P.; MIKOS, A. G.; BRONZINO, J. D. (Ed.) **Tissue Engineering**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. p. 5-1 a 5-17.
- GOLDBERG, S. R.; DIEGELMANN. R.F. Wound Healing Primer. **Surgical.theclinics N Am.**, v. 90, p. 1133-1146, 2010.

- 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, p. 4385-4415, 2003.
- HU, Y.; CATCHMARK, J. M.; ZHU, Y.; ABIDI, N.; ZHOU, X.; WANG, J.; LIANG, N. Engineering of porous bacterial cellulose toward human fibroblasts ingrowth for tissue engineering. **Materials Research Society**, v. 29, n. 22, p. 2682-2693, 2014.
- HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose.**, v. 21, p.1–30, 2014.
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Bruxelas, 2009.
- JAKHUA, H.; GILLB, G.; SINGH, A. Role of integrins in wound repair and its periodontal implications. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research.**, v. 8, p. 122–125, 2018.
- 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.
- 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, p. 595-598, 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, 2008.
- KESELOWSKY, B. G.; COLLARD, D. M.; J., G. A. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. **Journal of Biomedical Material Research A**, v. 66, p. 247-259, 2003.
- 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, 2005.
- KRUGER, D. M.; GOHLKE H. DrugScorePPI webserver: fast and accurate in silico alanine scanning for scoring protein–protein interactions. **Nucleic Acid. Res.**, v. 38, p. 480-486, 2010.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Ed.). **Robbins e Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Basic Science Medicine**. v. 45:6. p. 347-351. 2017.
- LEE, S. J.; CHOI, J. S.; PARK, K. S.; KHANG, G.; LEE, Y. M.; LEE, H. B. Response of MG63 osteoblast-like cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes. **Biomaterials**, v. 25, p. 4699-4707, 2004.
- LEJA, J. Surface Chemistry of Froth Flotation. Plenum Press. New York and London. 1982.

- LUZ, A.P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V.C. Use of the wettability in the investigation of the corrosion behaviour of the refractory materials. **Cerâmica**, v. 54, p. 174-183, 2008.
- 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.
- MANSIKKAMAKI, P.; LAHTINEN, M.; RISSANEN, K. The conversion from cellulose I to cellulose II in NaOH mercerization performed in alcohol–water systems: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydr. Polym.** v. 68, p. 35-43, 2007.
- 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, p. 146-157, 2011.
- 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. **Toxicology Lettes.** v. 189, n. 3, p. 235-241, 2009.
- MOON, R.J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chem. Soc. Rev.** v. 40, p. 3941–3994, 2011.
- MURPHREE, R.W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics of North America**. v. 52, ed. 3, p. 405-417. 2017
- OLIVEIRA BARUD, H. G.; SILVA, R. R.; BARUD, H. S.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; OLIVEIRA, O. B. JR.; RIBEIRO, S. J. L. A. Multipurpose Natural and Renewable Polymer in Medical Applications: Bacterial Cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.
- PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, p. 30-33, 1984.
- POLETTO, 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**. [S.l.]: InTech, p. 45-68, 2013.
- PTAFF, E. Recognition sites of RGD-dependent integrins. In: EBLE, J. A.; KUHN, K. (Ed.) **Integrin-Ligand Interactions**. Austin, Texas: R.G. Landes Co., 1997.
- QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. **Chinese Journal of Traumatology.**, v. 20, p. 189-193, 2017.
- RANUCCI, C. S.; KUMAR, A.; BATRA, S. P.; MOGHE, P. V. Control of hepatocyte function on collagen foames: sizing matrix pores toward selective induction of 2-D and 3-D cellular morphogenesis. **Biomaterials**, v. 21, p. 783-793, 2000.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**. V. 49, p. 35–43. 2012.
- ROUABHIA, M.; ASSELIN, J.; TAZI, N.; MESSADDEQ, Y.; LEVINSON, D.; ZHANG, Z. Production of Biocompatible and Antimicrobial BC Polymers Functionalized by RGDC. Grafting Groups and Gentamicin. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6 (3), p. 1439–1446, 2011.

- RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 12, n. 1, p. 697-715, 1996.
- SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration. **International Journal of Biomaterials**, 2011.
- SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEXEIRA, L. T.; PEREIRA, L. F.; SANTOS, R.A.; GASÁR, A. M. M.; DE OLIVEIRA P. T.; ROSA, A. L.; TAKAHASHI, C. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; MARCHETTO, R. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **J Mater Sci: Mater Med.**, p. 23:2253–2266. 2012a.
- 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, 2012b.
- SCHNITTERT, J.; BANSAL, R.; STORMA, G.; PRAKASH, J. Integrins in wound healing, fibrosis and tumor stroma: High potential targets for therapeutics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 129, p. 37-53, 2018.
- SEGAL, L.; CREEELY, 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.
- 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. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1187-1191, 2011.
- SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in Bacterial Cellulose production. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 10, p. 1-8, 2005.
- STEWART, J. M.; JOUNG, J. D.; RB, M. Solid phase peptide synthesis. 2nd ed. New York: Pierce Chemical, 1984.
- 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.
- SULAEVA, I; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1547–1571, 2015.
- THEVENOT, P.; HU, W. J.; TANG, L. P. Surface chemistry influences implant biocompatibility. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 270-280, 2008.
- 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, p. 455-461, 2010.

ULLAHA, H.; WAHIDB, F.; SANTOS, H. A.; KHANA, T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. **Carbohydrate Polymers.**, v. 150, p. 330–352, 2016.

ULRICH, T. A.; JAIN, A.; TANNER, K.; MACKAY, J. L.; KUMAR, S. Probing cellular mechanobiology in three dimensional culture with collagen-agarose matrices. **Biomaterials**, v. 31, p. 1875-1884, 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. 2019.

VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. **Cell Tissue Res.**, v. 305, n. 3, p. 285-298, 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.

WEI, J.; IGARASHI, T.; OKUMORI, N.; MAETANI, T.; LIU, B. S.; YOSHINARI, M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. **Biomedical Materials**, 4, 045002., 2009.

WHITE, E. S.; BARALLE, F. E.; MURO, A.F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. **Journal of Pathology**, v. 216, p. 1–14, 2008.

YANG, Y., MOTTE, S.; KAUFMAN, L. J. Pore size variable type I collagen gels and their interaction with glioma cells. **Biomaterials**, v. 31, p. 5678-5688, 2010.

YILDIRIM, E. D.; BESUNDER, R.; PAPPAS, D.; ALLEN, F.; GUCERI, S.; SUN, W. Accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. **Biofabrication**, 2, 014019, 2010.

ZENG, M.; LAROMAINE, A.; ROIG, A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. **Cellulose**, v. 21, p 4455-4469, 2014.

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, p. 7873e7882, 2010.